

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR**

Ana Luísa Batista Pena

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA- ANGIOTENSINA**  
**CIRCULANTES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS PORTADORES DE LEUCEMIA**  
**AGUDA: REVISÃO DE LITERATURA E ESTUDO PILOTO**

Belo Horizonte

2022

Ana Luísa Batista Pena

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA- ANGIOTENSINA  
CIRCULANTES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS PORTADORES DE LEUCEMIA  
AGUDA: REVISÃO DE LITERATURA E ESTUDO PILOTO**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientadora: Professora Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Belo Horizonte

2022

P397a Pena, Ana Luisa Batista.  
Avaliação de componentes do Sistema Renina-Angiotensina circulantes em pacientes pediátricos portadores de leucemia aguda [recursos eletrônicos]: revisão de literatura e estudo piloto. / Ana Luisa Batista Pena. -- Belo Horizonte: 2022.  
59f.:il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Ana Cristina Simões e Silva.  
Área de concentração: Medicina Molecular  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Sistema Renina-Angiotensina. 2. Leucemia. 3. Angiotensina I. 4. Angiotensina II. 5. Dissertação Acadêmica. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WH 250

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA- ANGIOTENSINA CIRCULANTES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS  
PORTADORES DE LEUCEMIA AGUDA: REVISÃO DE LITERATURA E ESTUDO PILOTO**

**ANA LUÍSA BATISTA PENA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia vinte e dois de agosto de dois mil vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

**Ana Cristina Simões e Silva - Orientadora**  
UFMG

**Camila Silva Peres Cancela**  
UFMG

**Albená Nunes da Silva**  
UFOP

Belo Horizonte, 22 de agosto de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Simoes e Silva, Presidente de comissão**, em 23/08/2022, às 15:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Silva Peres Cancela, Professora do Magistério Superior**, em 23/08/2022, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Albená Nunes da Silva, Usuário Externo**, em 24/08/2022, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1645916** e o código CRC **11C8FB08**.

*Ao Matias e à Olívia, meu melhor sonho  
concretizado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pequenos pacientes, que desde seus pequenos olhos e corpos ainda em desenvolvimento, me ensinam todos os dias sobre amor, força e resiliência.

À professora Ana Cristina Simões e Silva, pela confiança e suporte integral durante essa jornada. Toda a minha admiração pela sua genialidade e dedicação profissional combinada a humildade e carisma como ser humano. Sou grata pela oportunidade de trabalho e de convivência.

Ao Pedro Alves Soares, pela ajuda enorme com os experimentos e análise de dados.

Ao Matias, que nunca mediu esforços para que meus sonhos se tornassem reais. Minha gratidão a vida por ter um amor como você.

Aos meus pais, se cheguei aonde estou foi apoiada na base que construíram para mim.

## RESUMO

**Introdução:** As leucemias agudas são a neoplasia mais comum da infância. Nos últimos anos, houve um avanço importante na taxa de sobrevivência desses pacientes, atribuído ao melhor entendimento da fisiopatologia, da base genética e molecular da doença, assim como o estabelecimento de protocolos com regimes quimioterápicos adaptados à estratificação de risco individual da doença. Apesar de sua eficácia, os tratamentos quimioterápicos ainda estão associados a uma alta toxicidade, sendo responsáveis por parte da morbidade e mortalidade desses pacientes. O surgimento de novos regimes e estratégias terapêuticas é essencial para o tratamento desses pacientes que por morbidade não conseguem seguir o tratamento inicialmente proposto ou para aqueles que apresentam a doença na sua forma mais grave, pouco responsiva à quimioterapia. Existe na literatura uma série de estudos relacionando a atuação de moléculas do Sistema Renina Angiotensina (SRA) à inibição do crescimento e redução da proliferação de células cancerígenas humanas, assim como a sua atuação na aceleração da recuperação medular por meio do estímulo da proliferação de progenitores medulares específicos. O objetivo deste estudo é avaliar se existe uma associação entre o perfil de expressão das moléculas do SRA em crianças portadoras de leucemias agudas e a forma de apresentação e evolução da doença.

**Pacientes e Métodos:** Trata-se de estudo transversal realizado em um grupo de pacientes pediátricos com leucemia aguda. O desfecho primário de interesse foi a dosagem sérica das moléculas de Angiotensina II (Ang II) e Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. A população de estudo consistiu em pacientes pediátricos com leucemia aguda em acompanhamento no serviço de Hematologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG. A análise dos biomarcadores do SRA nas amostras desses pacientes foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da UFMG. Além dos níveis de Ang-(1-7) e Ang II dosados, a razão Ang-(1-7) /Ang II foi calculada como parâmetro do equilíbrio entre os eixos alternativo e clássico do SRA.

**Resultados:** Foram incluídos 11 pacientes com leucemia aguda e 20 controles saudáveis pareados por sexo e por idade. Foram dosados os níveis sanguíneos de Ang II e Ang-(1-7) de pacientes com leucemias agudas e controles saudáveis. Dentre os valores encontrados foi observado que os pacientes com leucemias agudas apresentaram níveis significativamente mais elevados de ambos os peptídeos quando comparados com os controles saudáveis. Entretanto, não houve diferença significativa da relação Ang-(1-7) /Ang II entre os dois grupos. Foi detectada uma correlação forte e positiva entre os níveis de Ang II e de Ang-(1-7) em pacientes com leucemias agudas. Resultado similar não foi encontrado nos controles saudáveis.

**Conclusão:** O presente estudo detectou uma associação importante entre a presença da

leucemia aguda e níveis significativamente mais elevados dos peptídeos Ang II e Ang-(1-7). Não houve diferença significativa entre os níveis de Ang II e Ang-(1-7), assim como da relação Ang-(1-7) /Ang II, entre os diferentes níveis de acometimento do SNC, diferentes tipos de leucemia ou nos pacientes com hiperplasia ao diagnóstico.

**Palavras-chave:**

Leucemias. Sistema renina angiotensina. Angiotensina II. Angiotensina (1-7).



## ABSTRACT

**Introduction:** Acute leukaemia are the most common cancer of childhood. In recent years there has been an important advance in the survival rate of these patients, attributed to a better understanding of the pathophysiology, genetic and molecular basis of the disease, as well as the establishment of protocols adapted to individual risk stratification of the disease. Despite its effectiveness, chemotherapy treatments are still associated with high toxicity, accounting for part of the morbidity and mortality of these patients. The emergence of new regimens and therapeutic strategies is essential for the treatment of those patients who, due to morbidity, cannot follow the treatment initially proposed or for those who have the disease in its most severe form, unresponsive to chemotherapy. There are a few studies in the literature relating the action of Renin Angiotensin System (RAS) molecules with the inhibition of growth and reduction of the proliferation of human cancer cells, as well as their action in accelerating bone marrow recovery by stimulating the proliferation of specific bone marrow progenitors. The objective of this study is to assess whether there is an association between the blood levels of RAS molecules in children with acute leukaemia and the form of presentation and evolution of the disease. **Patients and Methods:** This is a cross-sectional study carried out in a group of paediatric patients with acute leukaemia. The primary outcome of interest was the serum medullary and peripheral blood levels of Angiotensin II (Ang II) and Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] molecules. The study population consisted of paediatric patients with acute leukaemia followed-up at the Paediatric Haematology Service of Hospital das Clínicas, UFMG. The analysis of RAS biomarkers [Ang II, Ang-(1-7)] in samples from these patients was performed at the Interdisciplinary Laboratory for Medical Investigation of UFMG. In addition to the Ang-(1-7) and Ang II levels measured, the Ang-(1-7)/Ang II ratio was calculated as a parameter of the balance between the alternative and classical axes of the RAS. **Results:** Eleven patients with acute leukaemia and 20 healthy controls matched by sex and age were included. Blood levels of Ang II and Ang-(1-7) were measured in patients with acute leukaemia and healthy controls. Among the values found, it was observed that patients with acute leukaemia had significantly higher levels of both peptides when compared with healthy controls. However, no significant difference was found in the Ang-(1-7)/Ang II ratio between the two groups. A strong and positive correlation was detected between Ang II and Ang-(1-7) levels in patients with acute leukaemia. A similar result was not found in healthy controls. Among patients with acute leukaemia, no significant differences were observed in the levels of Ang II and Ang-(1-7) or in the Ang-(1-7)/Ang II ratio between samples of

peripheral blood and medullary blood. **Conclusion:** The present study detected an important association between the presence of acute leukaemia and significantly higher levels of the peptides Angiotensin II and Angiotensin-(1-7). There was no significant difference between the levels of Ang II and Ang-(1-7), as well as the Ang-(1-7)/Ang II ratio, between the different levels of CNS involvement, different types of leukemia or in patients with hypercellularity at diagnosis.

