

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS Campus de
CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

QUEISIELLE MAGALHÃES CARVALHO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE
PEPTIDASE *Inga laurina* TRYPSIN INHIBITOR (ILTI)**

CAMPO GRANDE – MS
ABRIL – 2022

QUEISIELLE MAGALHÃES CARVALHO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE
PEPTIDASE *Inga laurina* TRYPSIN INHIBITOR (ILTI)**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Coorientador: Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero

CAMPO GRANDE – MS

ABRIL – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

TERMO DE APROVAÇÃO

QUEISIELLE MAGALHÃES CARVALHO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE PEPTIDASE *Inga laurina* TRYPSIN INHIBITOR (ILTI)

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2022

Comissão Examinadora:

Maria Ligia Rodrigues Macedo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Nome
Instituição (Sigla)

Nome
Instituição (Sigla)

Nome (Suplente)
Instituição (Sigla)

Nome (Suplente)
Instituição (Sigla)

*Ao meu Senhor e meu Deus;
Às mães que atuam na ciência;
À Bella, que nasceu e renasceu durante este trabalho.*

“Não sabes, não ouviste que o eterno Deus, o Senhor, o Criador dos fins da terra, nem se cansa nem se fatiga? É inescrutável o seu entendimento. Dá força ao cansado, e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor. Os jovens se cansarão e se fatigarão, e os moços certamente cairão; Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão” (Bíblia Sagrada, Isaías 40:29-30).

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Criador, Deus Presente, Minha Luz e Caminho, por me confiar esta missão e por ter renovado minhas forças e esperança. Por ter me enviado pessoas fundamentais nesta jornada e ter nos dado sabedoria. Por realizar milagres, dentre os quais, o nascimento e renascimento de nossa filha e a preservação de nossa saúde mental e física durante todo o tempo.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo por ter acreditado em minha vontade de ingressar no PMBqBM e por ter me recebido como sua orientanda. Não encontro palavras para expressar o quanto a senhora me influenciou e animou durante toda essa jornada, por unir excelência e amor ao fazer ciência. Por realizar as reuniões do grupo LPPFB com comprometimento com o rigor científico em clima amistoso e alegre. Te agradeço por sempre me atender em meio às incontáveis demandas de sua agenda.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero pelas incansáveis e fundamentais revisões, correções e sugestões na escrita e pelo direcionamento dos experimentos no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da UFMS. Obrigada por me responder sempre de forma tão ágil e objetiva

À equipe do Laboratório de Purificação de Proteínas e Suas Funções Biológicas (LPPFB) da UFMS onde se faz ciência com excelência, amor e entusiasmo.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da UFMS pelo apoio por me acolherem, pela amizade, parceria na jornada diária do laboratório e troca de conhecimentos.

Ao meu esposo e amigo Raul Daniel de Souza por cumprir sua promessa de me auxiliar no prosseguimento dos estudos. Por ter me encorajado a ingressar no PMBqBM. Por ter cuidado das demandas ao nosso redor durante a realização deste trabalho. Por revisar meus textos, me auxiliar a organizar os pensamentos e me atender em meio a seus inumeráveis compromissos. Por sua paciência, amor, foco e ânimo inabaláveis. Por me lembrar que este trabalho foi para Ele e por Ele.

À minha filha Bella por me acompanhar nas atividades de escrita, leitura e videoconferências com simpatia, tranquilidade, paciência, amor e alegria. Seu sorriso e companhia tornaram tudo muito mais feliz.

À minha querida família adquirida por casamento, especialmente minha sogra Jesuíla e meus cunhados Renan, Elisa e Angélica. Sua amizade e preces me apoiaram. Agradeço ao meu cunhado Renan pela colaboração fundamental no gerenciamento de meus arquivos digitais.

Aos meus amados pais Hudson e Meire Sandra, ao meu irmão Sandson, a minha avó Noêmia. Com vocês, aprendi a fazer o que me é confiado com honestidade e diligência e a amar os estudos desde as primeiras lições da infância. Agradeço por apoiarem meu sonho de cursar o mestrado e por me animarem no caminho.

À Kamylla Fernanda Souza de Souza pelos experimentos conduzidos em colaboração com dedicação e excelência. Por ter me ensinado as técnicas de laboratório na cultura celular “do zero”. Por sempre dirimir minhas inumeráveis dúvidas sobre experimentos, biologia e vida acadêmica. Por ser tão didática, prestativa e paciente. Para mim você é um exemplo de pesquisadora e amiga.

À Kelly Juliana Filippin pelos experimentos realizados em colaboração, por ter me auxiliado e me treinado com tanta dedicação nos primeiros experimentos da cultura celular e com a citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira, pelo auxílio na organização da escrita de meu trabalho, por sempre se dispor a tirar minhas dúvidas e por compartilhar comigo seu conhecimento.

À professora Dra. Ana Cristina Jacobowski por ter me recebido como aluna especial com dedicação e por ter acreditado em minha vontade de ingressar no mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular.

Às técnicas Dra. Magali Costa Barbosa Lima e Silva e Dra. Simone Maria Neto por me auxiliarem nos experimentos, me encorajarem e compartilharem comigo seu vasto conhecimento em cultura celular e em purificação de proteínas respectivamente.

Aos colegas de laboratório Dhébora, Pedro, Gih, Mariah e Cláudia pela parceria e auxílio na cultura celular.

Aos veteranos Claudiane, Letícia e Rodrigo que me receberam com tanto carinho como aluna especial da disciplina de Fundamentos de Bioquímica. Por

compartilharem comigo seus conhecimentos em Bioquímica e Biologia Molecular e me auxiliarem no estudo para a prova do Processo Seletivo do PMBqBM.

Às colegas de turma Isabella e Aline pela amizade e parceria nos estudos. Por escutarem minhas apresentações de seminário, minhas dúvidas e fazerem contribuições. A companhia de vocês tornou tudo mais alegre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado a mim concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Ao coordenador do PMBqBM da UFMS Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena e aos demais professores vinculados ao programa.

Ao Colegiado Local e ao Colegiado Geral do PMBqBM por todo o apoio na realização e conclusão deste curso.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por oportunizar a realização deste trabalho.

RESUMO

Inibidores de peptidase da família *Kunitz* possuem diversos mecanismos de ação anticâncer. O *Inga laurina Trypsin inhibitor* (ILTI) possui conhecida atividade inseticida, fungicida e antibiofilme e foi recentemente produzido por expressão heteróloga com potencial atividade anticâncer *in vitro*. Entretanto, seu mecanismo de ação anticâncer não foi elucidado. A fim de incrementar os conhecimentos disponíveis sobre a ação anticâncer de inibidores de peptidase vegetais, propomos investigar as propriedades anticâncer do ILTI em modelo de leucemia. Para a obtenção das curvas de citotoxicidade do ILTI, foi realizado o teste de triagem com o sal tetrazólio MTT nas linhagens leucêmicas KG-1, Kasumi e K-562 expostas às concentrações de 0,5 e 5 μM , por 24 h. Seguiu-se com a avaliação da citotoxicidade com resazurina nas linhagens Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 e K-562, expostas as concentrações de 0,1 e 0,5 μM de ILTI, por 24 h. O mecanismo de ação anticâncer do ILTI foi verificado no modelo de leucemia mielóide crônica K-562 por citometria de fluxo. Utilizou-se o ILTI a 0,07 μM , concentração correspondente ao IC_{50} obtido no ensaio de citotoxicidade com o iodeto de propídio (PI), em 24 h. O tipo de morte celular foi verificado utilizando-se dupla marcação com anexina-V-FITC/PI após 24 h de exposição ao ILTI. Realizou-se também o ensaio de ativação de caspase-3 com o anticorpo PE *Rabbit Anti-Active Caspase-3* após 12 e 24 h. O ciclo celular foi analisado utilizando-se marcação com PI, após 24 h. O ILTI foi citotóxico para as linhagens Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 e K-562. Células leucêmicas K-562 tratadas com o ILTI sofreram processo de apoptose mediado pela ativação de caspase-3. Aparentemente, apoptose foi a principal via de morte ativada, uma vez que houve um aumento insignificante de morte por necrose. É possível que a apoptose provocada por ILTI possua envolvimento com a parada do ciclo celular na fase G2/M observado em células K-562. Experimentos futuros incluem a ativação de caspase-9, liberação de citocromo C e perda de potencial mitocondrial, para trazer um melhor entendimento da atividade anticâncer do ILTI.

Palavras-chave: leucemias, leucemia mielóide crônica, inibidores, apoptose.

ABSTRACT

Kunitz family peptidase inhibitors have several anticancer mechanisms of action. *Inga laurina* Trypsin inhibitor (ILTI) is known for its insecticidal, fungicidal and antibiofilm activities. Recently, ILTI was produced by heterologous expression and exhibited potential *in vitro* anticancer activity. However, the anticancer mechanism of action has not been elucidated. In order to increase the available knowledge about the anticancer action of plant peptidase inhibitors from the Kunitz family, we propose to investigate the anticancer properties of ILTI in a leukemia model. The screening test was performed with the tetrazolium salt MTT using the leukemic strains KG-1, Kasumi and K-562 exposed to ILTI at 0.5 and 5 μ M for 24 h. The test with resazurin was performed on the Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 and K-562 strains, exposed to ILTI between 0.1 and 0.5 μ M, in 24 h, to obtain the curves of cytotoxicity. The anticancer mechanism of action of ILTI was verified in the model of chronic myeloid leukemia K-562 by flow cytometry. ILTI was used at 0.07 μ M, concentration corresponding to the IC₅₀ obtained in the cytotoxicity assay with propidium iodide (PI), in 24 h. The type of cell death was verified using annexin-V-FITC/PI double labeling after 24 h of ILTI exposure. The caspase-3 activation assay was also performed with PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 antibody after 12 h and 24 h. The cell cycle was analyzed using PI labeling after 24 h. ILTI was cytotoxic to Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 and K-562 strains. K-562 leukemic cells treated with ILTI underwent apoptosis process mediated by caspase-3 activation. Apparently, apoptosis was the main pathway of activated death, since there was insignificant increase in death by necrosis. It is possible that ILTI-induced apoptosis is involved with cell cycle arrest in the G2/M phase observed in K-562 cells. Future experiments should include activation of caspase-9, release of cytochrome c and loss of mitochondrial potential, to corroborate current results and bring a better understanding of the anticancer activity of ILTI.

Keywords: leukemias, chronic myeloid leukemia, inhibitors, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral das vias de sinalização da apoptose extrínseca e intrínseca.....	33
Figura 2 - Visão clássica do ciclo celular.....	35
Figura 3 - Efeito citotóxico do inibidor de peptidase ILTI em células leucêmicas.....	47
Figura 4 - Curvas de citotoxicidade do inibidor de peptidase ILTI em células humanas Raji, CCRF-CEM, KG-1 e Kasumi-1.....	49
Figura 5 - Curva de citotoxicidade do inibidor de peptidase ILTI em células humanas saudáveis.....	50
Figura 6 - Efeito citotóxico do inibidor de peptidase ILTI em células K-562	52
Figura 7 - Curva de citotoxicidade do inibidor de peptidase ILTI em células humanas K-562 pelo ensaio com iodeto de propídio.....	53
Figura 8 - Efeito do tempo de tratamento com o ILTI na externalização da fosfatidilserina e permeabilização da membrana celular em células K-562.....	54
Figura 9 - Efeito do tempo de tratamento com o ILTI na ativação da caspase-3 em células K-562.....	57
Figura 10 - Avaliação de parada do ciclo celular em células K-562 tratadas com ILTI.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Os quinze cânceres mais incidentes no mundo.....	25
--	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE - Material Suplementar.....	70
--------------------------------------	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO - Parecer Consubstanciado do CEP	71
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt *Non-specific serine/threonine protein kinase* (Proteína quinase serina/treonina não específica)

Anexina-V-FITC/PI Anexina V conjugada a isotiocianato fluoresceína/Iodeto de propídio

APAF1 *Apoptotic protease activating factor 1* (Fator de ativação da peptidase apoptótica 1)

BAK *Bcl-2 antagonist killer 1* (Antagonista de assassinos Bcl-2 do tipo 1)

BAX *Bcl-2-associated X protein* (Proteína X associada a Bcl-2)

BCL-2 *B cell lymphoma protein 2* (Proteína do linfoma de células B2)

BCL-XL *Bcl-2-related protein long form of Bcl-x* (Proteína Bcl-2 relacionada à forma longa de Bcl-x)

BCR *Breakpoint cluster region* (Região do cluster do ponto de interrupção)

BCR/ABL1 Gene ou tirosinoquinase resultante da fusão 3' das sequências do gene ABL1 (*Abelson*) em 9q34 com 5' das sequências do gene BCR (*breakpoint cluster region*) em 22q11

BH3 *BCL-2 type 3 homology domain* (Domínio de homologia BCL-2 do tipo 3)

BID	<i>BH3-interacting domain</i> (Agonista da morte no domínio que interage com BH3)
Caspase	<i>Cysteine dependent aspartate-specific protease</i> (Peptidase aspartato-específica dependente de proteína)
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (Quinase dependente de ciclina)
CN	Controle não tratado
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxiribonucleico)
E _{max}	Efeito máximo
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (Quinase regulada por sinal extracelular)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
h	Hora/horas
hHR23	<i>Double-strand-break repair protein rad21 homolog</i> (Proteína de reparo de quebra de fita dupla homóloga rad21)
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> (Concentração de um inibidor na qual a resposta é reduzida pela metade)

ILTI	<i>Inga laurina Trypsin inhibitor</i> (Inibidor de tripsina de <i>Inga laurina</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
Ki	<i>Inhibition constant</i> (Constante de inibição)
Ki67	Proteína marcadora de proliferação Ki-67
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
MCL1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl 1</i> (Proteína de diferenciação de células de leucemia mielóide induzida Mcl 1)
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Proteína quinase ativada por mitógeno)
Min	Minuto/minutos
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> (Permeabilização da membrana externa mitocondrial)
mTOR	<i>Serine/threonine-protein kinase mTOR</i> ou <i>mammalian target of rapamycin</i> (Serina/treonina-proteína quinase mTOR ou alvo mamífero da rapamiacina)

MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio)
NTS	<i>Nuclear translocation sign</i> (Sinal de translocação nuclear)
P	<i>Phosphate</i> (fosfato)
P53	Gene/proteína supressora de tumor
PARs	<i>Protease-activated receptors</i> (Receptores ativados por peptidases)
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
Pgp	<i>Glycerol-3-phosphate phosphatase</i> (Fosfatase de glicerol-3-fosfato)
Ph	Cromossomo <i>Philadelphia</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
RAF	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i> (RAF proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase)
RAS	Proteína RAS
Rb	Proteína retinoblastoma

RE	Reticulo Endoplasmático
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> (Instituto Memorial Roswell Park 1640)
SFB	Soro fetal bovino
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i> (Segundo ativador mitocondrial de caspase)
TKIs	<i>Tyrosine kinase inhibitors</i> (Inibidores de tirosoquinase)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TRAILR	<i>Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1</i> (Receptor de ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
XIAP ligado ao X)	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> (Inibidor da apoptose ligado ao X)

LISTA DE SÍMBOLOS

G	<i>G-force</i> (Força G)
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	CÂNCER	24
2.2	LEUCEMIAS	25
2.2.1	Leucemia Mielóide Aguda (LMA).....	26
2.2.2	Leucemia Mielóide Crônica (LMC).....	27
2.2.3	Leucemia Linfocítica Aguda (LLA).....	28
2.2.4	Leucemia Linfocítica Crônica (LLC).....	30
2.3	MORTE CELULAR.....	31
2.3.1	Apoptose.....	32
2.4	CICLO CELULAR	34
2.5	INIBIDORES DE PEPTIDASE E CÂNCER.....	36
2.6	<i>Inga laurina</i> TRYPSIN INHIBITOR (ILTI)	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	PREPARO DA AMOSTRA DE <i>Inga laurina</i> TRYPSIN INHIBITOR (ILTI).....	40
4.2	CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES.....	41
4.3	VIABILIDADE DE CÉLULAS LEUCÊMICAS EXPOSTAS AO ILTI..	41
4.4	CURVAS DE CITOTOXICIDADE DO ILTI.....	42
4.4.1	Linhagens leucêmicas.....	42
4.4.2	Células mononucleares do sangue periférico humano.....	43
4.5	VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO ILTI	43
4.6	AVALIAÇÃO DE EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR.....	44
4.7	AVALIAÇÃO DA CASPASE-3 ATIVA.....	45
4.8	AVALIAÇÃO DE PARADA DE CICLO CELULAR.....	46

5	RESULTADOS.....	47
5.1	VIABILIDADE DE CÉLULAS LEUCÊMICAS EXPOSTAS AO ILTI.....	47
5.2	CURVAS DE CITOTOXICIDADE DO ILTI.....	48
5.2.1	Linhagens leucêmicas.....	48
5.2.2	Células mononucleares do sangue periférico humano.....	50
5.3	VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO ILTI.....	51
5.4	AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR.....	53
5.5	AVALIAÇÃO DA CASPASE-3 ATIVA.....	56
5.6	AVALIAÇÃO DE PARADA DE CICLO CELULAR.....	58
6.	DISCUSSÃO.....	59
7.	CONCLUSÃO.....	63
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICE.....	70
	ANEXO.....	71

1 INTRODUÇÃO

O câncer responde por uma em cada seis mortes no mundo. É um dos grandes responsáveis por óbitos prematuros na maioria dos países (WHO, 2020). As leucemias são um grupo heterogêneo de desordens malignas do sangue e medula óssea que compreendem mais de 12 subgrupos biologicamente distintos caracterizadas por aumento no número de leucócitos no sangue e/ou medula óssea (JULIUSSON & HOUGH, 2016). De modo geral, as substâncias anticâncer precisam alterar o metabolismo celular levando à parada do ciclo celular e/ou à morte celular. É necessário o desenvolvimento de moléculas que afetem mais as células tumorais do que as normais, ou seja, que sejam mais específicas, e que ativem mecanismos de morte celular, em especial a apoptose (tipo de morte que estimula baixa resposta inflamatória). Embora, em estudos recentes, a apoptose tenha sido considerada um tipo de morte ideal para a eliminação de células malignas, a maioria destas células tem a capacidade de resistir à apoptose (GALLUZZI et al., 2018; ALI et al., 2016).