**Keywords:** Leukaemia. Renin angiotensin system. Angiotensin II. Angiotensin (1-7).

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>Tabela 1.</b> Comparação de dados entre pacientes com leucemia aguda e controles saudáveis .....	39
<b>Tabela 2.</b> Características individuais dos pacientes com leucemia aguda estudados .....	40
<b>Tabela 3.</b> Correlações entre níveis de Angiotensina II, Angiotensina-(1-7) e relação Ang-(1-7) /Ang II em pacientes com leucemia aguda e controles saudáveis .....	41
<b>Gráfico 1.</b> Dosagem de Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) em pacientes com leucemia aguda e controle saudável .....	37
<b>Gráfico 2.</b> Correlação dos níveis de Angiotensina II e Angiotensina-1(1-7) no grupo de pacientes com leucemia aguda e controles saudáveis .....	38
<b>Gráfico 3.</b> Níveis sanguíneos de Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) em pacientes com leucemia aguda em remissão comparados com o paciente falecido .....	39

### **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Fatores de crescimento na hematopoiese normal .....	19
<b>Figura 2.</b> Via RAS no câncer .....	23
<b>Figura 3.</b> Principal via de formação das angiotensinas .....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcSDKP: N-Acetil-Ser-Asp-Lys-Pro

ALF: proteínas AF4/LAF4/FMR2

Ang II: Angiotensina II

Ang-(1-7): Angiotensina (1-7)

AR: alto risco

AT1 e AT2: receptores de angiotensina tipo 1 e 2

BFU-E: progenitores medulares eritróides

BR: baixo risco

BRAs: antagonistas de receptores angiotensinérgicos tipo 1

CBF: gene do fator de ligação ao núcleo

CFU- GEMM: progenitores comuns de células mieloides

CFU-GM: progenitores medulares mieloides

CFU-MEG: progenitores medulares megacariocíticos

cGMP: monofosfato de guanosina cíclico

COEP: comitê de ética e pesquisa

COX-2: ciclo-oxigenase 2

CTH: células-tronco hematopoiéticas

CTMs: células-tronco mesenquimais

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECA2: enzima conversora de angiotensina II

EPO: eritropoietina

F: feminino

FISH: hibridização in situ por fluorescência interfásica

G-CSF: colônia estimuladora de granulócitos

GPCR: receptor acoplado à proteína G

iNOS: inibidor seletivo de NOS

KMT2A: histona lisina [K]-Metiltransferase 2<sup>a</sup>

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LMA: leucemia mieloblástica aguda

LPM: leucemia promielocítica

M: masculino

MAPK: via da proteína quinase ativada por mitógeno

MLL: leucemia de linhagem mista

MO: medula óssea

NO: óxido nítrico

NOMA: não foram obtidas metafases suficientes para análise de cariótipo ao diagnóstico

NOS: óxido nítrico sintase

PGE-2: prostaglandina E2

Ph+: cromossomo Filadelfia

PIGF: fator de crescimento placentário

RI: risco intermediário

SFlt-1 decoy: receptor de fator de crescimento endotelial vascular solúvel

SNC: sistema nervoso central

SRA: Sistema Renina Angiotensina

TK: tirosina quinase

TMO: transplante de medula óssea

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
	2.1 Leucemias Linfoblásticas Agudas .....	21
	2.1.1 Tipos B .....	24
	2.1.1.1 LLA alta hiperploídia na infância .....	24
	2.1.1.2 LLA com rearranjo MLL .....	24
	2.1.1.3 Gene de fusão BCR-ABL1 .....	24
	2.1.2 Tipos T .....	25
	2.2 Leucemias Mieloblásticas Agudas .....	26
	2.3 Papel do sistema renina angiotensina no câncer humano: mecanismos e vias .....	26
	2.4 Papel do sistema renina angiotensina na leucemia .....	28
	2.5 Evidências epidemiológicas .....	30
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
	3.1 Objetivo geral .....	32
	3.2 Objetivos específicos .....	33
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
	4.1 Delineamento do estudo e caracterização da amostra .....	33
	4.2 Casuística .....	33
	4.3 Critérios de inclusão .....	34
	4.4 Critérios de exclusão .....	34
	4.5 Dosagem sanguínea das angiotensinas .....	34
	4.6 Variáveis clínicas dos pacientes .....	34
	4.7 Análise estatística .....	35
	4.8 Considerações éticas .....	35
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	35
	5.1 População do estudo .....	36
	5.2 Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) em pacientes com leucemia aguda .....	36
	5.3 Angiotensina II e Angiotensina-(1-7), características e desfechos dos pacientes com leucemia aguda .....	38
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	41

<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1. Introdução

As leucemias agudas representam aproximadamente 30% das neoplasias na infância e são o câncer mais comum entre crianças [1]. A fisiopatologia da doença caracteriza-se por uma alteração na proliferação clonal das células de linhagem linfocítica ou mielocítica, gerando um acúmulo de células na medula em estágios precoces da maturação. Essas células são denominadas blastos e se acumulam na medula óssea substituindo a população de células normais por células doentes. Aproximadamente 80% das leucemias agudas na infância são representadas por alterações de linhagem linfocítica - Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), enquanto 15% são por alterações de linhagem mielocítica - Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). Uma pequena porcentagem dessas leucemias pode apresentar-se como bifenotípica ou sofrer mudança de classificação durante o tratamento. As neoplasias infanto-juvenis caracterizam-se por apresentarem curtos períodos de latência, maior agressividade na apresentação e crescimento acelerado em relação à doença no adulto. Por outro lado, respondem melhor ao tratamento e são consideradas, na maior parte das vezes, de bom prognóstico [2]

Nos últimos 50 anos, a taxa de sobrevivência dos pacientes pediátricos com leucemias agudas passou de menos de 10% para 80-90% [3]. Este sucesso deve ser atribuído aos avanços na eficácia de regimes quimioterápicos multiagentes e à estratificação da intensidade do tratamento de acordo com fatores de risco individuais apresentados por cada paciente. Estes fatores, que são preditivos de risco de recaída, são definidos por: características clínicas do paciente, características moleculares e genéticas das células leucêmicas e nível de resposta precoce ao tratamento [3].

O tratamento responsável por garantir a alta taxa de sobrevida desses pacientes consiste em quimioterápicos antineoplásicos, que visam à destruição das células do câncer pela sua atuação sistêmica. Esses quimioterápicos atuam com baixa especificidade, atuando sobre quaisquer células do corpo (neoplásicas ou sadias) que apresentem alta atividade mitótica e ciclo celular curto, o que implica sua alta toxicidade.

Aproximadamente 1-2% das crianças com LLA morrem antes de atingirem a remissão e outros 1-2% morrem dos efeitos tóxicos do tratamento durante a remissão [4]. Entre as principais complicações precoces e tardias do tratamento, estão os quadros de sepse em pacientes neutropênicos, a osteonecrose, a toxicidade neurológica, cardíaca, endócrina e renal, além do aumento do risco de desenvolvimento de uma segunda neoplasia durante a vida [4].



Neste cenário, surgiram nas últimas décadas, uma série de estudos [5,6,7] visando o desenvolvimento de regimes de tratamentos para a leucemia aguda na infância que mantivessem a eficácia e as altas taxas de cura dos regimes vigentes, mas oferecessem menor toxicidade e menor risco de efeitos colaterais a curto e longo prazo.