Inibidores de peptidase são moléculas amplamente distribuídas na natureza que regulam proteases alvo, bloqueando sua atividade exacerbada. Podem ser peptídeos com 15 a 60 resíduos de aminoácidos ou pequenas moléculas e seus análogos. No ser humano, estas moléculas possuem como principal função endógena a inibição da proteólise indesejada em situações fisiológicas e patológicas, e regulam a ativação de coenzimas e a liberação de polipeptídeos biologicamente ativos (COTABARREN et al., 2019). Situando-se entre os produtos de origem natural, os inibidores de peptidase possuem múltiplas atividades biológicas que incluem ação antitumoral, anticoagulante, anti-hipertensiva e antioxidante. Tem sido empregado no tratamento de doenças imunológicas, inflamatórias, respiratórias, cardiovasculares e neurodegenerativas, além de serem úteis no *design* de medicamentos (EATEMADI et al., 2017).

O *Inga laurina* Trypsin inhibitor (ILTI), um inibidor de peptidase pertencente à família *Kunitz*, é purificado das sementes de uma árvore popularmente conhecida como ingá branco. Muitos estudos já avaliaram o efeito de ILTI em diferentes modelos, como atividades inseticidas, fungicida e antibiofilme. Recentemente, a proteína ILTI foi produzida através de expressão heteróloga, sendo avaliado também seu potencial

anticâncer *in vitro*, em células de tumor de ascite de *Erlich* apesar de as características moleculares que regulam sua atividade anticâncer sejam desconhecidas (CARNEIRO et al., 2018; MACEDO et al., 2007, 2011, 2016),. Portanto, são necessários estudos que objetivem não apenas a verificação da atividade anticâncer do ILTI em células neoplásicas humanas, mas também a descrição de seu mecanismo de ação. E, desta forma, a fim de incrementar os conhecimentos disponíveis sobre a ação anticâncer de inibidores de peptidase vegetais, propomos investigar as propriedades anticâncer do ILTI em modelos de leucemia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

A incidência e mortalidade por câncer têm crescido de maneira global. Em 2018, estima-se que 18 milhões de pessoas desenvolveram câncer, e 9,6 milhões morreram devido a doença (BRAY et al., 2018). O número de óbitos pode alcançar 29,4 milhões até o ano de 2040, destacando-se uma previsão de grande aumento nos países de média e baixa renda, onde mais de dois terços dos casos de câncer ocorrerão (WHO, 2020). No Brasil, estão estimados 625 mil novos casos de câncer anualmente no triênio 2020-2022 (INCA, 2019).

As células cancerígenas emitem sinais proliferativos que ativam o crescimento celular, a replicação do DNA e a divisão celular, mesmo quando não são necessárias novas células no organismo. Oncogenes são ativados por mutação expressando proteínas alteradas que transmitem sinais proliferativos por meio da interação de receptores tirosinas e/ou treoninas quinases (FUJITA et al., 2021). Assim, espera-se o desenvolvimento de terapias contra o câncer que atuem de forma seletiva, afetando mais as células tumorais do que as normais e que ativem mecanismos de apoptose, tipo de morte que estimula baixa resposta inflamatória. Isto se dá principalmente porque já se sabe que a maioria das células malignas desenvolvem mecanismos que levam ao bloqueio da apoptose, o que faz com que haja um aumento na sobrevivência das células malignas (GALLUZZI et al., 2018; ALI, et al., 2017).

Terapias adjuvantes anticâncer tem sido buscadas nas últimas décadas para melhorar os resultados terapêuticos das quimioterapias. Alguns exemplos são a radioterapia e as terapias alvo-específicas (MARMITT et al., 2020). Compostos de origem natural, derivados de plantas, têm sido estudados e utilizados na terapia anticâncer por muitos anos (GALI-MUHTASIB et al., 2015).

2.2 LEUCEMIAS

As leucemias são um grupo heterogêneo de desordens malignas do sangue e medula óssea que compreendem mais de 12 subgrupos biologicamente distintos caracterizadas por aumento no número de leucócitos no sangue e/ou medula óssea (JULIUSSON & HOUGH, 2016). No mundo, as leucemias são o décimo quinto tipo de câncer mais incidente (**Tabela 1**) e ocupam o décimo lugar em número de mortes (**Figura 1**). Estimaram-se 437 mil novos casos de leucemia no mundo em 2018 e 309 mil mortes (BRAY et al., 2018). Para o Brasil, estimaram-se 2.390 novos casos de leucemias no ano de 2020 (INCA, 2019).

Tabela 1 - Os quinze cânceres mais incidentes no mundo (Adaptado de BRAY, 2018).

Tipo de Câncer	Número de Casos (% em relação a todos os tipos de cânceres)
Pulmão	2.093.876 (11,6)
Mama	2.088.849 (11,6)
Próstata	1.276.106 (7,1)
Cólon	1.096.601 (6,1)
Pele não melanoma	1.042.056 (5,8)
Estômago	1.033.701 (5,7)
Fígado	841.080 (4,7)
Reto	704.376 (3,9)
Esôfago	572.034 (3,2)
Colo do útero	589.847 (3,2)
Tireoide	549.393 (3,0)
Bexiga	509.590 (2,8)
Linfoma Não-Hodgkin	509.590 (2,8)
Pâncreas	458.918 (2,5)
Leucemia	437.033 (2,4)
Todos os tipos de cânceres	18.078.957

O termo “Leukämie”, ou “sangue branco” foi cunhado por volta de 1845 pelo patologista Rudolf Virchow. Nesta época, ele já sabia que alterações na hematopoiese eram a causa da esplenomegalia e leucocitose observadas em seus pacientes. Em 1960, Peter Nowell e David Hungerford observaram pela primeira vez a ligação entre cromossomos e câncer ao descobrirem o que mais tarde foi denominado cromossomo *Philadelphia* (Ph). Em 1973, Janet Rowley observou que o cromossomo Ph era resultado de uma translocação recíproca entre o cromossomo 9 e 22 demonstrando pela primeira vez que uma alteração cromossômica pode provocar câncer (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021).

Atualmente, sabe-se que a translocação t(9;22)(q34;q11) dá origem ao oncogene quimérico denominado BCR-ABL1. Tal gene expressa a tirosinoquinase BCR-ABL1, uma proteína multidomínio com as isoformas 185 kDa, 210 kDa e 230 kDa, encontradas principalmente na leucemia linfocítica aguda, na leucemia mielóide crônica e na leucemia neutrofílica crônica, respectivamente. A isoforma apresentada depende do ponto de quebra que ocorre no gene BCR (HAIDER; ANWER, 2020; KOMOROWSKI et al., 2020; AMARANTE-MENDES et al., 2022). A translocação t(9;22)(q34;q11) ocorre geralmente nas células-tronco hematopoiéticas, que são as precursoras de células especializadas do sangue e medula óssea (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021).

As leucemias são classificadas em 4 tipos primários. São eles Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (MIRANDA-FILHO et al., 2018).

2.2.1 Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

São um grupo de cânceres genética e fenotipicamente distintos que tem em comum o acúmulo de blastos na medula óssea ou no sangue periférico. É um tipo de câncer agressivo e raro. Ocorre mais frequentemente em bebês abaixo de um ano (1,5 por 100.000) e em adultos, com destaque para octogenários (25 por 100.000). Sua frequência aumenta com a idade a partir da segunda década de vida. É pouco comum entre crianças e adolescentes (LAGUNAS-RANGEL et al., 2017). Na maioria das vezes a causa não pode ser identificada, mas pode estar relacionada a agentes que provocam danos ao DNA. Um exemplo são os quimioterápicos, principalmente agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II e radioterapia. A exposição crônica a altas doses de benzeno, exposição a altos níveis de radiação e o tabagismo também são fatores predisponentes. Pode também ser secundária a neoplasias mieloproliferativas, que aumentam a produção de células sanguíneas, e a síndromes mielodisplásicas, nas quais há defeitos na maturação celular e hematopoiese ineficaz. Dentre os adultos, 8% dos casos de LMA estão associados à radioterapia e quimioterapia, 12% são secundárias a síndromes mielodisplásicas e 6% são secundárias a neoplasias mieloproliferativas. Entre bebês, pode ser congênita (JULIUSSON & HOUGH, 2016; LAGUNAS-RANGEL et al., 2017).

O tratamento para a LMA varia de acordo com o subtipo apresentado, idade do paciente e fase da doença. Pode compreender quimioterapia com medicamentos como citarabina e antraciclina, tratamento sintomático e de prevenção de agravos, transplante alogênico de células tronco, agentes hipometilantes ou drogas experimentais como inibidores de tirosino-quinase. As anormalidades genéticas diferem entre os subtipos. Por isso, testes moleculares e citogenéticos são parte imprescindível do correto diagnóstico e tratamento adequado (JULIUSSON & HOUGH, 2016).

2.2.2 Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa caracterizada pelo crescimento descontrolado de células mielóides em diferentes estágios de maturação. A tirosinoquinase BCR/ABL1 resultante da translocação t(9;22) (q34;q11) ativa diversas vias de sinalização que levam à transformação maligna e também à resistência à quimioterapia. Pode apresentar-se nas fases crônica, acelerada e como crise blástica (OSMAN; DEININGER, 2021; AMARANTE-MENDES et al., 2022). Esta última caracteriza-se pelo aumento de blastos do tipo mielóide (70 % dos casos), linfóide ou misto/indiferenciado. A fase crônica, apresentada pela maioria dos pacientes, se não tratada, evolui para a fase acelerada seguida da crise blástica ou diretamente para a crise blástica em raros casos (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021). A LMC pode ocorrer em todas as idades, mas é rara em crianças menores de 10 anos e tem sua frequência máxima entre octogenários (JULIUSSON & HOUGH, 2016).

Os sintomas da LMC são inespecíficos. Metade dos pacientes são assintomáticos na fase crônica. Alguns poderão apresentar febre, fadiga e perda de peso, por vezes resultantes da anemia e esplenomegalia. Na crise blástica pode haver dor óssea e sangramento (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021).

Seu tratamento é baseado no uso de inibidores de tirosinoquinase (TKIs) como o imatinibe, de primeira geração, desatinibe, nilotinibe e bosutinibe de segunda geração e o ponatinibe, de terceira geração. Com o tempo, 50% dos pacientes desenvolvem resistência ou intolerância ao imatinibe (AMARANTE-MENDES et al., 2022). Mutações na tirosinoquinase BCR-ABL1 conferem resistência a TKIs de primeira e segunda geração. Uma dessas mutações é a BCR-ABL T315I contra a qual

apenas o ponatinibe exerce atividade (OSMAN; DEININGER, 2021). O ponatinibe entretanto está associado a oclusões vasculares, insuficiência cardíaca e hepatotoxicidade (AMARANTE-MENDES et al., 2022).

O uso de TKIs revolucionou o tratamento da LMC, permitindo aos pacientes uma sobrevida próxima a pessoas saudáveis da mesma idade. Mas a maioria dos pacientes recai após a retirada do tratamento. Faz-se obrigatória a adesão ao medicamento e acompanhamento do paciente. Nos casos de uma remissão prolongada, o tratamento pode ser suspenso sob monitorização molecular com sua retomada se houver recomeço da transcrição BCR-ABL1 (JULIUSSON; HOUGH, 2016; AMARANTE-MENDES et al., 2022).

O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas foi o principal tratamento até o advento dos TKIs. Hoje é considerado nos casos de progressão para a fase acelerada ou para crise blástica ou de resistência aos TKIs. Pode haver reação enxerto-hospedeiro (OSMAN; DEININGER, 2021).

Atualmente, pesquisam-se terapias objetivando-se a chamada Remissão Livre de Tratamento que consiste na manutenção da remissão após a descontinuação de TKIs. É considerada como objetivo terapêutico para adultos que estejam na fase crônica, que tenham utilizado TKIs por pelo menos 3 anos e que não possuam histórico de fase acelerada ou crise blástica. Pode beneficiar pessoas jovens e evitar as complicações do uso prolongado de TKIs. Outro campo de estudos atual são as terapias combinadas com o objetivo de erradicar as células-tronco da LMC (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021; OSMAN; DEININGER, 2021).

2.2.3 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)

A LLA é uma neoplasia hematológica que resulta da transformação maligna de células progenitoras linfoides da medula óssea, sangue e sítios extramedulares (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Acomete células linfoides da linhagem B (75 - 85 % dos casos), T (10 – 15 % dos casos) ou NK (< 1% dos casos) (FUJITA et al., 2021). Anormalidades cromossômicas e alterações genéticas levam à interrupção da maturação celular normal, cursando com o bloqueio da diferenciação celular e com uma proliferação celular transformada (COCCARO et al., 2019; FUJITA et al., 2021). A LLA pode estar associada a translocações cromossômicas como por exemplo a

t(9;22) [BCR-ABL1], a t(12;21) [ETV6-RUNX1] e a t(1;19) [TCF3-PBX1] (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

A LLA é o câncer infantil mais frequente e o segundo tipo de leucemia mais encontrado em adultos, representando 25% dos casos (COCCARO et al., 2019; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Seu pico de incidência ocorre entre 2 e 5 anos de idade e é mais comum entre meninos do que meninas. Pouco se sabe sobre a etiologia da LLA, mas fatores de risco ambientais e genéticos contribuem para seu desenvolvimento. Em crianças, geralmente inicia-se ainda dentro do útero (FUJITA et al., 2021). A exposição à radiação ionizante é o fator de risco mais prevalente nas leucemias pediátricas e entre adultos jovens. Em crianças, tal exposição pode se dar no período pré-natal e/ou pós-natal. Outros fatores predisponentes à LLA são pesticidas, certos solventes e alguns vírus como o Epstein-Barr e o HIV. Uma minoria dos casos de LLA está associada a síndromes genéticas como a síndrome de Down, a anemia de Fanconi e síndrome de Bloom (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

O principal tratamento para a LLA pediátrica e adulta é a quimioterapia multiagente com vincristina, corticosteróides e antraciclina seguida pelo transplante de células-tronco hematopoiéticas para pacientes elegíveis. Pacientes idosos podem apresentar um mal prognóstico por serem muitas vezes intolerantes ao tratamento quimioterápico (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Para a LLA redicivante ou refratária, novas terapias incluem os anticorpos monoclonais Blinatumomab e Inotuzumab Ozogamicina (InO), utilizados em adultos e células T receptoras de antígenos quiméricos (CAR-T), empregadas em crianças e jovens adultos. Podem também ser utilizados imunomoduladores e fármacos visando a supressão da proliferação celular (COCCARO et al., 2019).