Além disso, existe um grupo restrito de crianças com o diagnóstico de leucemia em sua forma refratária ou que apresentam recaída que permanecem com prognóstico reservado, e que poderiam possivelmente se beneficiar do surgimento de novos regimes e estratégias terapêuticas. Idealmente, estratégias de tratamento individualizada e otimizadas em crianças e adolescentes com leucemias agudas deverão incluir a quimioterapia tradicional, a imunoterapia e drogas cujos alvos sejam moleculares, no sentido de obter um efeito sinérgico da combinação dessas diferentes terapias [8]. O conhecimento sobre a fisiopatologia da doença, as alterações genéticas e moleculares e os mecanismos de resistência às drogas existentes, tornou possível o desenvolvimento, nos últimos anos, de inúmeras drogas que têm como alvo as principais vias moleculares relacionadas ao desenvolvimento da leucemia, do crescimento e da proliferação celular [8]. Dentre as moléculas endógenas, ainda pouco estudadas, que poderiam possivelmente atuar diretamente sobre a proliferação das células neoplásicas leucêmicas está a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)].

A Ang-(1-7) é um hormônio heptapeptídeo endógeno do sistema renina angiotensina (SRA) responsável por coordenar respostas biológicas pela ativação de um único receptor, o receptor Mas, podendo atingir alvos específicos quando utilizada como agente terapêutico. A importância de se investigar o papel da Ang-(1-7) nas neoplasias hematológicas se baseia na capacidade deste heptapeptídeo de inibir o crescimento de diversas linhagens celulares [5] e de acelerar a recuperação medular após períodos de aplasia decorrentes da quimioterapia [6].

Estudos prévios associaram a Ang-(1-7) à inibição do crescimento e redução da proliferação de células cancerígenas humanas e em tumores xenográficos, através de uma atuação diversa: reduzindo a angiogênese, a fibrose associada ao câncer, a osteoclastogênese, as inflamações induzidas por tumor e as metástases [5,7].

A Ang-(1-7) atua na redução da angiogênese, diretamente relacionada à agressividade do crescimento das células neoplásicas, por meio da ativação do receptor Mas [7]. Uma vez ativado, o receptor Mas desencadeia diferentes mecanismos: estimula a produção de óxido nítrico, a redução dos fatores de crescimento endotelial vascular do tipo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e PlGF (fator de crescimento placentário) e o aumento da expressão de receptores do tipo SFlt-1 decoy (receptor de fator de crescimento endotelial vascular solúvel) nas células malignas [7]. O óxido nítrico (NO) é responsável por inibir o

crescimento tumoral, a angiogênese, a migração das células neoplásicas e as metástases em determinadas neoplasias [9].

Os fatores de crescimento endotelial vascular do tipo VEGF e PlGF são essenciais para o processo de angiogênese tumoral, através da indução da vasodilatação, do aumento da permeabilidade vascular e do estímulo ao crescimento e à migração celular [10].

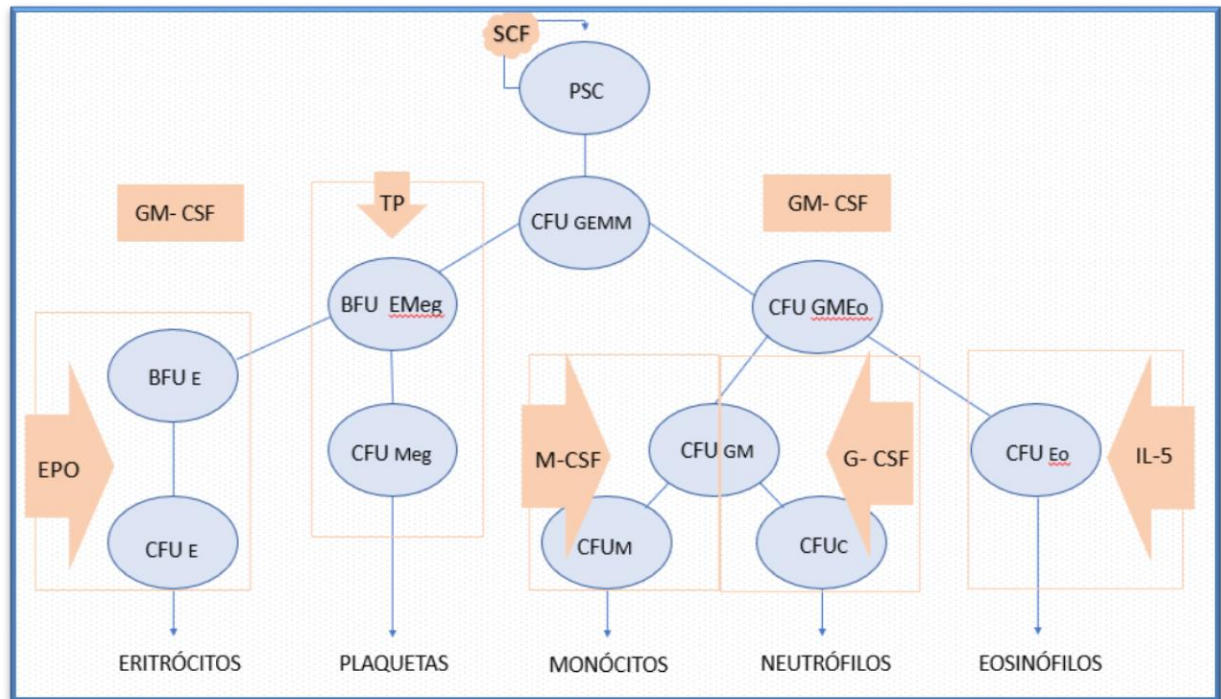
Os receptores do tipo SFlt-1 decoy são reconhecidamente presentes em abundância em células malignas, e seu papel na redução da angiogênese consiste na sua capacidade de reconhecer e se ligar especificamente a fatores de crescimento e citocinas, inibindo-os [11].

Uma série de estudos [12,13,14] mostrou a atuação da Ang-(1-7) na inibição do crescimento de células cancerígenas diversas pela redução da atividade da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e das prostaglandinas inflamatórias. A inibição da COX-2 [15] reduz diretamente a formação de prostaglandina E2(PGE-2) no tecido tumoral, prevenindo a estimulação do VEGF, responsável por induzir a angiogênese e estimular indiretamente o crescimento e expansão da célula neoplásica.

Estudos feitos com células cancerígenas de linhagem pulmonar e prostática [7,16] demonstraram uma inibição do crescimento dessas células associada a uma redução da expressão de Ki67, um marcador de proliferação celular específico, quando incubadas com heptapeptídeo Ang-(1-7).

Outro estudo [6] mostrou que a Ang-(1-7) acelera a recuperação hematopoiética no sangue periférico e na medula óssea após a quimioterapia. A atuação do heptapeptídeo parece ocorrer em sinergia com fatores de crescimento multi-linhagem previamente existentes, incrementando o efeito proliferativo sobre progenitores medulares mielóides (CFU-GM), megacariocíticos (CFU-MEG), eritróides (BFU-E) e progenitores comuns de células mielóides (CFU- GEMM) [6] (**Figura 1**).

Diante dos estudos que demonstram os variados mecanismos de atuação da Ang-(1-7) sobre inibição do crescimento de células neoplásicas em adultos, além do possível efeito benéfico do peptídeo na aceleração da recuperação medular em pacientes oncológicos, é provável que essa molécula possa apresentar também um importante papel no controle e evolução das leucemias agudas em crianças, campo que ainda necessita ser mais estudado [5].



**Figura 1. Diagrama dos fatores de crescimento na hematopoiese normal.** EPO: eritropoietina; TP: trombopoietina; IL: interleucina; SCF: stem cell fator; PSC: célula progenitora pluripotente; CFU: unidade formadora de colônia; GM-CSF: fator de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos; M- CSF: fator de crescimento de colônias de monócitos; G-CSF: fator de crescimento de colônias de granulócitos; BFUe: unidade de colônias eritróides; GEMM: unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos; GEMo: unidade formadora de colônias de eosinófilos (adaptada do livro CARNEIRO, Jorge. Hematologia Pediátrica. São Paulo: Manole, 2013).

## 1.2. Justificativa

Considerando os efeitos benéficos já comprovados da Ang-(1-7) sobre diferentes neoplasias em adultos e os mecanismos de ação diversos pelos quais a molécula exerce essa função, torna-se relevante investigar se a mesma seria capaz de exercer benefícios semelhantes no controle do crescimento de células neoplásicas em crianças portadoras de leucemias agudas. Além disso, alguns estudos demonstraram a capacidade desta molécula de acelerar a recuperação medular em pacientes pós quimioterapia, o que seria de extrema valia para o uso em pediatria, principalmente em pacientes com neoplasias hematológicas e/ou transplantados de medula óssea, os quais muitas vezes têm pior prognóstico associado a complicações decorrentes do período de aplasia medular pós quimioterapia.

A citotoxicidade da quimioterapia está associada a neutropenia intensa, a trombocitopenia e a anemia, condições potencialmente fatais e responsáveis pelo atraso do tratamento. Atualmente, a colônia estimuladora de granulócitos (G-CSF), a eritropoietina (EPO) e a transfusão de concentrado de hemácias e plaquetas são os tratamentos de escolha para as complicações decorrentes da mielossupressão. No entanto, essas são alternativas biológicas, de alto custo e que requerem injeções diárias (no caso da G-CSF e da EPO) ou infusões intravenosas no ambiente intra-hospitalar. Isto envolve possíveis riscos e efeitos colaterais, além da necessidade de hospitalização em uma parte dos casos. A possibilidade de que exista uma formulação oral [6], de administração fácil e com baixa potencialidade tóxica, seria uma alternativa promissora para essa fase do tratamento dos pacientes com leucemias agudas.

O fato da molécula de Ang-(1-7) ser um peptídeo natural produzido pelo corpo humano permite que, se usada de maneira terapêutica, ela possa agir com alta especificidade e seletividade em células alvo. Isto reduziria a incidência de efeitos tóxicos adversos, quando comparada a outras terapias [17].

Os diversos mecanismos de ação desta molécula comprovados previamente em adultos, bem como seu perfil de segurança, alta tolerância e baixo risco de efeitos colaterais [5], sugerem a possibilidade de que a mesma poderia ser usada na prática pediátrica. A molécula poderia potencialmente atuar como tratamento principal ou adjuvante em diversos estágios de doenças onco-hematológicas de pacientes pediátricos. É razoável pensar que esse tratamento poderia oferecer um melhor e mais rápido controle da doença, uma maior eficácia na resposta ao tratamento quimioterápico, a redução da chance de recaídas e a aceleração da recuperação medular e celular após blocos de quimioterapia, reduzindo, dessa forma, as principais complicações decorrentes da doença e do seu tratamento.

Essas características fazem com que, caso seja demonstrado os efeitos benéficos da molécula nas crianças portadoras de leucemias agudas, ela possa ser uma terapia adjuvante ou principal promissora para o uso neste grupo de pacientes.

Para tanto, este estudo foi realizado em um primeiro momento para avaliar por meio da mensuração dos níveis circulantes de componentes do SRA, incluindo a Ang-(1-7) e Angiotensina II (Ang II) em pacientes pediátricos portadores de leucemia agudas, se existe alguma associação entre as concentrações dessas moléculas e as características clínicas da doença, bem como sua resposta à quimioterapia, evolução, complicações, desfecho, entre outras.

Foi realizada também a comparação entre as concentrações das duas principais moléculas do SRA, Ang II e Ang-(1-7), nos pacientes portadores de leucemias agudas com as mesmas moléculas dosadas em crianças saudáveis, pareadas por sexo e idade.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda**

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica na qual ocorre o acúmulo clonal anormal de linfócitos imaturos na medula óssea. Os linfócitos imaturos se proliferam e se diferenciam atipicamente dentro da medula óssea, substituindo as células saudáveis, tendo como consequências a anemia, neutropenia e trombocitopenia [3]. A doença é a neoplasia maligna mais comum em crianças e adolescentes, embora tenha uma taxa de sobrevivência de quase 90% [3].

A LLA tipo B é responsável por 85% dos casos de leucemia linfoblástica na infância enquanto os 15% restantes são de linhagem de células T [3]. Em uma parcela pequena desses pacientes, modificações de reguladores epigenéticos e modificadores de cromatina podem contribuir para refratariedade ao tratamento e maior risco de recaídas, sendo esses pacientes gravemente afetados [3, 4]. A LLA recidivante é a principal causa de morte em oncologia pediátrica e ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes com diagnóstico primário [3]. Destes, 50-70% conseguirão atingir uma segunda remissão, mas apenas 20-30% serão curados [3].

Como outras neoplasias hematopoiéticas, a LLA é causada principalmente por mutações [18]. A LLA possui duas linhagens, B e T que possuem processos fisiopatológicos específicos e parcialmente elucidados. Pode-se geralmente supor que os processos de iniciação da

leucemogênese na LLA são translocações cromossômicas e rearranjos intra cromossômicos. A translocação pode ocorrer pela realocação de oncogenes em regiões reguladoras de genes ativamente transcritos ou justapondo dois genes, ambos mecanismos resultando em expressão anormal de proteínas [18].

Um estudo [19] sobre o cenário genômico das leucemias linfoblásticas agudas infantis com alta hiperdiploidia demonstrou um ganho não aleatório dos cromossomos X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21, com trissomias ou tetrassomias individuais sendo observadas em mais de 75% dos pacientes analisados. Nove genes sofreram mutações recorrentes e apresentaram mutações com maior frequência do que o esperado ao acaso, incluindo seis genes associados à leucemia bem conhecidos: KRAS (25%), FLT3 (12%), CREBBP (9,8%), NRAS (9,8%), WHSC1 (5,9%) e PTPN11 (5,9%), dos quais CREBBP e WHSC1 também foram alvo de pequenas deleções em um caso cada. No total, mutações na via de sinalização do receptor tirosina quinase (RTK)-RAS, incluindo nos genes FLT3, NRAS, KRAS e PTPN11, foram observadas em 51% dos casos [19].

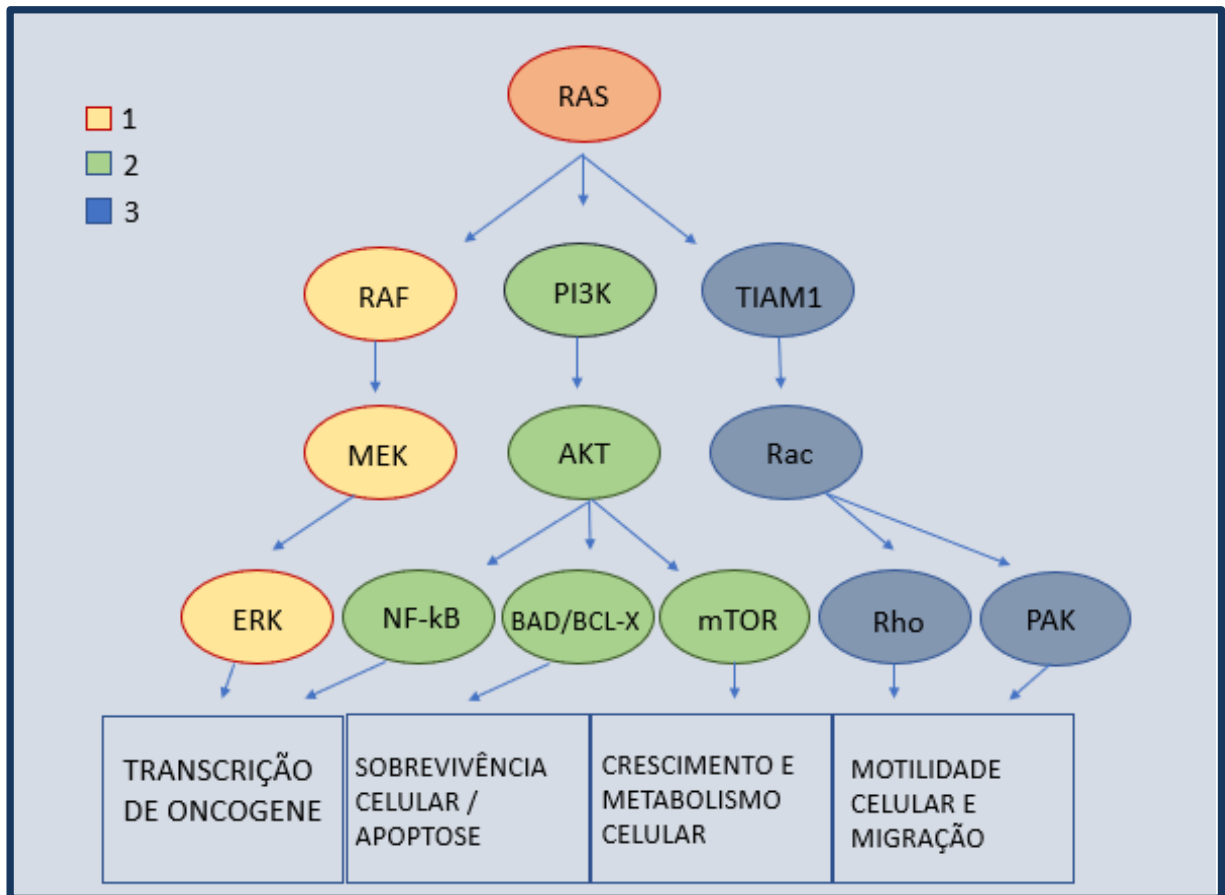
De fato, a família RAS representa alguns dos primeiros oncogenes descritos, sendo sua sinalização controlada através de mecanismos pós-transcricionais que resultam em estados metabólicos e imunológicos que promovem o crescimento, migração, sobrevivência, metástase e plasticidade do câncer [20]. O mecanismo pelo qual os oncogenes RAS atuam é através da ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) definida por um eixo de sinalização RAF-MEK-ERK. Essa via ativa a transcrição de uma série de redes de sinalização proliferativa (impulsionadas por fatores de transcrição da família MYC, FOS, JUN e ETS) que desencadeiam a proliferação de células cancerígenas por meio da promoção da entrada no ciclo celular, angiogênese e sobrevivência [20].