A taxa de sobrevida de cinco anos entre crianças é de 90% e declina até atingir menos de 30% em pessoas acima de 60 anos de idade. Nos últimos 60 anos, a sobrevida livre de eventos em cinco anos aumentou de 10 para 90% entre crianças, graças aos novos medicamentos e à terapia personalizada adaptada ao risco, que considera idade, contagem de leucócitos e resposta à quimioterapia. Mas a recaída ocorre em cerca de 20% e 50% entre crianças e adultos respectivamente, com alta taxa de quimiorresistência, falha no tratamento e morte. A estratificação de risco, e a identificação de alterações genéticas tem auxiliado na escolha da terapia mais adequada (COCCARO et al., 2019; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017)

2.2.4 Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)

A LLC é uma doença linfoproliferativa caracterizada pela proliferação de células maduras B CD5+CD23+ e acúmulo de pequenos linfócitos neoplásicos no sangue, tecidos linfoides secundários e medula óssea (BOSCH; DALLA-FAVERA, 2019; ZHANG; KIPPS et al., 2017). Como resultado, encontram-se linfocitose, infiltração de células leucêmicas na medula, linfadenopatia e esplenomegalia. Ao alojarem-se nos tecidos linfóides, criam um microambiente no qual recebem sinais de sobrevivência de células acessórias como células estromais não malignas e formam “centros de proliferação”. Em 80% dos pacientes, observam-se pelo menos uma alteração cromossômica dentre as quatro seguintes: (del(13q)), del(11q), del(17p) e trissomia 12. A Del(13q) afeta mais de 50% dos pacientes e está associada a prognóstico favorável (KIPPS et al., 2017).

Dentre as causas, destacam-se fatores genéticos. O risco de desenvolver LLC aumenta em 9 vezes para parentes de pacientes sendo proporcional ao grau de parentesco. A exposição de veteranos de guerra ao agente laranja e a exposição a inseticidas são admitidos como fatores predisponentes e, com menos evidências, a exposição à radiação ionizante e infecções virais (KIPPS et al., 2017). É o tipo de leucemia mais comum entre os adultos. Possui maior prevalência nos Estados Unidos e na Europa e é menos frequente na África, Ásia e Caribe, provavelmente por fatores genéticos (BOSCH; DALLA-FAVERA, 2019). Afeta quase exclusivamente pessoas acima de 40 anos e é mais comum em homens do que em mulheres sendo 70 anos a idade mediana do diagnóstico (JULIUSSON; HOUGH, 2016; KIPPS et al., 2017)

A LLC não possui cura e seu curso clínico é heterogêneo. Alguns pacientes necessitam de tratamento imediato ao diagnóstico, enquanto outros não necessitarão de terapia por muitos anos, havendo casos em que nunca será necessária a terapia (KIPPS et al., 2017). A decisão do tipo de tratamento depende do estágio da doença, alterações genômicas, idade do paciente, presença de comorbidades e do tempo de duplicação dos linfócitos. O tratamento envolve quimioterapia, quimioimunoterapia e/ou medicamentos direcionados a B sinalização do receptor celular ou inibidores da apoptose, como BCL-2 (BOSCH; DALLA-FAVERA, 2019; KIPPS et al., 2017).

2.3 MORTE CELULAR

Historicamente, a morte celular tem sido dividida em três grupos, de acordo com suas características morfológicas e com a maneira pela qual os fragmentos celulares restantes são descartados. São eles a apoptose, a autofagia e a necrose. As características distintivas da apoptose são o encolhimento citoplasmático, a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear, o *blebbing* e a formação de pequenas vesículas denominadas corpos apoptóticos. A autofagia caracteriza-se por extensa vacuolização citoplasmática. Ambos os tipos de morte culminam com a captação fagocitária dos restos celulares e sua consequente degradação lisossomal. A necrose não exhibe tais características distintivas e não há envolvimento fagocítico e lisossomal obvio no descarte dos fragmentos celulares resultantes (GALUZZI et al., 2018).

Atualmente, a morte celular é também classificada e definida de acordo com características genéticas, bioquímicas, farmacológicas e funcionais. Dentro dessa classificação, a morte celular pode ser acidental ou regulada. A morte celular acidental é rápida e catastrófica, como resultado de uma agressão intensa como alta temperatura e pressão, variação extrema de pH ou injúrias mecânicas. Em contraste, a morte celular regulada ocorre para manter a homeostase de organismos multicelulares em condições fisiológicas ou patológicas. Em condições fisiológicas, recebe também o nome de morte celular programada e ocorre sem qualquer perturbação exógena. Em condições patológicas, é provocada por uma perturbação prolongada ou intensa no microambiente intra ou extracelular que supera a capacidade adaptativa da célula. A morte celular programada envolve a ativação de uma ou mais vias de sinalização e, dessa forma, pode ser modulada farmacologicamente ou geneticamente, para ser retardada ou acelerada. Quando células ou alguns tipos de organismos unicelulares sofrem morte celular regulada, eles expõem ou liberam moléculas que alertam o organismo ou a colônia sobre um perigo em potencial (GALUZZI et al., 2018).

2.3.1 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular regulada que possui como marca registrada a execução por proteases dirigidas por aspartato dependentes de cisteína ou caspases, enzimas da família das cisteínopeptidases. Em humanos, as caspases 2, 8, 9 e 10 são iniciadoras da apoptose, enquanto as caspase 3, 6 e 7 são efetoras (ABBAS; LARISCH, 2021; FOGARTY; BERGMANN; 2017; GALUZZI et al., 2018).

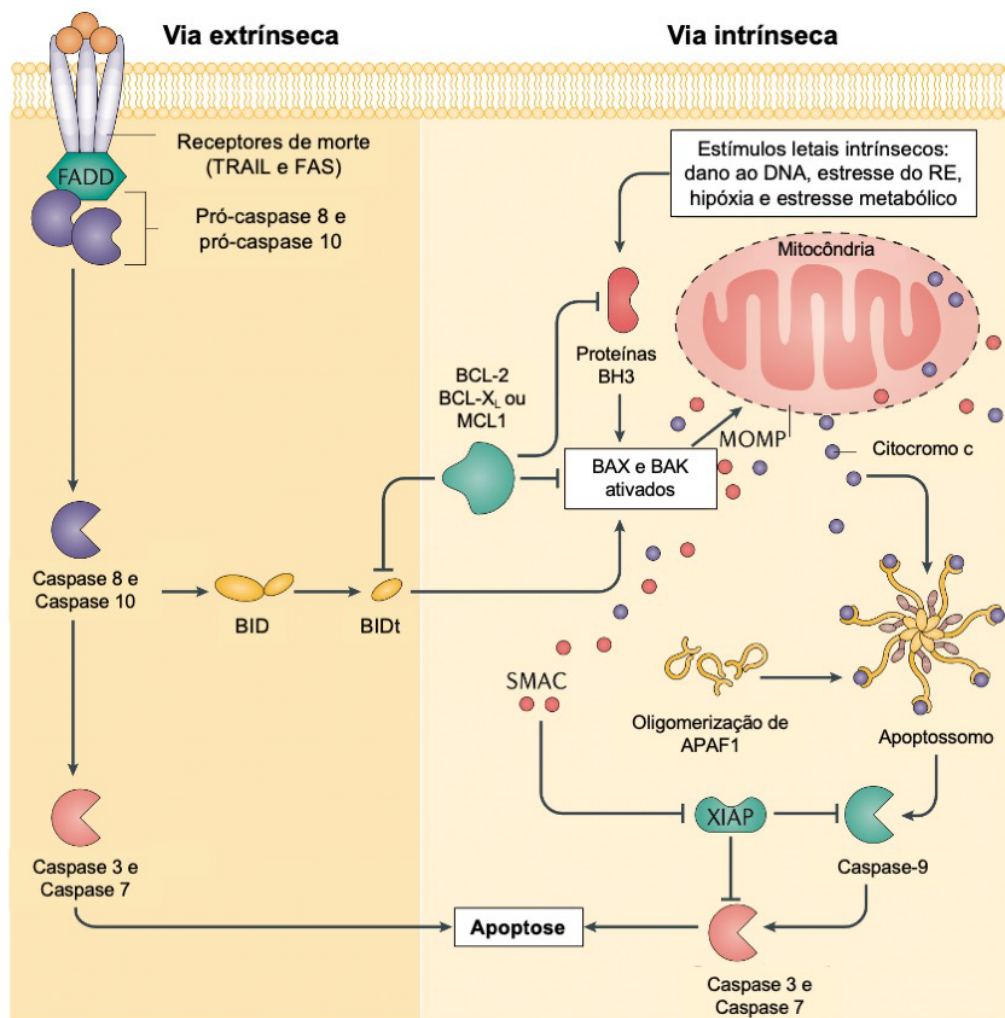
A **Figura 1** ilustra as vias de sinalização da apoptose. A apoptose extrínseca é iniciada por perturbações no ambiente extracelular. Ligantes indutores de apoptose ligam-se a receptores de morte da membrana plasmática, dentre os quais encontram-se o receptor de ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAILr) e o FAS. A caspase 8 propaga o sinal de morte celular que é precipitado por caspases executoras, principalmente a caspase 3 (GALUZZI et al., 2018; MCCOMB et al., 2019).

A apoptose intrínseca, também conhecida como via mitocondrial da apoptose, inicia-se por perturbações do microambiente extracelular ou intracelular. Seu passo crítico é a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), processo irreversível e disseminado controlado por proteínas pró e anti-apoptóticas da família BCL-2. Dentre os membros pró-apoptóticos da família BCL-2, destacam-se a proteína X associada a Bcl-2 (BAX) e o antagonista de assassinos Bcl-2 do tipo 1 (BAK). BAX e BAK tem a capacidade de formar poros na membrana mitocondrial. Estímulos letais intracelulares, como dano ao DNA, ativam as proteínas BH3 que propagam o sinal de morte para as proteínas BAX e BAK resultando na permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP). A MOMP leva à liberação de citocromo c e do segundo ativador mitocondrial de caspase (SMAC) no citosol. O citocromo c interage com o fator de ativação da peptidase apoptótica 1 (APAF1), desencadeando a montagem do apoptossoma, que ativa a caspase-9 que propaga o sinal de morte para as caspases 3, que executa a apoptose. O SMAC bloqueia a ação do inibidor de caspases XIAP. Como antagônicas às proteínas BH3, encontram-se as proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, a saber, a proteína do linfoma de células B2, a proteína Bcl-2 relacionada à forma longa de Bcl-x e a proteína de diferenciação de células de leucemia mielóide induzida Mcl 1, mais conhecidas como BCL-2, BCL-XL e MCL1, respectivamente (ABBAS; LARISCH, 2021; GALUZZI et al., 2018; ICHIM; TAIT, 2016).

As vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose se intercomunicam por meio do agonista da morte no domínio que interage com BH3 truncado (BIDt) resultante da clivagem pela caspase-8. O BIDt ativa as proteínas BAX e BAK (ICHIM; TAIT, 2016).

A ausência e a desregulação da apoptose são fatores chave da oncogênese e limitam a eficácia da quimioterapia e de outros tratamentos contra o câncer (ABBAS; LARISCH, 2021; MCCOMB et al., 2019)

Figura 1 - Visão geral das vias de sinalização da apoptose extrínseca e intrínseca



Fonte: ICHIM; TAIT, 2016 (Modificado).

2.4 CICLO CELULAR

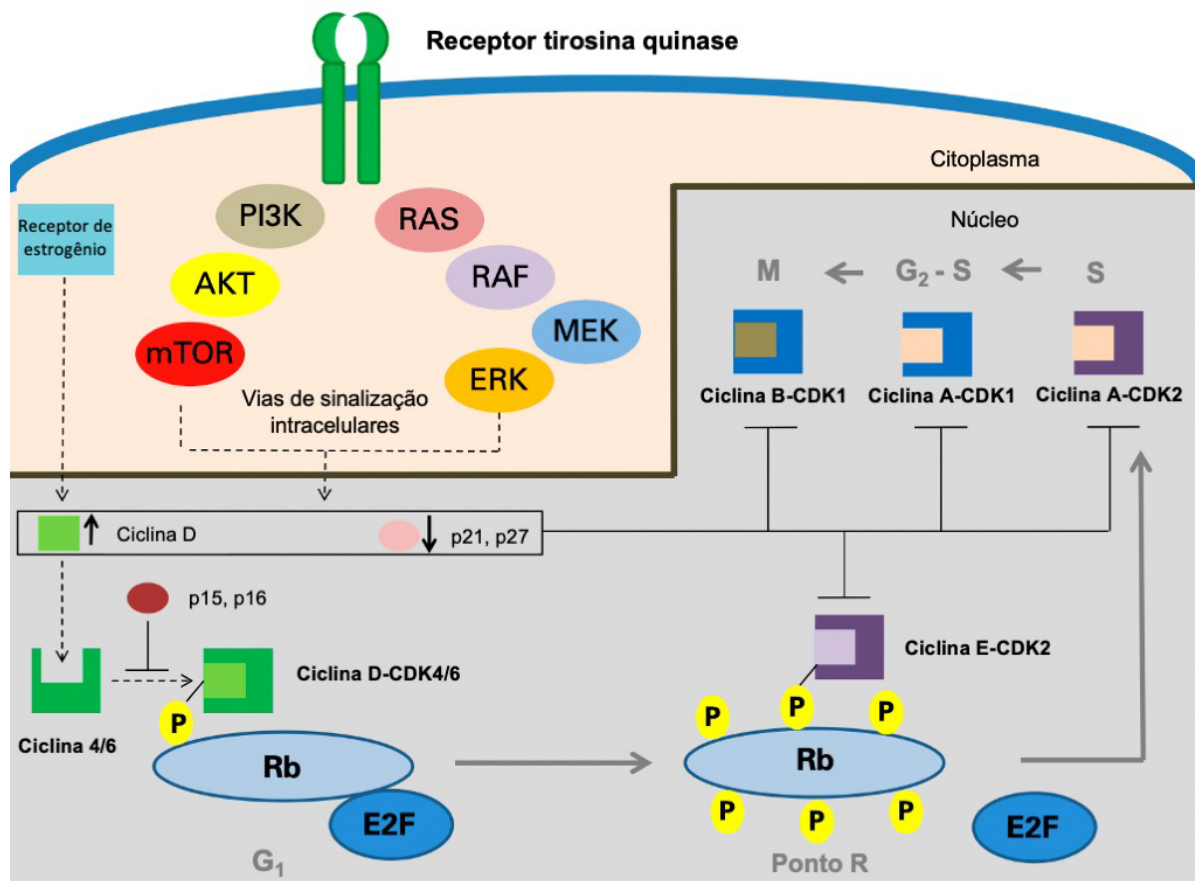
O ciclo celular é um processo irreversível que compreende uma série de etapas que resultam na divisão de uma célula em duas células filhas com conjuntos idênticos de cromossomos e partes aproximadamente iguais de componentes celulares. Nas células eucarióticas proliferativas, o ciclo celular divide-se em três períodos, sendo eles a intérfase, a mitose e a citocinese (INGHAM & SCHWARTZ, 2017; ICARD, 2019). A intérfase representa geralmente cerca de 90% do tempo total do ciclo celular e ocorre em três fases: G1, S e G2. Na fase G1, fase de crescimento, as células sintetizam proteínas e se preparam para a replicação do DNA. Esta fase é a mais longa do ciclo e cuja duração mais varia. Na fase G1 é também determinado se as células irão crescer e dividir-se ou se entrarão em quiescência. Na fase S, ocorre a replicação do DNA. Na fase G2, há aumento da síntese lipídica para formação da membrana e preparo para a mitose (ICARD, 2019). A fase M é um período breve no qual ocorre a divisão do material genético e a citocinese. Os principais eventos são a montagem do fuso dos cromossomos, seguida da segregação cromossomal e divisão nuclear. Divide-se em três subfases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, sendo essa última imediatamente seguida da divisão celular, que divide núcleos, citoplasma, organelas e a membrana celular, resultando em duas células filhas. (INGHAM & SCHWARTZ, 2017).