Em segundo lugar, o RAS desempenha um papel importante na ativação da rede de sinalização PI3K-AKT, que promove a transcrição oncogênica através da sinalização NF- $\kappa$ B, evasão da apoptose em decorrência da inibição da enzima pró-apoptótica BAD, e crescimento e metabolismo celular através do mTOR [20].

Em terceiro lugar, a ativação do TIAM1 impulsiona a motilidade e a migração das células cancerígenas através de uma rede dependente de Rac-Rho e Rac-PAX. Além disso, o KRAS também pode mediar a ativação da sinalização Wnt canônica, enquanto suprime as vias Wnt não canônicas para promover o crescimento do tumor.

Por outro lado, alguns subtipos de LLA são caracterizados por outras características citológicas ou genômicas, incluindo diferentes alvos de imunofenótipo, alterações genéticas,

fatores de transcrição, vias de sinalização e regulações epigenéticas [19]. Os mecanismos mais específicos e relevantes serão discutidos a seguir.



**Figura 2. Via RAS no câncer.** (1) Ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) através do eixo de sinalização RAF-MEK-ERK, gerando ativação de redes de sinalização proliferativa que desencadeiam a proliferação de células cancerígenas. (2) Ativação da rede de sinalização PI3K-AKT, promovendo transcrição oncogênica através da sinalização NF-κB, evasão da apoptose em decorrência da inibição da enzima pró-apoptótica BAD, e crescimento e metabolismo celular através do mTOR. (3) Ativação do TIAM1 impulsionando a motilidade e a migração das células cancerígenas através de uma rede dependente de Rac-Rho e Rac-PAK. (Imagem adaptada de Gimple, R. C.; Wang, X. RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Front. Oncol.* 2019, 9, 965).

### 2.1.1. Tipos B

#### 2.1.1.1. LLA com alta hiperploidia na infância

A hiperdiploidia alta é considerada quando há o ganho de pelo menos cinco cromossomos (51-65 cromossomos) nas células doentes, sendo uma característica presente em 30% de todos os precursores de células B pediátricos da LLA. A avaliação da ploidia celular pode ser realizada pela medição do DNA intracelular, através do cariótipo ou, em casos mais complexos, por hibridização *in situ* por fluorescência interfásica (FISH), responsável por detectar hiperdiploidias ocultas [21].

A hiperploidia alta é isoladamente um marcador de prognóstico favorável, com taxas de sobrevida superiores a 90%, sendo também mais encontrada em pacientes com fatores de melhor prognóstico (idade entre 1 e 10 anos e baixa leucometria ao diagnóstico) [21].

As células leucêmicas hiperdiplóides possuem alta susceptibilidade à apoptose e, além disso, parecem acumular maior quantidade de metabólitos quimioterápicos, o que pode explicar o desfecho favorável comumente observado nesses casos [22].

A maioria dos casos de LLA hiperdiplóide apresenta envolvimento de mutações em genes da via RTK-RAS e de modificadores de histonas, sendo estes alvos atrativos para a possibilidade de novas terapias nestes casos. [19].

#### 2.1.1.2. LLA com rearranjo MLL

Rearranjos do gene KMT2A (histona lisina [K]-Metiltransferase 2A) no cromossomo 11q23, formalmente conhecido como gene da leucemia de linhagem mista (MLL), são encontrados em 5% dos casos de LLA na infância [23].

O gene AF4, agora denominado AFF1, é um dos genes mais frequentemente translocados entre mais de noventa outros genes parceiros conhecidos [24]. O AF4 ativa a transcrição da família de proteínas AF4/LAF4/FMR2 (ALF), relacionada à linfopoiese por seu papel direto na regulação do alongamento transcricional e metilação coordenada de histonas [25]. Este tipo de LLA é altamente agressiva e apresenta distribuição bifásica, com pico de diagnóstico em lactentes menores de um ano (até 80%) e em adultos (aproximadamente 15%) [26]. Frequentemente se apresenta com hiperleucocitose ao diagnóstico, recaída precoce, alta incidência de envolvimento do sistema nervoso central (SNC) e mau prognóstico [23]. Geralmente esses pacientes apresentam baixa resposta a corticoterapia (devido a fosforilação



da anexina A2 induzida pela SRC kinase) e a asparaginase, sendo, no entanto, muito sensíveis a citarabina (devido a aumento na expressão de hENT1) [23].

Alvos terapêuticos potenciais para esses pacientes incluem inibidores de proteossomos, inibidores de FLT3, MEK, HDAC, BCL-2, MCL-1, agentes hipometilantes, inibidores de Dot1L e CDK [23].

### **2.1.1.3. Gene de fusão BCR-ABL1**

O cromossomo Filadelfia (Ph) é um local comum de alterações moleculares associadas às leucemias, e consiste em uma alteração do cromossomo 22, criado a partir da translocação recíproca entre os cromossomos 22 e 9, no braço longo de ambos, levando à recombinação dos genes BCR e ABL1, respectivamente [27].

Essa recombinação gera a proteína de fusão BCR-ABL1 – t(9;22) (q34;q11) [27]. A atividade anormal e aumentada da tirosina quinase (TK), proto-oncogene ABL1, causa alta proliferação, parada de diferenciação e resistência à morte celular [27].

Apesar de ser uma mutação tipicamente associada à leucemia mieloblástica crônica, está moderadamente presente (11-29%) em pacientes adultos com LLA [27], e menos presente em crianças (3-5%) [28]. O prognóstico é inicialmente reservado para ambas as idades, com 22% de sobrevida em 5 anos para adultos entre 15 e 65 anos e menos de 40% de cura em pacientes pediátricos [28, 29].

Apesar disso, a instituição do uso de inibidores de tirosina quinase entre esses pacientes, associada a quimioterapia convencional, apresentou alta eficácia nas LLA Ph+ recém diagnosticadas, aumentando significativamente a taxa de remissão completa desses pacientes (95%) e a taxa de sobrevida dos mesmos em 3 anos após diagnóstico (55%) [30].

### **2.1.2. Tipos T**

A LLA-T é uma forma agressiva de leucemia aguda, mais comum em adultos (25%) do que em crianças (10-15%), com prevalência de 20% de todos os casos de LLA [31,32]. A caracterização genética desta doença é muito heterogênea e anomalias cromossômicas estão presentes em quase todos os pacientes [31]. A LLA T é consequência de um processo complexo no qual ocorre o acúmulo de mutações. Essas mutações têm efeito no controle do crescimento celular, diferenciação celular, proliferação celular e sobrevivência durante a timopoiese [26]. Dentre as mutações, as mutações ativadoras de NOTCH1 ou de perda FBXW7 levam à ativação

constitutiva de NOTCH, que é a principal via oncogênica desta LLA, sendo encontrada em cerca de 80% dos pacientes [31, 33].

Com frequência próxima, as deleções de CDKN2A estão presentes em mais de 70% dos pacientes. As deleções de CDKN2A contribuem para a oncogênese por serem o lócus no braço curto do cromossomo 9 que contém os genes supressores tumorais p12INK4A e p14ARF [32].

A LLA T também tem uma frequência relativamente alta (aproximadamente 50%) de translocações cromossômicas que colocam os genes do fator de transcrição sob o controle de intensificadores T de linfócitos específicos. Menos frequentemente, as translocações também podem levar à perda de fatores de transcrição relevantes para a supressão tumoral [32].

## **2.2. Leucemias Mieloblásticas Agudas**

A leucemia mieloblástica aguda (LMA) é uma neoplasia maligna decorrente de variações genéticas que levam à proliferação clonal neoplásica descontrolada. A alteração tem origem nas células-tronco hematopoiéticas precursoras da linhagem mieloide, acometendo hemácias, leucócitos e plaquetas e preservando as células B e T. Os casos são, na grande maioria, devidos a anomalias genéticas como anomalias cromossômicas ou mutações isoladas. Menos frequentemente, em indivíduos adultos, a LMA pode estar relacionada à exposição a agentes químicos e terapias anteriores [34], por exemplo topoisomerases II, agentes alquilantes ou radiação [35].

A sobrevida global em crianças com LMA é próxima a 70% [36], mas as recaídas geralmente têm desfechos ruins, com aproximadamente 10% de taxas de cura [37]. Embora regularmente os pacientes adultos não possuam nenhuma anormalidade cromossômica importante [38], as mutações são estabelecidas em mais de 97% dos casos de LMA [39].

Além disso, embora a patogênese e o comportamento da LMA tenham influência direta tanto de alterações somáticas quanto de rearranjos cromossômicos [35], existem algumas anormalidades citogenéticas frequentes, incluindo t (15;17), inversão 16, trissomia 18 e deleções completas ou parciais de cromossomos 5 ou 7 [40]. Geralmente, os efeitos são alterações em regiões de proto-oncogenes como o gene do fator de ligação ao núcleo (CBF), o gene do receptor alfa do ácido retinóico, a família de genes HOX, o gene MLL mencionado anteriormente e outros, gerando uma proteína de fusão anormal ou uma proteína relacionada ao crescimento e diferenciação celular intracelular [40].

## **2.3. Papel do Sistema Renina Angiotensina no câncer humano: mecanismos e vias**

Quase todos os órgãos têm uma expressão funcional do SRA local em graus variáveis. Evidências sugerem que certos padrões de ativação e inibição do SRA parecem estar associados com vários tipos de câncer [40,41].

O surgimento do câncer se deve a um desequilíbrio na proliferação e diferenciação celular, bem como em uma falha nos mecanismos de apoptose associados a essas alterações. Neste contexto, o SRA parece atuar no desenvolvimento de cânceres e metástases por meio da modulação de eventos críticos como angiogênese, apoptose, crescimento celular, resposta imune, sinalização celular e deposição de matriz extracelular [43].

O SRA consiste em uma cascata de peptídeos reguladores e contrarreguladores, bem como enzimas e receptores, incluindo receptores de Angiotensina tipo 1 (AT1) e 2 (AT2), receptor de pró-renina e receptor Mas. A ativação do denominado eixo clássico do SRA, formado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), Ang II e receptor tipo 1 de Angiotensina II (AT1), está associada à inflamação, vasoconstrição, angiogênese e fibrose. Em nítido contraste, a ativação do chamado eixo alternativo SRA, composto por enzima conversora de angiotensina II (ECA2), Ang-(1-7) e receptor Mas exibe efeitos opostos [44].

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo endógeno formado a partir da Angiotensina I ou pela ação de ECA2 sobre Ang II [46], que atua através da ligação ao seu receptor Mas [46].

O aumento da atividade do eixo SRA clássico foi demonstrado em várias neoplasias, incluindo câncer de rim, mama, próstata, bexiga, estômago, colo do útero, cérebro, pâncreas, cólon, pulmão, fígado, pele e hematopoiéticas [43]. Por outro lado, a estimulação do eixo ECA2-Ang-(1-7) - receptor Mas parece ter efeitos protetores em vários tipos de câncer. Alguns estudos já demonstraram que a Ang-(1-7) exerce efeitos inibitórios na inflamação e nos mecanismos de crescimento vascular e celular via ativação do receptor Mas [43]. O provável papel antitumoral da Ang-(1-7) deve-se à sua capacidade de inibir o crescimento de várias linhagens celulares [5].

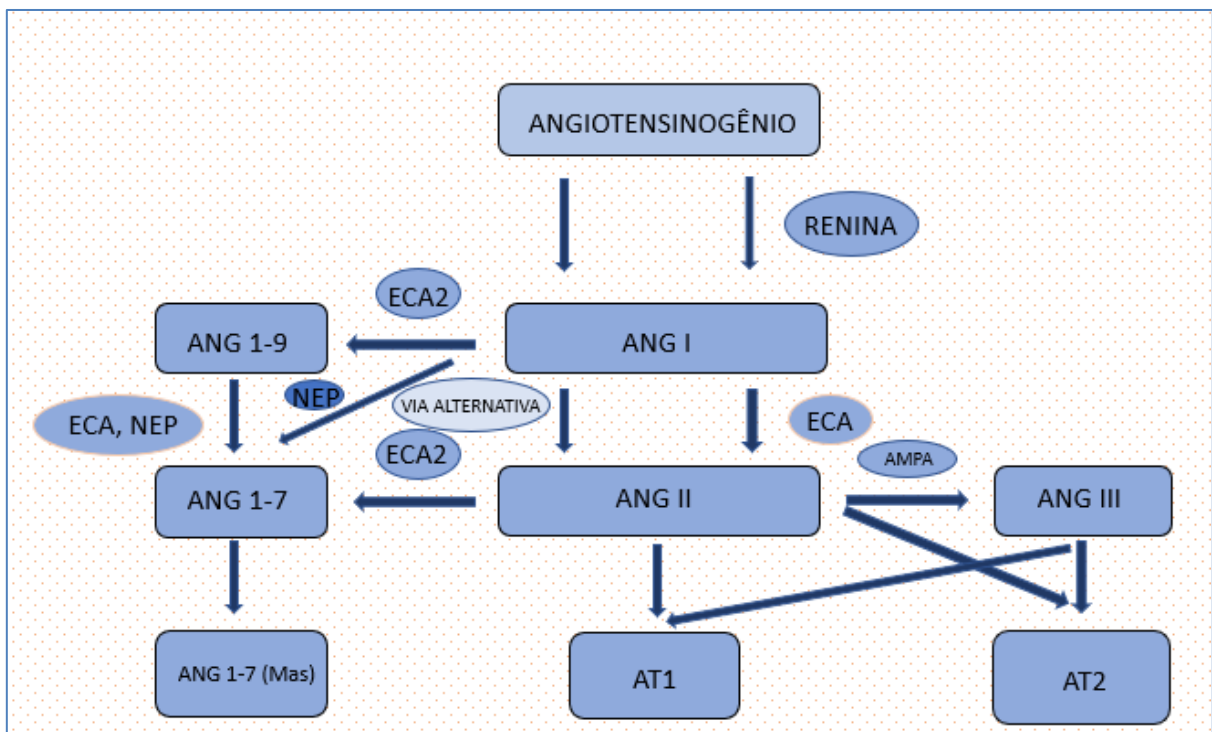
Estudos anteriores associaram a Ang-(1-7) à inibição do crescimento e redução da proliferação de células cancerígenas humanas e em tumores xenográficos. Os mecanismos incluíram a redução da angiogênese, da fibrose associada ao câncer, da inflamação induzida por tumor e da metástase. A ação antiangiogênica da Ang-(1-7) é mediada pela ativação do receptor Mas e está diretamente relacionada à agressividade do crescimento das células neoplásicas [5,6].