O ciclo celular é regulado por ciclinas que atuam em associação com quinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs são serina/treonina quinases que, fisicamente associadas às ciclinas, fosforilam proteínas intracelulares importantes na progressão ordenada do ciclo celular. Duas famílias de inibidores regulam a atividade das CDKs. A família INK4 compreende os inibidores p16, p15, p18 e p19 que se ligam especificamente à CDK4 e CDK6. A família WAF1/CIP/KIP compreende os inibidores p21, p27 e p57, que inibem os demais CDKs. No câncer, alterações genéticas resultam em regulação positiva dos complexos ciclinas-CDKs, levando a progressão descontrolada do ciclo celular e mitose (ICARD, 2019).

A **Figura 2** apresenta a visão clássica do ciclo celular e sua regulação por ciclinas. Vias de sinalização mitogênicas induzem ao aumento dos níveis de ciclina D que se complexa com as ciclinas dependentes de quinase (CDKs) 4 e 6 e então hiperfosforilam a proteína retinoblastoma (Rb) durante G1. A Rb hiperfosforilada é preparada para hiperfosforilação por complexos de ciclina E-CDK2, o que resulta na

liberação de fatores de transcrição E2F que são críticos para a entrada na fase S. Os estágios posteriores do ciclo celular S, G2 e M estão sob o controle de vários outros complexos ciclina-CDK e não são mais responsivos à influência extracelular. O complexo ciclina A-CDK2 conduz à progressão da fase S, o complexo ciclina A-CDK1 conduz à progressão da fase G2 e o complexo ciclina B-CDK1 regula a progressão da fase G2 tardia até a saída da mitose. As proteínas p15 e p16 inibem a atividade da ciclina D-CDK4/6 enquanto as proteínas p21 e p27, inibem os demais complexos ciclina-CDK nos estágios posteriores do ciclo celular (INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

Figura 2 - Visão clássica do ciclo celular



Fonte: INGHAM; SCHWARTZ, 2017 (Modificado).

2.5 INIBIDORES DE PEPTIDASE E CÂNCER

Os inibidores de peptidase são moléculas regulatórias encontradas em plantas, tecidos e fluidos animais e em microrganismos, onde controlam a atividade de peptidases alvo. São mais comumente estudados em plantas, onde são encontrados principalmente nas folhas e sementes, como forma de defesa contra o estresse proveniente de ataque de pragas e patógenos. Podem ser de natureza proteica ou pequenas moléculas e seus análogos (COTABARREN et al., 2019; EATEMADI et al., 2017; RAMOS et al., 2012). Os inibidores de peptidase de natureza proteica são peptídeos com cerca de 15 a 60 resíduos de aminoácidos e alto teor de resíduos de cisteína formando ligações dissulfeto que lhes conferem estabilidade ao calor, à variação de pH, a forças iônicas extremas e à proteólise. Classificam-se de acordo com o sítio catalítico da enzima alvo, sendo serínicos, cisteínicos, aspárticos e inibidores de metalopeptidases. Não foram encontrados inibidores de peptidases treonínicos ou glutâmicos em plantas (COTABARREN et al., 2019).

Os inibidores de peptidase serínicos são os mais encontrados no reino vegetal em diversas espécies, principalmente nas famílias *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Poaceae* e *Cucurbitaceae*. No reino vegetal, são divididos em mais de 20 famílias, dentre as quais encontram-se *Kunitz*, *Bowman-Birk*; Batata I e Batata II e a superfamília de abóbora, abobrinha e cereais. Estas famílias diferem quanto ao peso molecular, teor de ligação dissulfeto, estrutura tridimensional e estabilidade ao calor e a agentes desnaturantes, sendo que a maioria dos inibidores físico-quimicamente estáveis pertencem às famílias *Kunitz* e *Bowman-Birk* (COTABARREN et al., 2020; MACEDO et al., 2007).

Os inibidores vegetais da família *Kunitz* possuem massa molecular de 18-24 kDa, geralmente quatro resíduos de cisteína formando duas ligações dissulfeto, uma ou duas cadeias polipeptídicas e um único sítio de ligação a proteínas (COTABARREN et al., 2020). São encontrados principalmente em sementes de leguminosas. Inibem a tripsina, a quimotripsina ou ambas as enzimas (MACEDO et al., 2016). As tripsinas atuam na inflamação, aterosclerose e carcinogênese (EATEMADI et al., 2017). Os inibidores de peptidase da família *Kunitz* possuem diversos mecanismos de ação anticâncer. Podem suprimir a carcinogênese nos estágios de iniciação, promoção e progressão tumoral, inclusive afetando a expressão de certos oncogenes. Suas ações incluem indução à apoptose com ativação de

caspases e liberação de citocromo C no citosol, parada do ciclo celular com inibição de ciclina D1 e aumento de p21, inibidor do ciclo celular. Também podem inibir a invasão por redução de integrinas e a angiogênese por redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Pode também haver a inibição da expressão de genes envolvidos na carcinogênese como as calpaínas relacionadas à migração e invasão. Alguns inibidores de peptidase do tipo *Kunitz*, tem sua atividade anticâncer demonstrada em estudos de citotoxicidade, porém sem descrição de seu mecanismo de ação (BONTURI et al., 2018; BORGES, 2008; FERREIRA et al., 2013; GABRIEL DE SOUZA et al., 2016; KARRAY et al., 2020; LYU et al., 2018; RAKASHANDA; AMIM, 2013).

A busca por produtos naturais de importância farmacológica foi o meio tradicional pelo qual a maioria dos inibidores de peptidase foram descobertos até hoje. Estimam-se que entre os inibidores de peptidase clinicamente aprovados para tratamentos de diversas doenças, 62% estejam diretamente relacionados a produtos naturais. Um exemplo é o desenvolvimento de inibidores de protease aspárticos visando a protease do HIV, para o controle da AIDS, como o Darunavir. Outro exemplo é o captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina inspirado em um peptídeo do veneno de jararaca (AL-AWADHI; LUESCH, 2020). Atualmente, os inibidores de proteassoma bortezomibe, carfilzomibe e ixazomibe e o inibidor de uroquinase mesupron são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) no tratamento do câncer e outros tem sido estudados (HU et al., 2019).

2.6 Inga laurina TRYPSIN INHIBITOR (ILTI)

I. laurina, conhecida no Brasil como ingá branco, é uma árvore tropical pertencente à subfamília Mimosoideae amplamente distribuída na América Central e na América do Sul. Normalmente plantada como árvore de sombra em ambientes urbanos, seu fruto é comestível e suas sementes são dispersas por pássaros (MACEDO et al., 2007, 2016). As sementes de *I. laurina* possuem um inibidor de peptidase serínico da família *Kunitz* denominado *I. laurina trypsin inhibitor* (ILTI). Sua massa molecular é de 19,8 kDa e sua cadeia polipeptídica única contém 180 resíduos de aminoácidos. Diferente de outros inibidores serínicos da família *Kunitz* purificados

a partir de espécies Mimosoideae, possui apenas uma ligação dissulfeto (MACEDO et al., 2007).

O ILTI é estável em ampla faixa de temperatura e pH. Possui uma substituição no resíduo 64 de seu sítio reativo (Arg → Lys) que promove a inibição da tripsina de acordo com a família de inibidores do tipo *Kunitz*. Sua constante de inibição (K_i) é de 6×10^{-9} M para tripsina bovina, o que demonstra uma alta afinidade do inibidor para com a enzima. Não possui atividade contra quimotripsina, papaína e alfa-amilase. O mecanismo de inibição do ILTI é do tipo competitivo assim como outros inibidores *Kunitz* (MACEDO et al., 2007, 2011). O ILTI possui também efeitos inibitórios no crescimento de larvas de inseto, fungos e biofilmes. Em testes *in vitro*, verificou-se potencial atividade antitumoral do ILTI recombinante expresso em levedura de *Komagataella phaffii* contra células de tumor de ascite de *Ehrlich* (EAT). Entretanto, desconhecem-se as características moleculares que regulam sua atividade antitumoral (CARNEIRO et al., 2018b; MACEDO et al., 2007, 2011, 2016). Portanto, fazem-se necessários estudos que objetivem não apenas a verificação da atividade antitumoral do ILTI em células neoplásicas humanas, mas também a descrição de seu mecanismo de ação antitumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anticâncer do inibidor de tripsina de sementes de *Inga laurina* (ILTI) contra linhagens celulares de leucemias humanas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir curvas de citotoxicidade do ILTI contra cinco linhagens celulares: Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 e K-562;
- Determinar o IC_{50} e o $Emax$ do ILTI contra as cinco linhagens avaliadas;
- Verificar o mecanismo de morte celular promovido por ILTI.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DA AMOSTRA DE *Inga laurina* TRYPSIN INHIBITOR (ILTI)

A amostra-teste de ILTI foi cedida pelo Laboratório de Purificação de Proteínas e Suas Funções Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Foi preparada de acordo com metodologia de Macedo et al., 2007. Sementes de *I. laurina* isentas de tegumento e desengorduradas com hexano foram moídas em moinho de café. Para a obtenção do extrato bruto, a farinha obtida foi extraída com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 (1:10, p/v) por 2 h a 25 °C com posterior centrifugação a 7500 G por 30 min. O sobrenadante foi fracionado por precipitação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em três frações, correspondendo a 30%, 60% e 80% de saturação. As três frações foram dialisadas contra água destilada por 24 h a 4°C e liofilizadas. A fração II, correspondente a 30 - 60% de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi selecionada para purificação adicional por conter a maior atividade inibitória. A fração II liofilizada foi dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e aplicada a uma coluna DEAE-Sephrose (2 · 20 cm) equilibrada no mesmo tampão e eluída com um gradiente linear de NaCl (0-1M) no mesmo tampão. As proteínas foram detectadas monitorando a absorvância em 280 nm (MACEDO et al., 2007).

Os teores de proteína foram determinados por coloração com azul de Coomassie (método de ligação de corante) (BRADFORD, 1976) a partir da absorbância a 280 nm. Albumina sérica bovina (1 mg/mL) foi usada como padrão.

A amostra foi diluída em água de miliQ na concentração de 50,5 µM. Foi homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante filtrado em filtro estéril de diâmetro 4 mm e poro 0,22 µm. A amostra foi então armazenada em freezer a -18°C até o momento da utilização.

4.2 CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas cinco linhagens celulares, a saber Raji (ATCC® CCL-86™), CCRF-CEM [CCRF CEM] (ATCC® CCL-119™), KG-1 (ATCC® CRL-8031™), Kasumi-1 (ATCC® CRL-2724™) e K-562 (ATCC® CCL-243™). As linhagens celulares foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ou em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) contendo soro fetal bovino (SFB), 10%, L-glutamina, 2 mM, penicilina, 100 µg/mL e sulfato de estreptomicina, 100 µg/mL e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo atmosfera com 5% de CO₂.

4.3 VIABILIDADE DE CÉLULAS LEUCÊMICAS EXPOSTAS AO ILTI

O ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foi realizado para avaliar o efeito citotóxico do ILTI, em alta e baixa concentração, nas células KG-1, Kasumi-1 e K-562. O MTT, de coloração amarela, é metabolizado pela mitocôndria de células viáveis em cristais de formazan E,Z-1-(4,5-dimetiliazol-2-il)-1,3-difenilformazan, de cor roxa, permitindo a quantificação da atividade celular em espectrofotômetro (MOSMAN, 1983).

As células foram mantidas por 24 h em estufa úmida (37°C, 5% de CO₂), em placa de 96 poços, contendo volume final de 100 µL (2×10^5 células/mL), com ILTI nas concentrações de 0,5 e 5 µM. Os controles utilizados foram o controle não tratado (apenas células e meio de cultura), controle com triton-X 100 a 1% e branco (apenas meio de cultura). A concentração do formazan formado foi medida pela absorbância a 570 nm em leitor de microplacas *Spectramax* 190 (*Molecular Devices*). Os dados foram normalizados em relação ao controle (100%)

Os dados foram analisados no software *Graphpad Prism*® e estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes com três replicatas biológicas cada. Para se determinar diferenças estatísticas entre as amostras tratadas e o controle não tratado, foi utilizado o **teste de Dunnett** ($p \leq 0,05$).

Este ensaio foi realizado como uma triagem para se decidir quais concentrações máximas de ILTI utilizar na elaboração das curvas de citotoxicidade dos ensaios subsequentes.

4.4. CURVAS DE CITOTOXICIDADE DO ILTI

4.4.1 Linhagens leucêmicas

As curvas de citotoxicidade foram elaboradas utilizando-se o método de viabilidade celular por resazurina (NOCIARI, 1998) nas células Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 e K-562. O método da resazurina é semelhante ao MTT. A 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido (resazurina), de cor azul, é reduzida a 7-hidroxi-3H-enoxazina-3-ona (resorufina), um composto altamente fluorescente de cor rosa, pelas mitocôndrias de células metabolicamente saudáveis.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços contendo volume final de 100 μ L (2×10^5 células/mL). Foram aplicados tratamentos com ILTI nas concentrações de 0,005, 0,015, 0,035, 0,05, 0,25 e 0,5 μ M para a linhagem Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 e de 0,05, 0,15, 0,25, 0,35, 0,5 μ M para a linhagem K-562. As células foram então mantidas por 24 h em estufa úmida a 37 °C contendo 5% de CO₂. Os controles utilizados foram controle não tratado, controle triton-X 100 a 1% e branco (apenas meio de cultura). Após 24 h, as células foram coradas com resazurina e mantidas na estufa por mais 4 h. A absorbância de resorufina formada foi medida a λ Ex. 570 nm e λ Em. 600 nm em leitor de microplacas *Spectramax 190* (*Molecular Devices*). Os dados foram normalizados em relação ao controle (100%).

Os cálculos de IC₅₀ e Em_{ax} foram realizados no software *Graphpad Prism*.[®]

Os dados foram analisados no software *Graphpad Prism*.[®] e estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos dois experimentos independentes com três replicatas biológicas cada.

4.4.2 Células mononucleares do sangue periférico humano

As células mononucleares do sangue periférico humano foram obtidas de doadores saudáveis e não fumantes, após consentimento livre e esclarecido com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (ANEXO). Coletou-se, em tubo heparinizado, o sangue de três doadores saudáveis e não fumantes que não haviam recebido nenhum medicamento por pelo menos 15 dias antes da coleta. As células foram isoladas pelo método padrão de centrifugação de densidade-gradiente *Ficoll-Hypaque* (*Sigma-Aldrich*) e contadas em câmara de *Neubauer*. A viabilidade celular foi determinada por método de exclusão com azul de tripano, considerando própria para uso a viabilidade acima de 98%.

As células mononucleares foram diluídas em meio de cultura RPMI 1640 e distribuídas em placas de 96 poços contendo volume final de 100 μ L (2×10^5 células/mL). Foram aplicados tratamentos com ILTI nas concentrações de 0,05, 0,075, 0,150, 0,250, 0,350, 0,5 μ M e as células foram mantidas por 24 h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Os controles utilizados foram controle positivo triton-X 100 a 1% e controle negativo (células sem tratamento) e branco (apenas meio de cultura). Após as 24 h, as células foram coradas com resazurina e mantidas na estufa por mais 4 h. A concentração de resorufina formada foi medida a 570 nm e 600 nm em leitor de microplacas *Spectramax 190* (*Molecular Devices*). Os dados foram normalizados em relação ao controle (100%).

Os dados foram analisados no software *Graphpad Prism*[®] e estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes com três replicatas biológicas cada.

4.5 VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO ILTI

Os efeitos citotóxicos do ILTI foram verificados com o iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo. O PI liga-se aos ácidos nucleicos de células que possuam dano na membrana celular e indica que a célula está em processo de morte celular. É excitado pela luz azul e emite fluorescência vermelha. É um marcador de viabilidade

celular muito utilizado para diferenciar e excluir células não viáveis nas análises citométricas de fluxo (ADAN et al., 2016), por isso foi o fluoróculo de escolha para iniciar os testes de morte celular.