As vias de sinalização após a ativação do receptor Mas são a estimulação da liberação de óxido nítrico, a redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de

crescimento placentário (PIGF) e o aumento da expressão de receptores tipo decoy SFlt-1 em células malignas.

O óxido nítrico é responsável por inibir o crescimento tumoral, angiogênese, migração de células neoplásicas e metástases em certos tipos de câncer [7,8]. VEGF e PIGF são essenciais para o processo de angiogênese tumoral por induzir vasodilatação, aumentar a permeabilidade vascular e estimular o crescimento e migração celular [10]. Sabe-se que os receptores chamados SFlt-1 estão presentes em abundância nas células malignas. Esses receptores reduzem a angiogênese por meio de sua capacidade de reconhecer e se ligar especificamente a fatores de crescimento e citocinas [11].

Alguns estudos também mostraram o papel da Ang-(1-7) na inibição do crescimento de diversas células cancerosas, reduzindo a atividade da ciclooxigenase (COX)-2 e das prostaglandinas inflamatórias. A inibição da COX-2 reduz diretamente a formação da prostaglandina E2 (PGE2) no tecido tumoral. A falta de PGE2 reduz o VEGF, conseqüentemente diminuindo a angiogênese e o crescimento e expansão das células neoplásicas [12,13,14].



**Figura 3. Sistema renina angiotensina.** Principal vias de formação das angiotensinas. ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; NEP, endopeptidase neutra; AMPA, aminopeptidase a; ANG, angiotensina; MAS, receptor para angiotensina 1-7; AT1, receptor tipo 1 para angiotensina; AT2, receptor tipo 2 para angiotensina.

## 2.4. Papel do SRA na leucemia

Existem poucos estudos demonstrando a presença de receptores do SRA na medula óssea (MO) [44]. De fato, moléculas do SRA como renina, angiotensinogênio, receptores de angiotensina e enzimas conversoras de angiotensina já foram detectadas na MO. Essas moléculas podem afetar diferentes estágios da hematopoiese por diversas vias, desde a embriogênese [14]. O SRA local parece modular o crescimento de colônias hematopoiéticas, influenciando a produção, proliferação e diferenciação dessas células [44].

Durante a formação das células sanguíneas, o SRA exerce funções como apoptose, proliferação celular, sinalização intracelular, mobilização, angiogênese, fibrose e inflamação [47,48,49,50]. Estudos experimentais realizados em ratos com deleção genética do gene que codifica a ECA deram suporte ao papel modulador do SRA na mielopoiese [51]. Os ratos geneticamente modificados apresentaram mielopoiese anormal, mieloblastos aumentados e mielócitos imaturos, anemia e hematopoiese extramedular com esplenomegalia [51].

N-Acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) é um tetrapeptídeo inibitório também encontrado na medula óssea [52]. AcSDKP inibe a produção de progenitores hematopoiéticos e células tronco hematopoiéticas pluripotentes, impedindo-os de entrar na fase S do ciclo celular. Estudos demonstraram que a ECA inibe o efeito regulador fisiológico do AcSDKP na hematopoiese da medula óssea [52]. Portanto, altos níveis de ECA na medula óssea podem ser responsáveis por uma proliferação excessiva dessas células.

Além disso, a ligação da Ang II aos receptores AT1 estimula a via JAK-STAT, que, por sua vez, aumenta as funções fisiológicas da eritropoietina, trombopoietina e outras citocinas hematopoiéticas durante a hematopoiese normal e em doenças mieloproliferativas [44].

Por outro lado, a ativação dos receptores AT2 pela Ang II resulta em efeitos opostos [44]. A via JAK-STAT é usada por membros da superfamília de receptores de citocinas, incluindo citocinas clinicamente envolvidas na ativação dos fatores estimuladores de colônias de granulócitos (GCSF), eritropoietina, trombopoietina, os interferons e inúmeras interleucinas, tornando essa via central para a biologia das células hematopoiéticas e a terapia hematológica [53].

A expressão de JAKs deficiente em quinase ou a introdução de mutações que impedem a ligação e ativação de JAK, abole a sinalização proliferativa e antiapoptótica de vários outros receptores de citocinas [54]. As STATs são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que se tornam ativados após o recrutamento para um complexo receptor ativado. A inativação direcionada de genes STAT em estudos *in vitro* também resultou em efeitos deletérios no desenvolvimento e função das células hematopoiéticas [53].

A Ang II também pode produzir danos no DNA como quebras de fita simples e dupla. Nesse sentido, existem estudos propondo a administração de Candesartan, um bloqueador do receptor AT1, para prevenir todos os tipos de lesões celulares e de DNA associados à ativação do receptor AT1 pela Ang II [55]. Por outro lado, a Ang-(1-7) parece exercer efeitos benéficos em cânceres hematológicos. Um estudo demonstrou a possibilidade da Ang-(1-7) acelerar a recuperação da hematopoiese em situações de aplasia de medula óssea após quimioterapia [6]. De fato, neste estudo, a Ang-(1-7) estimulou a recuperação hematopoiética no sangue periférico e na medula óssea de pacientes aplasiados pós bloco de quimioterapia [6].

O papel do heptapeptídeo parece ocorrer em sinergia com fatores de crescimento multilinhagem previamente existentes, aumentando o efeito proliferativo de progenitores medulares mielóides (CFU-GM), megacariócitos (CFU-MEG), eritróides (BFU-E) e progenitores celulares comuns mielóides (CFU-GEMM). Este efeito seria extremamente importante para reduzir as comorbidades associadas à quimioterapia [6].

Considerando os variados mecanismos de ação da Ang-(1-7) na inibição do crescimento de células neoplásicas, além do possível efeito benéfico do peptídeo na aceleração da recuperação da medula óssea em pacientes com câncer, é provável que esta molécula também possa desempenhar um papel importante no controle da disseminação do câncer e das comorbidades associadas às leucemias agudas.

## **2.5. Evidências epidemiológicas**

Uma série de evidências emergentes suportam uma associação entre o SRA e a leucemia. A enzima conversora de angiotensina (ECA) é superexpressa em células blásticas mielóides leucêmicas [56]. A incubação *in vitro* de células de leucemia promielocítica (LPM) com Enalapril, um inibidor da ECA, diminuiu o crescimento e a capacidade de formação de colônias das células de maneira dose-dependente [57].

Um estudo demonstrou que a adição do peptídeo Ang II às células CD34+ estimulou a unidade-granulócito-macrófago formadora de colônia e a unidade-eritróide formadora de explosão [58]. Outro estudo evidenciou que a infusão crônica de Ang II em camundongos regulou positivamente a proliferação de células-tronco hematopoiéticas (CTH) medulares, mediada pela ativação de receptor AT1. O mesmo estudo demonstrou ainda a ação da Ang II em acelerar a diferenciação de células tronco para linhagem mielóide, bem como em aumentar a expressão de receptores do tipo AT1 em medula óssea e baço [59].

Em contrapartida, o principal mediador do eixo alternativo do SRA, Ang-(1-7), reduziu a anemia, linfopenia e trombocitopenia em pacientes com câncer recebendo doxorubicina e ciclofosfamida em um ensaio clínico de fase I/IIa [17]. O heptapeptídeo também diminuiu a incidência e a gravidade da trombocitopenia em pacientes que receberam uma combinação de gencitabina e quimioterapia à base de platina, permitindo a ausência de atraso na entrega das doses programadas de quimioterapia em um estudo de fase IIb [60]. Esse achado sugere um potencial benefício da Ang-(1-7) na recuperação de pacientes em quimioterapia.