As células K-562 foram distribuídas em placas de 96 poços contendo volume final de 100 μL (10^5 células/mL). Foram aplicados tratamentos com ILTI nas concentrações de 0,005, 0,025, 0,05, 0,075, 0,15, 0,25, 0,35 μM e as células foram mantidas por 24 h em estufa úmida a 37 °C contendo 5% de CO_2 . Os controles utilizados foram controle não tratado e células sem marcação para ajustes do citômetro. Após as 24 h, as células foram centrifugadas a 49 G por 5 minutos, suspensas em solução salina equilibrada de *Hank* (HBSS), pH 7,2 e coradas com PI, exceto o controle sem marcação. Foram então deixadas em repouso por 30 min a 25 °C, ao abrigo da luz e então lavadas com HBSS e ressuspensas na mesma solução. A aquisição de dados foi realizada no canal FL-3 do citômetro de fluxo *Cytoflex S* (Beckman Coulter), com coleta de 10.000 eventos por amostra.

Os dados foram analisados no *software FlowJo*[®] e representam a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes com três replicatas biológicas cada.

4.6 AVALIAÇÃO DE EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR

A dupla marcação das amostras com anexina-V-FITC e iodeto de propídio (PI) foi realizada para diferenciar a apoptose da necrose por citometria de fluxo. Na fase inicial da apoptose, as células externalizam a fosfatidilserina. A anexina V conjugada ao fluoróculo isotiocianato de fluoresceína (FITC) liga-se à fosfatidilserina de forma Ca^{2+} dependente e emite fluorescência, permitindo a determinação por citometria de fluxo das células que estão em apoptose. O iodeto de propídio (PI) só é internalizado em células que apresentam ruptura da membrana e marca o DNA celular, permitindo a análise de células em necrose. Dessa forma, apoptose tardia representa as células que sofreram externalização da fosfatidilserina e permeabilização da membrana, marcadas duplamente (Anx +/PI +). A apoptose inicial representa células em que houve apenas a externalização da fosfatidilserina, marcadas apenas com a anexina-V-FITC (Anx +/- PI -). Já para a necrose, ocorre apenas a permeabilização da

membrana e as células são marcadas apenas com o PI (Anx -/ PI +). Células viáveis são negativas para ambos os fluorócoros (Anx -/PI-).

As células K-562 foram semeadas em placas de 96 poços (10^5 células/mL) e volume final de 200 μ L. Foram tratadas com ILTI na concentração de 0,07 μ M, equivalente ao IC₅₀, por 12 e por 24 h. Os controles utilizados foram controle não tratado e células sem marcação para ajustes do citômetro. Foram então coletadas e ressuspensas em 200 μ L de tampão anexina e incubadas com 1 μ L de anexina V-FITC (Becton Dickinson, USA) e 1 μ L de PI por 30 min a 25 °C, ao abrigo da luz. A aquisição de dados foi realizada no canal FL-1 e FL-3 do citômetro de fluxo *Cytoflex S* (Beckman Coulter), com coleta de 10.000 eventos por amostra.

Os dados foram analisados no *software FlowJo*[®] e estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, com três replicatas biológicas cada. Foi utilizado o teste t *Student* para diferenças entre amostras tratadas e não tratadas e entre os tempos de tratamento ($p \leq 0,05$).

4.7 AVALIAÇÃO DA CASPASE-3 ATIVA

O anticorpo PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 (BD PharmingenTM) foi utilizado para a quantificação da caspase-3 ativa, importante marcador de apoptose, na linhagem K-562, por citometria de fluxo. O anticorpo PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 conjugado a um fluoróforo denominado ficoeritrina (PE) faz uma ligação covalente e irreversível ao sítio ativo da caspase-3 ativa com emissão de fluorescência que é captada pelo citômetro de fluxo.

As células K-562 foram distribuídas em placas de 24 poços (10^5 células/mL). Foram tratadas com ILTI na concentração correspondente ao IC₅₀, de 0,07 μ M e incubadas por 12 e por 24 horas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Os controles utilizados foram controle não tratado e células sem marcação para ajustes do citômetro. Em seguida, as células foram fixadas com tampão de fixação e permeabilização (BD Cytofix/Cytoperm) com o qual foram mantidas a 4° C por 20 minutos. Foram então lavadas com o tampão BD Perm/Wash e reveladas com o anticorpo PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 (BD PharmingenTM), com o qual foram mantidas a 4° C por 30 minutos ao abrigo da luz. A aquisição de dados foi realizada

no canal FL-2 do citômetro de fluxo *Cytoflex S* (Beckman Coulter) com coleta de 10.000 eventos por amostra.

Os dados foram analisados no *software FlowJo*[®] e estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, com três replicatas biológicas cada. Foi utilizado o teste t *Student* para diferenças entre amostras tratadas e não tratadas e entre os tempos de tratamento ($p \leq 0,05$).

4.8 AVALIAÇÃO DE PARADA DE CICLO CELULAR

O iodeto de propídio foi utilizado para análise do ciclo celular de células K-562 por citometria de fluxo. A marcação com iodeto de propídio (PI) é utilizada na citometria de fluxo para distinguir a fase G0 da G1 do ciclo celular.

As células K-562 foram distribuídas em placas de 12 poços (10^5 células/mL). Foram tratadas com ILTI na concentração correspondente ao IC₅₀, de 0,07 μ M e incubadas por 24 horas em estufa úmida a 37 °C contendo 5% de CO₂. Os controles utilizados foram controle não tratado e células sem marcação para ajustes do citômetro. Após este período, foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS), e centrifugadas a 49 G por 5 minutos. Foram adicionados 50 μ L de solução de lise (Triton X-100 0,1%; EDTA 0,1mM; RNase 50 μ g/mL; iodeto de propídio, diluídos 1 vez no PBS gelado). As células foram mantidas com a solução de lise a 4° C e ao abrigo da luz por 30 minutos. Foram então novamente lavadas com PBS e centrifugadas a 49 G por 5 minutos. A aquisição de dados foi realizada no canal FL-2 do citômetro de fluxo *Cytoflex S* (Beckman Coulter) com coleta de 40.000 eventos por amostra.

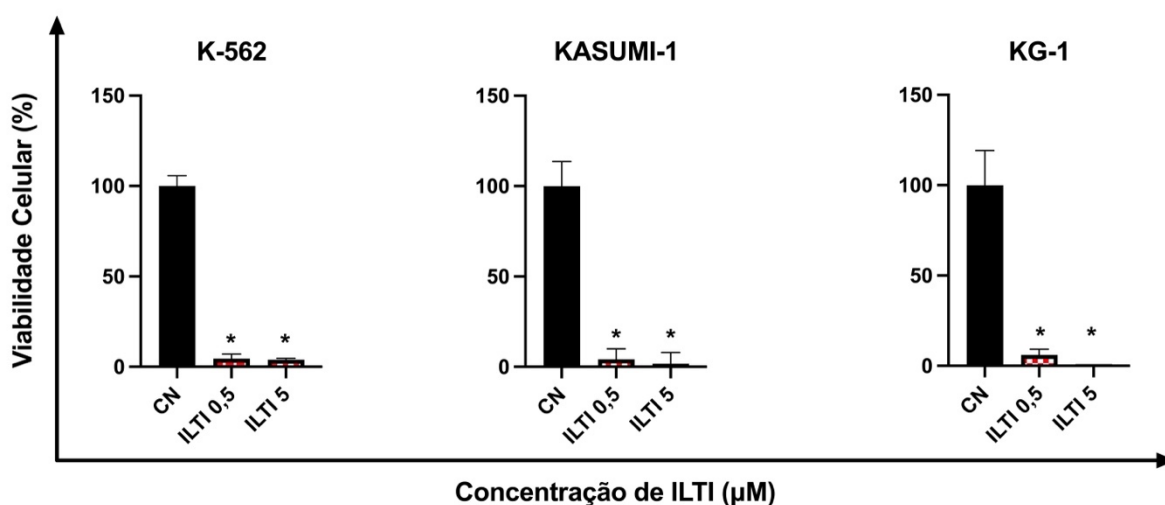
Os dados foram analisados no *software FlowJo*[®] e estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, com três replicatas biológicas cada. Foi utilizado o teste t *Student* para diferenças entre amostras tratadas e não tratadas ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE DE CÉLULAS LEUCÊMICAS EXPOSTAS AO ILTI

O ILTI reduziu a viabilidade de células K-562, Kasumi-1 e KG-1, em ambas as concentrações (0,5 e 5 μ M) após 24 h, no ensaio de MTT, em relação ao controle não tratado ($p \leq 0,0001$) (**Figura 3**). Os valores de viabilidade celular obtidos estão disponíveis no APÊNDICE.

Figura 3 - Efeito citotóxico do inibidor de peptidase ILTI em células leucêmicas. As células $2 \times 10^5/\text{mL}$ foram tratadas com o ILTI a 0,5 e 5 μ M por 24 h. A viabilidade foi verificada pelo ensaio MTT. CN: controle não tratado do teste. ILTI 0,5: células tratadas com ILTI na concentração final de 0,5 μ M. ILTI 5: células tratadas com ILTI na concentração final de 5 μ M. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão de 2 experimentos com 3 replicatas biológicas. Diferenças entre amostras tratadas e não tratadas (*) foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ obtidos pelo teste de *Dunnett*.

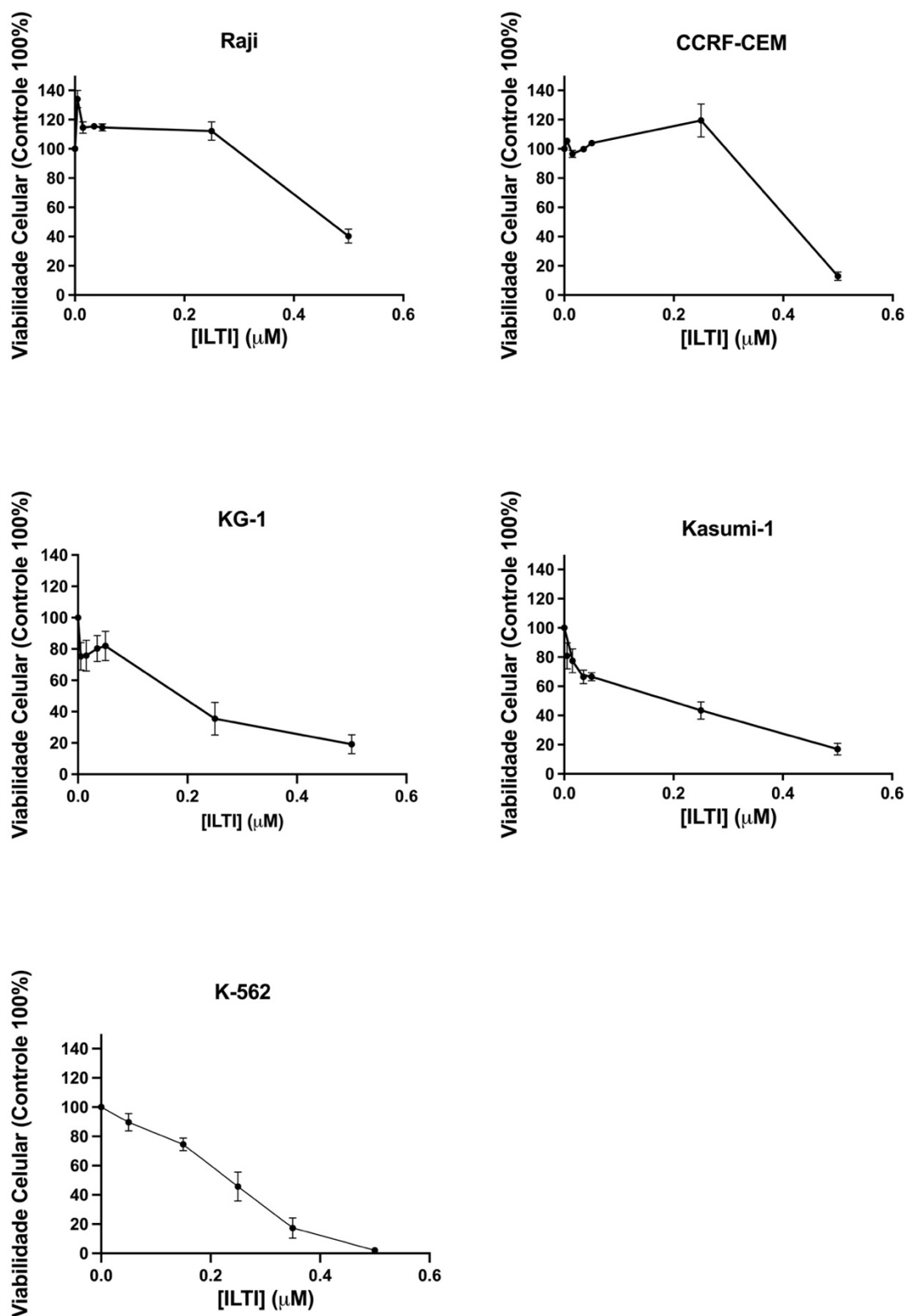


5.2 CURVAS DE CITOTOXICIDADE DO ILTI

5.2.1 Linhagens leucêmicas

O ILTI exerceu efeito citotóxico nas cinco linhagens celulares testadas (**Figura 4**). Os valores de IC_{50} e E_{max} das linhagens testadas estão disponíveis no APÊNDICE. A atividade foi medida pelo método com resazurina. Na linhagem Raji, o ILTI apresentou menor atividade, com um IC_{50} maior que $0,5 \mu M$ e um efeito máximo (E_{max}) de $59,73 \pm 4,74 \%$. A linhagem K-562 foi aquela em que o ILTI apresentou maior atividade, com um IC_{50} de $0,6 \pm 0,0181 \mu M$ e um E_{max} de $96,35 \pm 1,36 \%$.

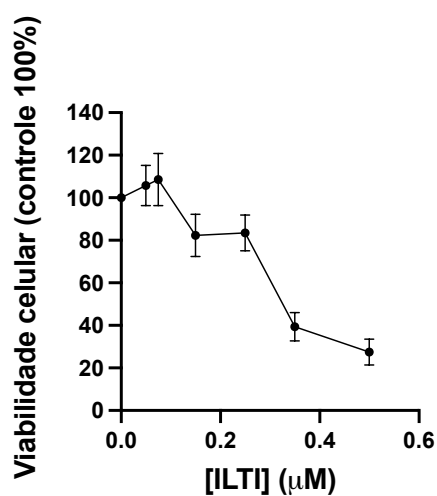
Figura 4 - Curvas de citotoxicidade do inibidor de peptidase ILTI em células humanas Raji, CCRF-CEM, KG-1 e Kasumi-1. As células ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com ILTI nas concentrações entre 0,005 e 0,5 μM por 24 h. A viabilidade foi verificada pelo ensaio com resazurina. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos 2 experimentos independentes realizados em triplicata



5.2.2 Células mononucleares do sangue periférico humano

O ILTI apresentou um IC_{50} de $0,45 \pm 0,061 \mu M$ e um E_{max} de $88,76 \pm 12,62 \%$ para as células mononucleares do sangue periférico humano, em 24 h. A curva de citotoxicidade está representada na **Figura 5**.

Figura 5 - Curva de citotoxicidade do inibidor de peptidase ILTI em células humanas saudáveis. As células ($10^5/mL$) foram estimuladas com ILTI nas concentrações de 0,05, 0,075, 0,150, 0,250, 0,350, 0,5 μM por 24 h. A viabilidade foi verificada pelo ensaio com resazurina. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.



5.3 VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO ILTI

No ensaio de citotoxicidade com o PI, observou-se que o ILTI provocou a morte celular na linhagem K-562 (**Figura 6**). Os danos à integridade da membrana celular foram confirmados pela emissão de fluorescência vermelha das células incubadas com o PI, após exposição de 24 h ao ILTI. Entre as concentrações de 0,02 a 0,35 μM , o percentual de células marcadas com iodeto de propídio aumentou de 11,4 % para 92,7 %. Isso demonstra que houve perda de integridade da membrana celular proporcional ao aumento da concentração do ILTI.

Na curva de citotoxicidade obtida no mesmo ensaio (**Figura 7**), observou-se um IC_{50} de 0,07 μM . Esse valor de IC_{50} foi utilizado nos ensaios de investigação do mecanismo de morte celular e de ciclo celular, realizados na sequência.

Figura 6 - Efeito citotóxico do inibidor de peptidase ILTI em células K-562. As células ($10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com diferentes concentrações de de ILTI por 24 h. A seguir, a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio com PI. Os gráficos em *Dot plot* são representativos da marcação com PI. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

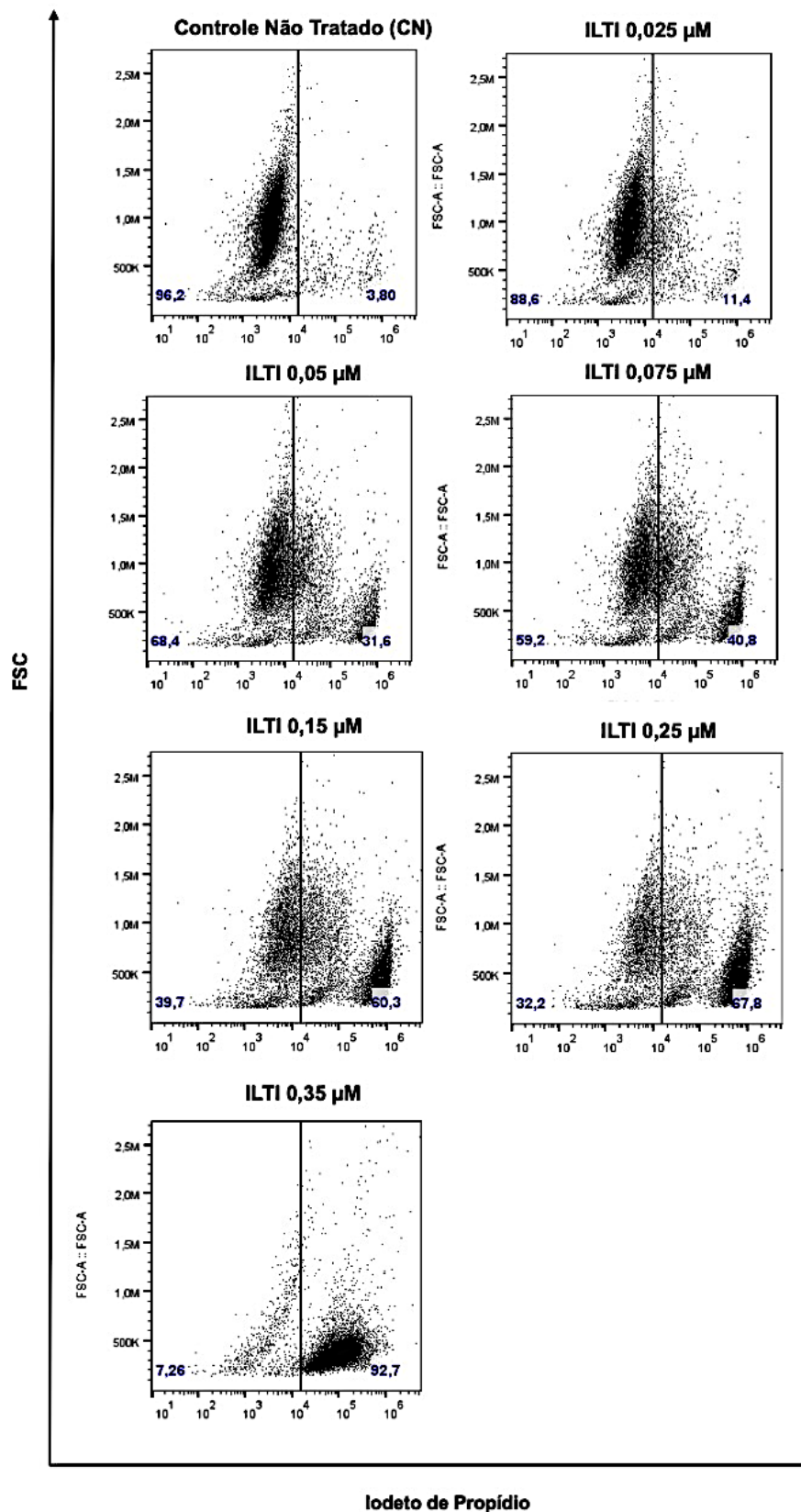
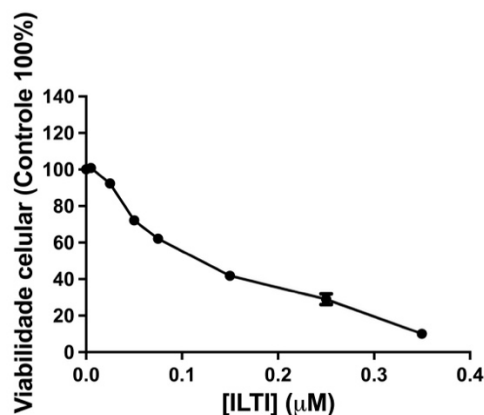


Figura 7 - Curva de citotoxicidade do inibidor de peptidase ILTI em células humanas K-562 pelo ensaio com iodeto de propídio. As células ($10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com diferentes concentrações de ILTI por 24 h. A seguir, a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio com PI. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.



5.4 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR

No ensaio de dupla marcação com Anexina-V-FITC/PI, o tratamento com o ILTI em células K-562 aumentou o percentual de apoptose tardia e apoptose inicial em relação ao controle não tratado, tanto em 12 como em 24 horas (**Figura 8**). A quantidade de células em apoptose aumentou com o tempo. Não houve diferença no percentual de necrose entre as células tratadas e o controle e nem em relação ao tempo.

Após 12 h de estímulo com o ILTI ($0,07 \mu\text{M}$), 6,46 % das células sofreram necrose (Anx -/PI+). Observou-se que 17,4 % e 8,91 % das células tratadas estavam em apoptose na fase tardia (Anx +/PI +) e inicial (Anx +/PI -), respectivamente. Além disso, 67,3% das células permaneceram viáveis. Com 24 h de tratamento com o ILTI ($0,07 \mu\text{M}$), 4,84% das células sofreram necrose enquanto 36,8 % e 14,1 % estavam em apoptose na fase tardia e inicial, respectivamente. Permaneceram viáveis 44,1% das células. Um total de 26,31% de células foram encontradas em apoptose na fase tardia ou inicial após 12 horas de tratamento com o ILTI. Este percentual subiu para 50,9% após 24 horas de tratamento.

Figura 8 - Efeito do tempo de tratamento com o ILTI na externalização da fosfatidilserina e permeabilização da membrana celular em células K-562. As células ($10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com $0,07 \mu\text{M}$ de ILTI por 12 h e por 24 h. A seguir, a morte celular foi avaliada por anexina V-FITC e PI. Acima, estão os *Dot plots* representativos das marcações com anexina-V-FITC e PI. Abaixo, os histogramas com os percentuais de população Anx/PI. CN: controle não tratado do teste; Anx-/PI-: células não marcadas por anexina-V-FITC (Anx) e nem por iodeto de pródio (PI); Anx+/PI-: células marcadas apenas por Anx; Anx+/PI+: células marcadas por Anx e por PI; Anx-/PI+: células marcadas apenas por PI. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre amostras tratadas e não tratadas (*) foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ obtidos pelo teste t *Student*.

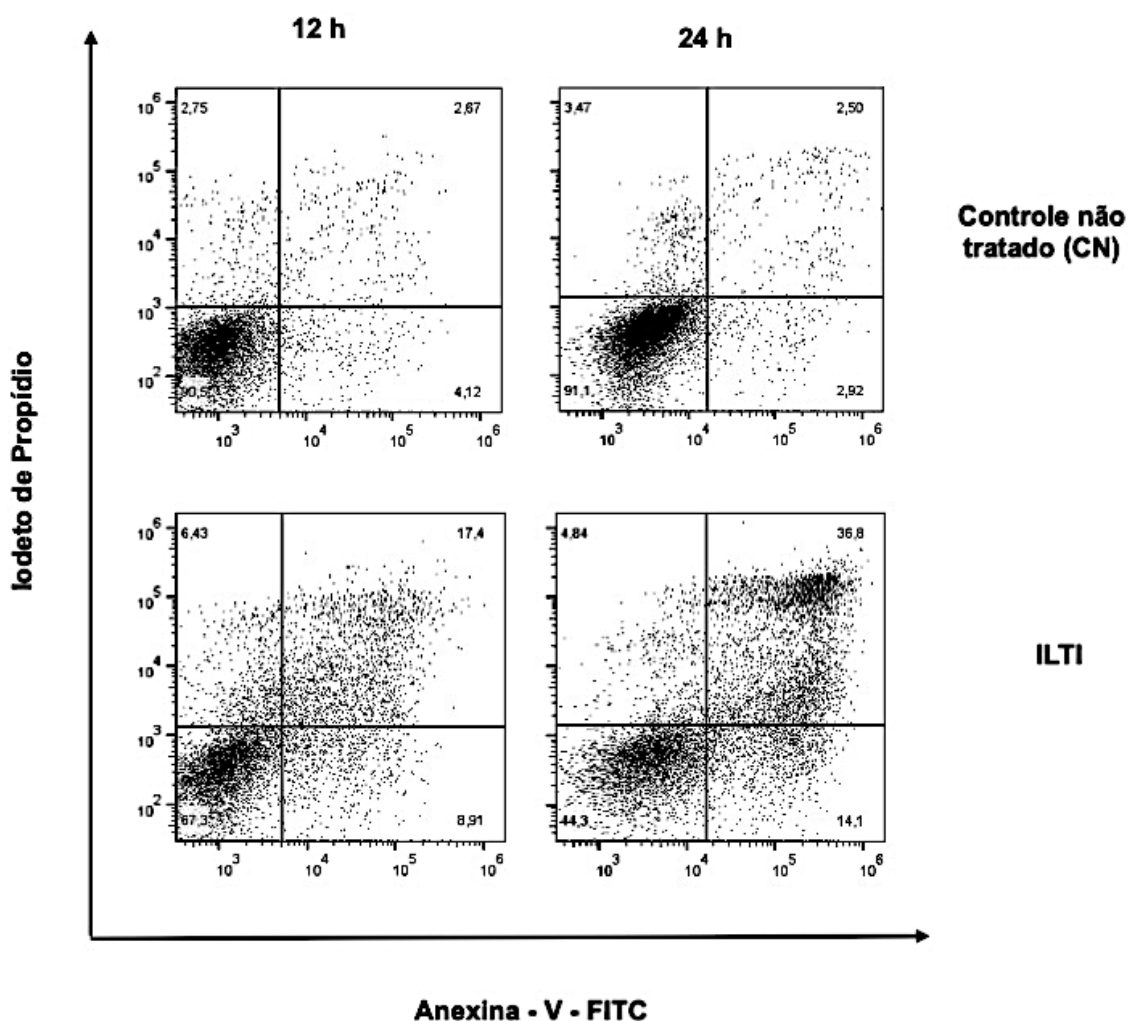
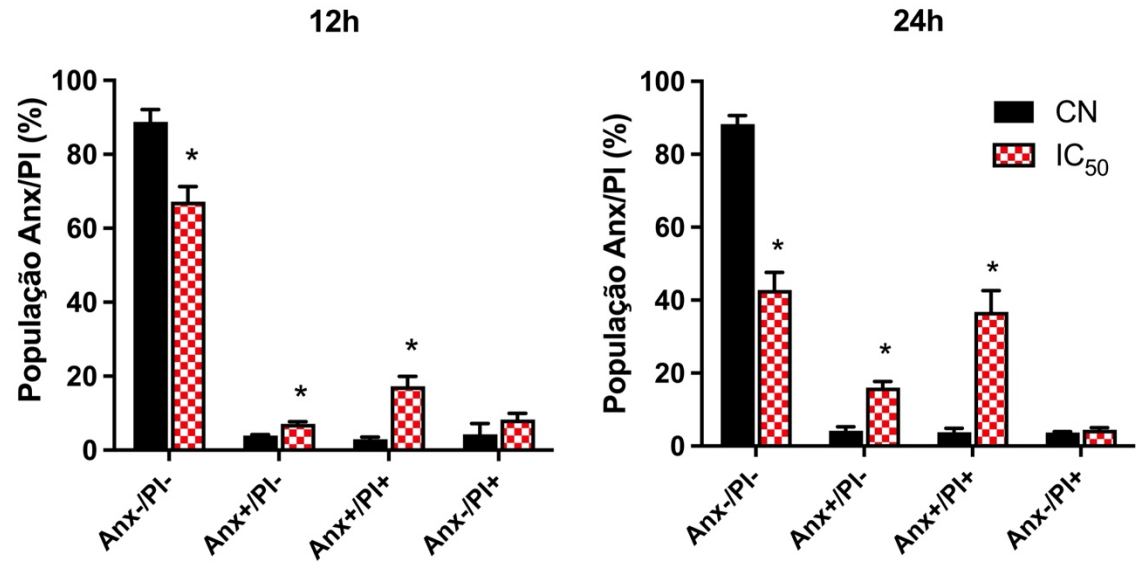


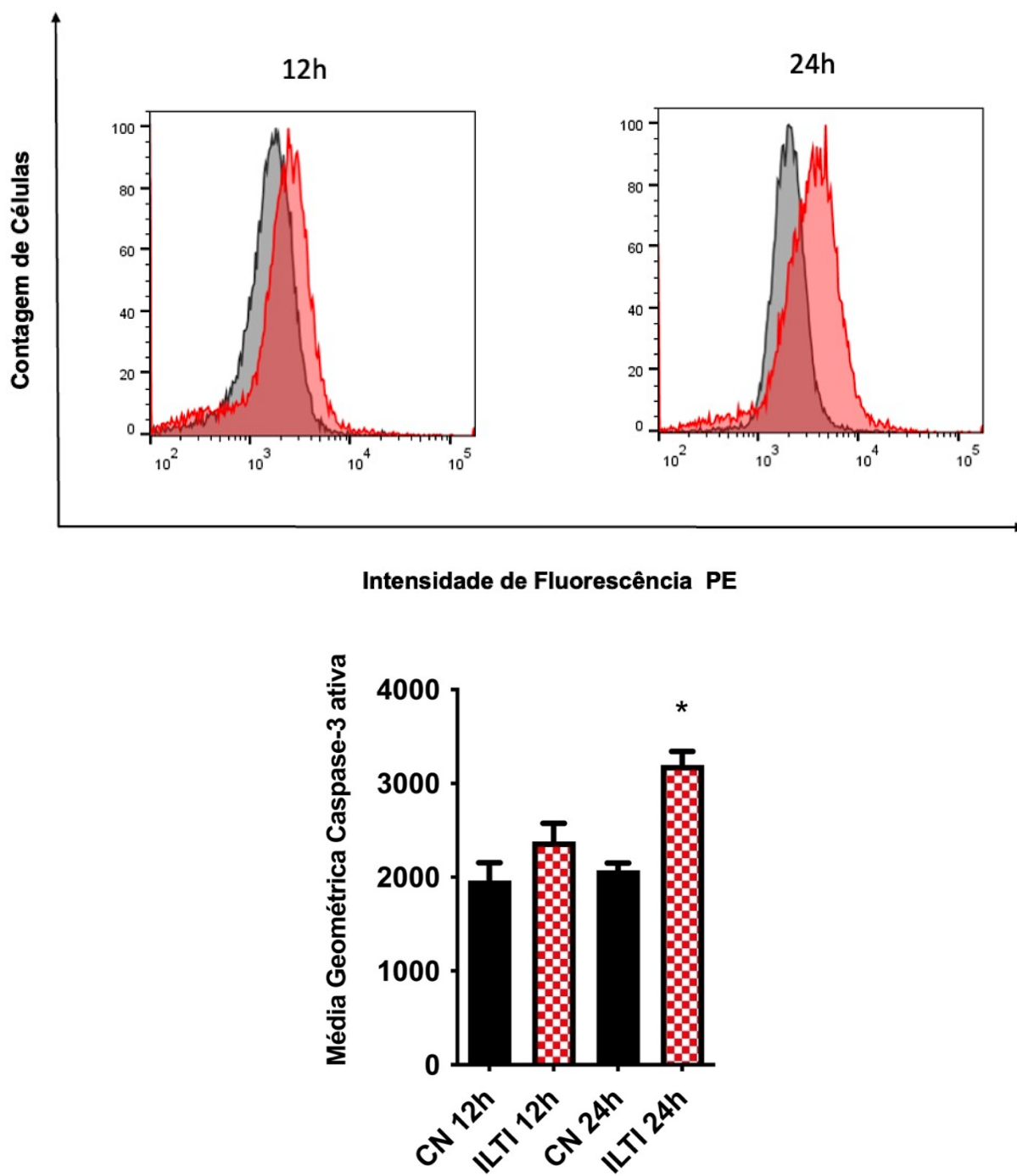
Figura 8 - Continuação



5.5 AVALIAÇÃO DA CASPASE-3 ATIVA

No ensaio com o anticorpo PE *Rabbit Anti-Active Caspase-3*, o ILTI a 0,07 μ M provocou a ativação da caspase-3, importante marcador de apoptose, em células K-562 após 24 horas de estímulo (**Figura 9**). Com 12 horas de estímulo, não houve diferença na ativação de caspase-3 entre as células estimuladas com ILTI e o controle não tratado. Os valores da média geométrica da Caspase-3 ativa encontram-se no APÊNDICE.

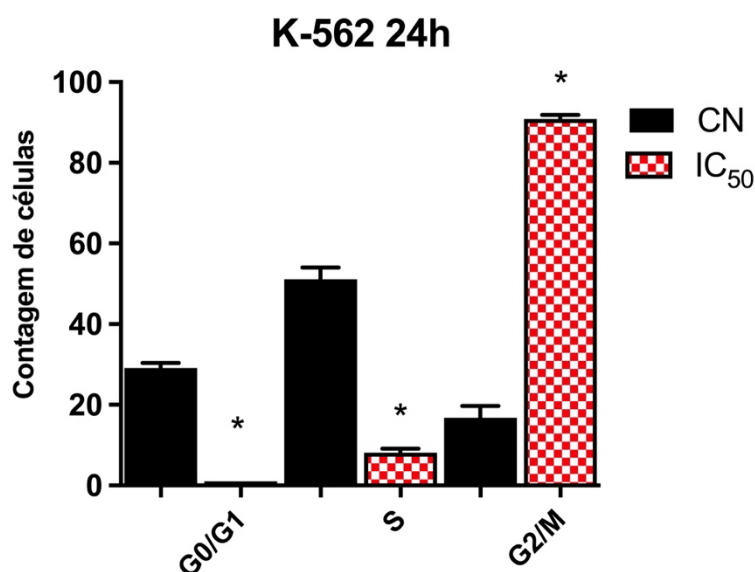
Figura 9 - Efeito do tempo de tratamento com o ILTI na ativação da caspase-3 em células K-562 As células ($10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com $0,07 \mu\text{M}$ de ILTI por 12 h e por 24 h. A seguir, a ativação da caspase 3 foi avaliada utilizando-se o anticorpo PE *Rabbit Anti-Active Caspase-3*. Acima, estão os gráficos da intensidade de fluorescência *versus* o número de células. Abaixo, o histograma com os valores das médias geométricas de fluorescência. CN: controle não tratado. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre amostras tratadas e não tratadas (*) foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ obtidos pelo teste *t Student*.



5.6 AVALIAÇÃO DE PARADA DE CICLO CELULAR

Na avaliação do ciclo celular de células K-562 expostas ao ILTI, o método empregado foi o PI e analisado por citometria de fluxo. O ILTI provocou parada no ciclo celular de células K-562 na concentração de 0,07 μM , correspondente ao IC_{50} , após 24 horas de exposição. Houve redução na porcentagem de células nas fases G_0/G_1 e na fase S e aumento nas fases G_2/M (**Figura 10**). Os valores do percentual de células tratadas e não tratadas com ILTI encontrados em cada fase do ciclo celular estão disponíveis no APÊNDICE.

Figura 10 - Avaliação de parada do ciclo celular em células K-562 tratadas com ILTI. As células ($10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com ILTI na concentração de 0,07 μM , correspondente ao IC_{50} , por 24 h. Foi realizada análise por citometria de fluxo do efeito do ILTI na progressão do ciclo celular utilizando-se iodeto de propídio. Nesta análise, foi utilizado o modelo matemático Dean-Jett-Fox. CN: controle não tratado. Os resultados são a média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre amostras tratadas e não tratadas (*) foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ obtidos pelo teste t *Student*.



6 DISCUSSÃO

Os inibidores de peptidase da família *Kunitz* possuem diferentes mecanismos de ação em estudos com modelos de câncer. Este estudo avaliou a atividade anticâncer do inibidor de tripsina de *I. laurina* em diferentes linhagens leucêmicas e propôs um possível mecanismo de ação em células K-562, modelo de leucemia mielóide crônica. Em estudo prévio, o ILTI recombinante foi citotóxico contra células de tumor de ascite de Ehrlich, com um IC₅₀ de 1,7 µM em 24 h. Entretanto, os mecanismos que levaram à perda de viabilidade celular não foram elucidados (CARNEIRO et al., 2018). No presente trabalho, o ILTI apresentou valores menores de IC₅₀, sendo 0,6 e de 0,07 µM para a linhagem K-562, nos respectivos ensaios com resazurina e iodeto de propídio, em 24 h.

Outros inibidores de peptidase da família *Kunitz* também exerceram efeito citotóxico contra modelos de câncer. O inibidor de tripsina *Inga vera* (IVTI), encontrado em uma planta da mesma subfamília do ILTI, reduziu a viabilidade de células de câncer colorretal humano (CACO-2), mas, ao contrário do ILTI, não foi efetivo contra os modelos de leucemia testados K-562 e MOLT-4 (DA SILVA BEZERRA et al., 2016). O *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI), também isolado de uma espécie vegetal da subfamília Mimosoideae, inibiu células de glioblastoma humano U87 com um IC₅₀ de 100 µM (BONTURI et al., 2018). Já o inibidor *Kunitz* de soja (KTI), também proveniente da família Fabaceae, apresentou um IC₅₀ de ~ 2 µM em células de câncer de ovário HRA em 24 h (KOBAYASHI et al., 2004). Os valores de IC₅₀ apresentados por estes inibidores da família *Kunitz* são maiores que os encontrados no ILTI, que exerceu citotoxicidade contra células leucêmicas com um IC₅₀ inferior a 0,5 µM em 24 h, nas linhagens CCRF-CEM, KG-1, Kasumi-1 e K-562. Isto evidencia uma potente atividade anticâncer do ILTI nestas células.

A resistência à apoptose é comum entre células malignas. O efeito citotóxico de drogas anticâncer depende de sua capacidade de induzir este tipo de morte celular (Shahar; Larisch, 2020). No ensaio de dupla marcação com Anexina-V-FITC/PI, o ILTI provocou apoptose tardia e inicial em células K-562, a 0,07 µM. Houve predomínio da apoptose tardia e um percentual insignificante de necrose. Logo, a perda na integridade de membrana observada no ensaio com o PI se deu provavelmente como

resultado da apoptose tardia e não da necrose. O ILTI também provocou a ativação de caspase-3 em 24 h. A caspase 3 é uma caspase efetora da apoptose e um importante marcador, encontrada na forma ativa em eventos que desencadeiam apoptose. A caspase 3 é a principal efetora tanto da via extrínseca quanto da via intrínseca da apoptose (Galuzzi, et al, 2018), não sendo possível concluir por este resultado se o ILTI ativou a via extrínseca, a via intrínseca ou ambas as vias da apoptose. O ILTI promoveu parada no ciclo celular na fase G2/M, em células K-562, a 0,07 μ M, em 24 h. Um inibidor que também apresentou apoptose com ativação de caspases e parada do ciclo celular foi o rBbKIm, inibidor de calicreínas quimérico de *Bauhinia bauhinioides* com inclusão de motivos do inibidor *Kunitz* BrTI da *Bauhinia rufa*. Seu efeito foi observado entre a 25 e 100 μ M, após 48 h, concentração e intervalo de tempo superiores aos observados no ILTI. O rBbKIm ativou caspase-3 em células DU-145 e caspase-9 em células PC-3, ambas de câncer de próstata, com liberação de citocromo C no citosol. A parada do ciclo celular ocorreu nas fases G0/G1 e G2/M nas células PC-3 (FERREIRA et al., 2013).

Não foram realizados testes para verificar a expressão de ciclinas no presente estudo, mas sabe-se que inibidores *Kunitz* podem atuar na modulação de ciclinas. O inibidor de peptidase EcTI, a 100 μ M, em 24 h, reduziu a expressão de ciclina D1 em células U87 levando à parada no ciclo celular na fase G0/G1. A redução de ciclina D1 provavelmente se deu pelo aumento observado na expressão gênica do inibidor de ciclinas p21 e ao aumento da expressão do gene supressor tumoral P53 (BONTURI et al., 2018). O ILTI poderia estar inibindo ciclinas através de um aumento na expressão de proteínas da família CIP/KIP, incluindo p21 e p17, que são inibidores do complexo ciclina-CDK nos estágios posteriores do ciclo celular S, G2 e M.

Devido ao fato do ILTI ser um eficiente inibidor de tripsina, com uma K_i de 6×10^{-9} M (MACEDO et al., 2007), seu efeito anticâncer pode estar relacionado à inibição desta enzima. Células leucêmicas superexpressam receptores ativados por peptidases (PARs) (ELSTE et al., 2010; BORGES, 2008) que possuem mecanismo proteolítico irreversível de ativação (ARAKAKI; PAN; TREJO, 2018). Dentre a várias peptidases que ativam os PARs, encontram-se as tripsinas (CHANDRABALAN; RAMACHANDRAN, 2021). Os PARs estão relacionados ao aumento da capacidade de invasão, angiogênese, metástase e resistência à apoptose. Dentre os modelos de leucemia que superexpressam PAR, são encontradas as linhagens celulares K-562, Jukart, Kasumi, HL-60 (PAR-1) e HMC (PAR-2) (ELSTE et al., 2010; BORGES, 2008).

O ILTI poderia estar se ligando à tripsina ou a outra peptidase ativadora de PAR, reduzindo a atividade deste receptor, revertendo assim a resistência à apoptose das células K-562.

Inibidores de peptidase da família *Kunitz* encontrados no reino animal podem sugerir caminhos para o entendimento de como ILTI pode estar provocando apoptose e parada do ciclo celular. O EgK1, um inibidor de peptidase recombinante da tênia canina *Echinococcus granulosus*, provocou efeitos semelhantes ao ILTI em modelo de câncer de mama MDA-MB-231 e câncer de ovário HeLa. Houve indução de apoptose tardia e precoce e parada do ciclo celular com aumento da fase S. Observou-se que o EgK1 regulou positivamente a proteína pró-apoptótica Bcl-2-like 13 e a proteína IKK-beta que é ativada por dano ao DNA, citocinas inflamatórias ou outros estresses celulares. O EgK1 regulou negativamente a proteína hHR231, um membro do complexo de coesinas essenciais para o celular adequado pois estão envolvidas na coesão das cromátides irmãs desde a replicação do DNA na fase S até sua segregação na mitose (RANASINGHE et al., 2018).

O Amblyomin-X, inibidor de peptidase *Kunitz* recombinante identificado no cDNA de glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense* reduziu a proliferação celular, induziu à parada do ciclo celular e apoptose em modelo murino de adenocarcinoma renal com células Renca. Observou-se regulação negativa da expressão de ciclina D1, Ki67 e Pgp, aumento do citocromo C e caspase-3 e redução a expressão de Bcl-2. Ciclina D1, Ki67 e Pgp estão relacionadas à agressividade e resistência do carcinoma renal. Ki67 é uma proteína proliferativa exacerbada no carcinoma renal devido à secreção tumoral de citocinas proangiogênicas.

Em algumas leucemias como na LLC e na LMA pode haver invasão e proliferação de células malignas na medula óssea e outros órgãos por mecanismos similares aos encontrados em tumores sólidos, ocorrendo angiogênese no microambiente tumoral e alta excreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BORGES, 2008). Alguns inibidores de peptidase reduzem o VEGF como a Esporamina, inibidor de tripsina encontrado na *Ipomoea batatas*, que reduziu a expressão e excreção de VEGF no fígado em modelo murino de câncer colorretal (YANG et al., 2019).

Não se sabe se a atividade anticâncer do ILTI está relacionada ao seu sítio reativo ou a outra região molecular. A ação anticâncer dos inibidores de peptidase pode ainda estar relacionadas à presença de estruturas atípicas. Por exemplo, o

inibidor de peptidase quimérico rBbKIm, anteriormente citado, possui uma sequência atípica responsável por reduzir a adesão celular (FERREIRA et al., 2013).

No ensaio de citotoxicidade com resazurina, observamos que o ILTI não apresentou seletividade para as células leucêmicas em relação às células mononucleares do sangue periférico humano. De fato, um desafio ao avanço no uso de inibidores de peptidase como agentes anticâncer tem sido a possibilidade dos inibidores apresentarem efeitos adversos. Afinal, peptidases são distribuídas em todo o organismo humano e participam de inúmeros processos fisiológicos. Neste cenário, o emprego de nanopartículas para entrega seletiva do inibidor aos tecidos alvo. O inibidor de proteassoma bortezomibe é o inibidor de peptidase para o qual foram desenvolvidos mais sistemas de entrega seletiva de fármacos, com redução dos efeitos colaterais em modelos *in vivo* de diversos tipos de cânceres (KOS; PRUNK; 2016; VANDOOREN et al., 2016). O micro ou nanoencapsulamento ou a ligação a uma nanopartícula poderiam prevenir interações prematuras do ILTI com tecidos saudáveis, aumentando sua concentração nas células e tecidos alvo e reduzindo os efeitos colaterais, ampliando assim as possibilidades do seu emprego na clínica para o tratamento de diversos tipos de câncer.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível avaliar a atividade anticâncer do ILTI em células leucêmicas e descrever o mecanismo de ação na linhagem celular K-562, em que o ILTI apresentou maior atividade. O ILTI demonstrou atividade citotóxica contra células Raji, CCRF-CEM, KG-1, Kasumi, K-562 e células mononucleares do sangue periférico humano. Observou-se também que células leucêmicas K-562 tratadas com o ILTI sofrem processo de apoptose. A apoptose foi a principal via de morte ativada, e é possível que a apoptose promovida por ILTI envolva a parada do ciclo celular na fase G2/M, como observado em células K-562.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Experimentos futuros visam verificar a ativação de caspase-9, liberação de citocromo C e avaliação do potencial mitocondrial, a fim de consolidar os resultados atuais e trazer um melhor entendimento da atividade anticâncer do ILTI. Outros experimentos que podem ser realizados são a verificação de expressão e atividade do receptor PAR e das proteínas p21, p17, p53, ciclina D1, Ki67 e Bcl-2-like 13 e testes de citotoxicidade em modelos de câncer tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R.; LARISCH, S. **Killing by Degradation: Regulation of Apoptosis by the Ubiquitin-Proteasome-System.** *Cells*, v. 10, p. 3465, 8 dez. 2021

ADAN, A. et al. **Flow cytometry: basic principles and applications.** *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 37, n. 2, p. 163-176, 2016

ALI, A. G. et al. **A novel adamantane thiadiazole derivative induces mitochondria-mediated apoptosis in lung carcinoma cell line.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 25, p. 241–253, 5 nov. 2016

AL-AWADHI, F. H.; LUESCH, H. **Targeting eukaryotic proteases for natural products-based drug development.** *Natural Product Reports Royal Society of Chemistry*, 1 jun. 2020.

AMARANTE-MENDES, G. P. et al. **BCR-ABL1 Tyrosine Kinase Complex Signaling Transduction: Challenges to Overcome Resistance in Chronic Myeloid Leukemia.** *Pharmaceutics*, v. 14, p. 215, 17 jan. 2022.

BOSCH, F.; DALLA-FAVERA, R. **Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment.** *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group, 1 nov. 2019.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976

BRAY, F. et al. **Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. v. 68, p. 394–424, 2018.

CARNEIRO, F. C. et al. **Recombinant *Inga laurina* trypsin inhibitor (ILTI) production in *komagataella phaffii* confirms its potential anti-biofilm effect and reveals an anti-tumoral activity.** *Microorganisms*, v. 6, n. 2, 28 abr. 2018.

COCCARO, N. et al. **Next-generation sequencing in acute lymphoblastic Leukemia** *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 2 jun. 2019.

COTABARREN, J. et al. **Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review.** *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 1 mar. 2020.

DA SILVA BEZERRA, C. et al. **Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor.** *Process Biochemistry*, v. 51, n. 6, p. 792–803, 1 jun. 2016.

EATEMADI, A. et al. **Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment** *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 1 fev. 2017.

FERREIRA, J. G. et al. **The impaired viability of prostate cancer cell lines by the recombinant plant kallikrein inhibitor**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 19, p. 13641–13654, 10 maio 2013.

FOGARTY, C. E.; BERGMANN, A. **Killers creating new life: caspases drive apoptosis- induced proliferation in tissue repair and disease**. *Cell Death and Differentiation*, v. 24, p. 1390–1400, 31 mar. 2017

FUJITA, T. C. et al. **Acute lymphoid leukemia etiopathogenesis**. *Molecular Biology Reports*, Springer Science and Business Media B.V., 1 jan. 2021.

GABRIEL DE SOUZA, J. et al., 2016. **Promising pharmacological profile of a Kunitz-type inhibitor in murine renal cell carcinoma model**. *Oncotarget*, v. 7, n. 38, p. 62255- 62266, 23 ago. 2016.

GALI-MUHTASIB, H. et al. **Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis**. *Apoptosis*. Springer Science+Business Media New York, 11 set. 2015

GALLUZZI, L. et al. **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018**. *Cell Death Differ*, v. 25, p. 486-541, 2018.

GÓMEZ-ABENZA, E. et al. **Zebrafish modeling reveals that SPINT1 regulates the aggressiveness of skin cutaneous melanoma and its crosstalk with tumor immune microenvironment**. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, v. 38, n. 1, p. 405, 13 set. 2019.

HAIDER, M. Z.; ANWER, F. **Genetics, Philadelphia Chromosome**. StatPearls Publishing [Internet]. Treasure Island (FL), jan. 2020. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560689/>> Acesso em 22/03/2022

HARISH, B. S.; UPPULURI, K. B. **Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications** *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 1 fev. 2018.

HU, P. et al. **A nanometer-sized protease inhibitor for precise cancer diagnosis and treatment**. The Royal Society of Chemistry 2019. 2019.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 120 p. 2019. ISBN: 978-85-7318-389-4 (versão eletrônica). Disponível em < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>> Acesso em 21/08/2020.

JULIUSSON, G.; HOUGH, R. **Leukemia**. Prog Tumor Res. Basel, Karger, v 43, p. 87-100, 2016.

KARRAY, A. et al. **Purification and Biochemical Characterization of a New Protease Inhibitor from Conyza dioscoridis with Antimicrobial, Antifungal and Cytotoxic Effects**. Molecules (Basel, Switzerland), v. 25, n. 22, 20 nov. 2020.

KIPPS, T. J. et al. **Chronic lymphocytic leukaemia**. Nature Reviews Disease Primers, v. 3, 19 jan. 2017.

KOBAYASHI, H. et al. **A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation**. Clinical & Experimental Metastasis. v. **21**, p. 159–166, 24 jan. 2004.

KOMOROWSKI, L. et al. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia in the Lymphoid Lineage - Similarities and Differences with the Myeloid Lineage and Specific Vulnerabilities. Int. J. Mol. Sci., v. 21, p. 5776, 2020.

KOS, M.; PRUNK, J. **Nanoparticle Based Delivery of Protease Inhibitors to Cancer Cells**. *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, p. 4816-4837, 11 mai. 2016.

LAGUNAS-RANGEL, F. A. et al. **Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis**. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell. v. 11, n. 4, 1 out., 2017.

LYU, P. et al. **Identification and pharmaceutical evaluation of novel frog skin-derived serine proteinase inhibitor peptide–PE-BBI (Pelophylax esculentus Bowman-Birk inhibitor) for the potential treatment of cancer**. Scientific Reports, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

MACEDO, M. L. R. et al. **Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of Inga laurina (SW.) Willd**. Phytochemistry, v. 68, n. 8, p. 1104–1111, abr. 2007.

MACEDO, M. L. R. et al. **Practical and theoretical characterization of Inga laurina Kunitz inhibitor on the control of Homalinotus coriaceus**. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, v. 158, n. 2, p. 164–172, 2011.

MACEDO, M. L. R. et al. **Antimicrobial Activity of ILTI, a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from Inga laurina (SW.) Willd**. Current Microbiology, v. 72, n. 5, p. 538–544, 1 maio 2016.

MARMITT, D.J. et al. **Plants and Their Potential Antitumor Effects in Clinical Trials and Registered Patents**. Nutrition and Cancer, 24 ago., 2020.

MINCIACCHI, V. R.; KUMAR, R.; KRAUSE, D. S. **Chronic myeloid leukemia: A model disease of the past, present and future** Cells. MDPI, 1 jan. 2021.

MIRANDA-FILHO, A. et al. **Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study**. The Lancet Haematology, v. 5, n. 1, p. e14–e24, 1 jan. 2018.

OSMAN, A. E. G.; DEININGER, M. W. **Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions**. Blood Reviews, Churchill Livingstone, 1 set. 2021.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. J. Immunol. Methods. v. 65, p. 55-63, 1983.

NOCIARI, M.M. et al. **A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity**. J. Immunol. Meth. v. 213, p.157–167, 1998.

RAKASHANDA, S.; AMIN, S. **Proteases as Targets in Anticancer Therapy Using Their Inhibitors**. Journal of Life Sciences, v. 5, n. 2, p. 133-138, 2013.

BONTURI, C. R., et al. **Could a plant derived protein potentiate the anticancer effects of a stem cell in brain cancer?** Oncotarget, v. 9, n. 30, p. 21296-21312, 20 abr., 2018.

RAMOS, V. D. S. et al. **Molecular cloning and insecticidal effect of Inga laurina trypsin inhibitor on Diatraea saccharalis and Heliothis virescens**. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, v. 156, n. 3–4, p. 148–158, 2012.

SONG, L.; CHANG, J.; LI, Z. **A serine protease extracted from Trichosanthes kirilowii induces apoptosis via the PI3K/AKT-mediated mitochondrial pathway in human colorectal adenocarcinoma cells**. Food and Function, v. 7, n. 2, p. 843–854, 1 fev. 2016.

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

VANDOOREN, J. et al. **Proteases in cancer drug delivery**. Adv Drug Deliv Rev; v. 97, p.144-55, 1 fev. 2016

YANG, P.; LI, Z. Y.; LI, H. Q. **Potential roles of protease inhibitors in cancer progression** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, 2016.

WHO. **WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all**. Geneva: World Health Organization, 2020. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-000129-9 (versão eletrônica). Disponível em <<https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-cancer-setting-priorities-investing-wisely-and-providing-care-for-all>> Acesso em 21/08/2020

ZHANG, S.; KIPPS, T. J. **The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia.** Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 9, p. 103–118, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE - Material Suplementar

Viabilidade de células leucêmicas expostas ao ILTI em 24 h

Linhagem celular	Viabilidade Celular $\pm$ EP (%) ILTI 0,5 μM	Viabilidade Celular $\pm$ EP (%) ILTI 5 μM
K-562	7,46 % $\pm$ 2,85	3,95 % $\pm$ 0,80
Kasumi-1	6,52% $\pm$ 1,32	5,26% $\pm$ 1,76
KG-1	6,09% $\pm$ 1,77	0,99% $\pm$ 0,0001

IC₅₀ e E_{máx} obtidos nas curvas de citotoxicidade do ILTI. IC₅₀: Concentração de ILTI na qual a resposta é reduzida pela metade. E_{máx}: Efeito máximo. EP: Erro padrão da média

Linhagem celular	IC₅₀ $\pm$ EP (μM)	E_{máx} $\pm$ EP (%)
Raji	> 0,5	59,73 $\pm$ 4,74
CCRF-CEM	0,43 $\pm$ 0,0096	87,05 $\pm$ 2,93
KG-1	0,47 $\pm$ 0,009	67,8 $\pm$ 5,18
Kasumi-1	0,24 $\pm$ 0,038	74,73 $\pm$ 5,24
K-562	0,6 $\pm$ 0,0181	96,35 $\pm$ 1,36
Mononucleares	0,45 $\pm$ 0,061	88,76 $\pm$ 12,62

Média geométrica da caspase-3 ativa em células K-562 expostas ao ILTI em 12 e 24 h

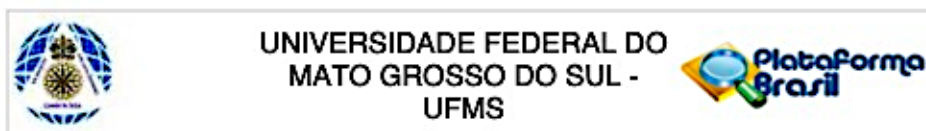
Tratamento	Média Geométrica $\pm$ EP 12 h	Média Geométrica $\pm$ EP 24 h
Controle Não Tratado	1966 $\pm$ 188,3	2074,25 $\pm$ 76,74
ILTI 0,07 μ M (IC ₅₀)	2381 $\pm$ 195,1	3199 $\pm$ 141,3

Percentuais de células K-562 nas fases G0/G1, S e G2/M, após exposição ao ILTI por 24 h

Fase do Ciclo Celular	Controle Não Tratado	ILTI 0,07 μM (IC₅₀)
G0/G1	29,15 $\pm$ 1,250	1
S	51,1 $\pm$ 2,900	8,105 $\pm$ 1,015
G2/M	CN 16,75 $\pm$ 2,950	IC ₅₀ 90,85 $\pm$ 1,050

ANEXO

ANEXO - Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antileucêmica de compostos de origem natural e sintética

Pesquisador: Edgar Julian Paredes Gamero

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 35853720.2.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

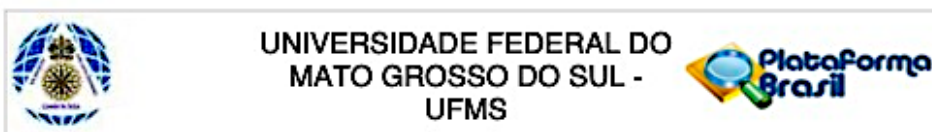
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.405.223

Apresentação do Projeto:

O pesquisador ressaltou o contexto de que a bioprospecção de produtos naturais proporcionou a obtenção de diversas moléculas que são utilizadas atualmente como fármacos, ou tem servido de base para a criação de análogos com maior potencial farmacológico. A grande biodiversidade brasileira despertou enorme interesse mundial como fonte de novas moléculas com atividade farmacológica diversa. O presente projeto de pesquisa será realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares e pretende identificar novas moléculas com atividade antitumoral, bem como seus mecanismos de ação. Produtos brutos de extratos naturais e moléculas isoladas de diferentes origens, naturais e sintéticas, foram selecionados por sua atividade citotóxica em linhagens leucêmicas humanas (que são comercializadas e foram adquiridas pela equipe de pesquisa). Serão testadas purinas e pirimidinas, peptídeos antimicrobianos extratos brutos de Famílias de plantas do cerrado e pantanal, compostos isolados destas plantas (terpenos, flavonóides, isoflavonóides, lignanas, neolignanas, glicosídeos, cumarinas, cromonas, isocromonas, quinonas, fitoesteróis, alcalóides, saponinas, quinolonas, e elcosanóides) e modificações químicas de alguns compostos como cantinona e miltetofosina e perifosina. Os compostos com melhor atividade citotóxica e maior seletividade serão usados para comparar seus efeitos em células mononucleares extraídos do sangue de seres humanos saudáveis (participantes a serem convidados na UFMS). Após a seleção inicial dos compostos com atividade, pretende-se aprofundar o entendimento dos mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos destes

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros 4 Prédio das Pró-Reitorias 4 Hércules Maymone 4 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 4.405.223

compostos. Assim, busca-se identificar novas moléculas com atividade antitumoral e que possam servir como base para novos análogos com maior atividade.

Critério de Inclusão: "Indivíduos saudáveis, homens e mulheres, entre 18 e 50 anos, que se declarem sadios."

Critério de Exclusão: "Indivíduos que se declarem doentes (crônicas ou agudas), menores de 18 anos ou maiores de 40. Indivíduos que se neguem a participar do estudo."

O tamanho estimado da amostra é de 40 indivíduos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Avaliar os efeitos antileucêmicos de uma série de compostos naturais isolados ou sintéticos (peptídeos antimicrobianos; purinas e pirimidinas; alquilfosfolídeos, alquiltriazóis e derivados alcaloides). **Objetivo Secundário:** Testar em células mononucleares do sangue de doadores saudáveis o efeito citotóxico dos compostos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos previstos pelo pesquisador: "A retirada de sangue venoso é um método corriqueiro na investigação clínica e científica, sem graves consequências para o doador. Contudo é considerada uma técnica invasiva visto que provoca o rompimento da proteção natural da pele com a penetração de uma agulha no sistema venoso. O maior problema é uma leve dor, e o desconforto de agulhas e da punção; porém se houver qualquer desconforto, o participante tem o direito de desistir a qualquer momento. Em raras ocasiões pode ocorrer: hematomas (durante ou após a realização da punção venosa); punção em artéria; anemia iatrogênica (em casos de volumes maiores a 100 mL); lesão nervosa; infecção."

- Benefícios previstos pelo pesquisador: "Não há benefício direto ao participante. Entretanto, a partir deste estudo poderão ser identificadas diversas moléculas com promissora atividade antitumoral."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide seção Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide seção Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros, Prédio das Pró-Reitorias, Hércules Maymone, 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 4.405.223

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador realizou adequação da pendência apontada no Parecer Consubstanciado emitido por este CEP em 01 de outubro de 2020. Apresenta todos os itens necessários para a aprovação do projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

a-

Solicitamos aos pesquisadores que se atentem e obedeçam as medidas de segurança adotadas pelos locais de pesquisa, pelos governos municipais e estaduais, pelo Ministério da Saúde e pelas demais instâncias do governo devido a excepcionalidade da situação para a prevenção do contágio e o enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do coronavírus (Covid-19).

As medidas de segurança adotadas poderão interferir no processo de realização das pesquisas envolvendo seres humanos. Quer seja no contato do pesquisador com os participantes para coleta de dados e execução da pesquisa ou mesmo no processo de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido-TALE, incidindo sobre o cronograma da pesquisa e outros.

Orientamos ao pesquisador na situação em que tenha seu projeto de pesquisa aprovado pelo CEP e em decorrência do contexto necessite alterar seu cronograma de execução, que faça a devida "Notificação" via Plataforma Brasil, informando alterações no cronograma de execução da pesquisa.

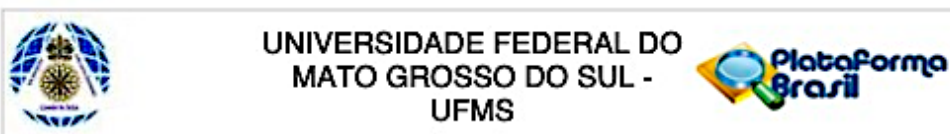
b-

É de responsabilidade do pesquisador submeter ao CEP semestralmente o relatório de atividades desenvolvidas no projeto e, se for o caso, comunicar ao CEP a ocorrência de eventos adversos graves esperados ou não esperados. Também, ao término da realização da pesquisa, o pesquisador deve submeter ao CEP o relatório final da pesquisa. Os relatórios devem ser submetidos através da Plataforma Brasil, utilizando-se da ferramenta de NOTIFICAÇÃO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros 2 Prédio das Pró-Reitorias 2 Hércules Maymone 2 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 79.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 4.405.223

Recurso do Parecer	recurso.pdf	09/11/2020 13:16:19		Acelto
Outros	carta de anuencia modelo.pdf	09/11/2020 13:15:42	Edgar Julian Paredes Gamero	Acelto
Outros	Autorizacão local.pdf	09/11/2020 13:15:22	Edgar Julian Paredes Gamero	Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRostonaivo.pdf	09/11/2020 13:14:45	Edgar Julian Paredes Gamero	Acelto
Recurso do Parecer	recurso.pdf	25/08/2020 15:50:09		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	25/08/2020 15:46:30	Edgar Julian Paredes Gamero	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Respostas ao assessor sobre a lista de inadéquações.pdf	25/08/2020 15:46:24	Edgar Julian Paredes Gamero	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCEP.pdf	25/08/2020 15:46:16	Edgar Julian Paredes Gamero	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaobiologico.pdf	25/08/2020 15:45:38	Edgar Julian Paredes Gamero	Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1518603.pdf	29/06/2020 11:08:05		Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 18 de Novembro de 2020

Assinado por:
MAURINICE EVARISTO WENCESLAU
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros 2 Prédio das Pró-Reitorias 2 Hércules Maymone 2 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br