Um análogo de Ang-(1-7), Nle3-A (1-7), foi desenvolvido para uso tópico. Formulações de  $\beta$ -ciclodextrina com este análogo de Ang-(1-7),  $\beta$ -CD:Nle3-A (1-7), foram preparadas por liofilização para uso oral em um estudo [6]. A  $\beta$ -CD:Nle3-A (1-7) foi capaz de aumentar o número de colônias de linhagens hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais (CTMs). No entanto, a administração combinada de  $\beta$ -CD:Nle3-A (1-7) e um bloqueador do receptor de AT1 resultou em colônias progenitoras comparáveis aos grupos tratados com placebo. Esses efeitos em populações progenitoras fornecem um potencial mecanismo de ação de  $\beta$ -CD:Nle3-A (1-7) oral e provavelmente podem explicar as diferenças entre os efeitos dos antagonistas de receptores angiotensinérgicos tipo 1 (BRAs) e Nle3-A (1-7) nos leucócitos. O uso de BRAs demonstrou que os efeitos hematológicos de Ang-(1-7) e Nle3-A (1-7) em leucócitos e populações progenitoras não podem ser reproduzidos pela redução da ação da Ang II a partir do bloqueio dos receptores AT1 [6].

A Ang II pode ser pró tumorigênica *in vitro* e *in vivo* [61,62]. Em diferentes modelos experimentais de tumores quimicamente induzidos em camundongos, a deleção do gene que codifica a Ang II retardou o crescimento do tumor [63,64] por meio de um efeito indireto no metabolismo do carcinógeno, sem afetar diretamente a progressão do câncer.

Outra via pela qual o SRA pode influenciar a carcinogênese é por meio do óxido nítrico (NO). O NO está associado à angiogênese [65], que é um mecanismo essencial para a sobrevivência das células neoplásicas. O efeito de promoção de crescimento vasogênico do NO está ligado à geração de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) no endotélio cultivado [66]. Todos os componentes celulares tumorais são capazes de produzir e liberar NO, influenciando mutuamente as células tumorais, estromais, inflamatórias e endoteliais. Uma associação positiva da expressão da NO sintase (NOS) com a progressão do tumor foi relatada em vários modelos de tumores humanos [67,68]. Fortalecendo essa hipótese, a administração de um inibidor seletivo de NOS (iNOS) limitou o crescimento *in vivo* de adenocarcinoma de cólon humano e adenocarcinoma mamário em camundongos [69].

Dessa forma, várias evidências suportam um papel do NO na angiogênese tumoral. Nesse contexto, a Ang-(1-7) pode se opor a muitas ações da Ang II, atuando através do seu receptor acoplado à proteína G (GPCR), receptor Mas. A Ang-(1-7) promove a liberação de NO e prostaglandinas, causando vasodilatação e inibição do crescimento celular [70]. A Ang-(1-7) foi administrada em estudos de fase I/II [71,17], sem relatos de toxicidade limitante de dose. A Ang-(1-7) foi testada como um potencial agente antiproliferativo e antiangiogênico para pacientes com câncer avançado refratário à terapia padrão e como agente hematopoiético para pacientes com citopenias multilinhagem após quimioterapia [72].

Um estudo analisou a expressão das moléculas do SRA (renina, angiotensinogênio e ECA) em pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de Imatinibe (inibidor de tirosina quinase), demonstrando que o SRA-hematopoiético afeta a produção de células neoplásicas nas leucemias mieloblásticas crônicas, o que pode ser alterado pela administração de um inibidor de tirosina quinase, especificamente o Mesilato de Imatinibe. Pacientes com LMC *de novo* apresentaram aumento de ECA, angiotensinogênio e RNA mensageiro para renina, com alteração da expressão dessas moléculas após uso do inibidor de tirosina quinase [73].

Um estudo de coorte retrospectivo sugeriu que pacientes em uso de bloqueadores de receptor de Angiotensina II (BRAs) apresentavam menor risco de alguns tipos de cânceres. No entanto, esses efeitos não foram clinicamente demonstrados, e uso de BRAs teve um efeito neutro na incidência de câncer [74]. Além disso, não foram observados aumentos significativos na incidência de câncer quando comparados o uso de BRAs com placebo ou com inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) em uma metanálise [74].

Nesse contexto, o presente estudo pretende, como etapa inicial de investigação, avaliar as concentrações sanguíneas dos principais mediadores do SRA, Ang II e Ang-(1-7) em pacientes pediátricos com leucemias agudas, comparando com as mesmas dosagens em crianças e adolescentes saudáveis pareados por idade e sexo com os pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste projeto é avaliar as concentrações sanguíneas dos principais mediadores do SRA, Ang II e Ang-(1-7) em pacientes pediátricos com leucemias agudas, comparando com as mesmas dosagens em crianças e adolescentes saudáveis pareados por idade e sexo com os pacientes.



### **3.2. Objetivos específicos**

- i. Mensurar componentes do SRA em amostras de sangue dos pacientes pediátricos com leucemias agudas e em crianças e adolescentes saudáveis pareados por sexo e idade (grupo controle).
- ii. Avaliar possíveis associações/correlações entre os biomarcadores estudados e a variabilidade da resposta clínica e laboratorial ao tratamento quimioterápico apresentada pelo grupo de pacientes pediátricos com leucemias agudas.
- iii. Comparar os resultados obtidos para as dosagens de moléculas do SRA entre os dois grupos: pacientes pediátricos com leucemias agudas e controles saudáveis.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento e local do estudo**

Trata-se de estudo transversal cujo desfecho primário de interesse foi a dosagem sérica das moléculas de Ang II e Ang-(1-7) em pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia aguda em acompanhamento no serviço de Hematologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG). O grupo controle consistiu em pacientes pediátricos saudáveis acompanhados regularmente pelo serviço de Pediatria do HC-UFMG, pareados por sexo e por idade. A mensuração das concentrações séricas das moléculas do SRA foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM).

### **4.2. Casuística**

O estudo foi realizado em pacientes pediátricos com idade entre 6 meses e 16 anos ao diagnóstico, em acompanhamento regular no ambulatório de Hematologia Pediátrica da UFMG. O estudo incluiu todos os pacientes com diagnóstico recente de leucemia aguda admitidos no serviço entre os meses de julho de 2021 e janeiro de 2022, bem como pacientes com leucemia aguda que já estavam em acompanhamento neste serviço desde o ano de 2018, e concordaram em participar da pesquisa. O critério principal para a seleção foi pacientes que apresentavam diagnóstico de leucemia aguda confirmado por imunofenotipagem, assim como controles saudáveis em acompanhamento regular no ambulatório de Pediatria Geral da UFMG pareados por sexo e idade.

Foram realizadas dosagens de Ang II e Ang-(1-7) nas amostras de sangue medular e periférico obtidas dos pacientes que participaram do estudo, bem como em amostras de sangue periférico dos controles saudáveis.

### **4.3. Critérios de inclusão**

Os seguintes critérios foram adotados para inclusão dos participantes neste estudo: (i) pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia aguda, com idade entre 6 meses e 16 anos, acompanhados no serviço de Hematologia Pediátrica do HC-UFGM de maneira regular, (ii) confirmação do diagnóstico através de imunofenotipagem do diagnóstico de leucemia aguda e (iii) consentimento para participação por meio de assinatura do termo de consentimento (ANEXO 1) e termo de assentimento (ANEXO 2).

### **4.4. Critérios de exclusão**

Os seguintes critérios de exclusão foram adotados neste estudo: (i) pacientes com diagnóstico de leucemias crônicas ou outras alterações medulares diferentes de leucemias agudas, (ii) pacientes ou familiares que não aceitaram participar do estudo e (iii) pacientes com idade superior a 16 anos ao diagnóstico.

### **4.5. Dosagem sanguínea de angiotensinas**

Coletou-se sangue medular e/ou venoso periférico de todos os participantes. As amostras foram colocadas em tubos a vácuo com heparina e centrifugadas duas vezes a 1.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então coletado e armazenado a -70°C até o seu processamento. Foram utilizados *kits* de imunoensaio enzimático com um único antígeno (ELISA) sanduíche quantitativo para dosar os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (catálogo #MBS084052) e Ang II (#MBS028394), seguindo as instruções do fabricante (MyBioSource, 22 San Diego, CA, Estados Unidos). As concentrações foram medidas em pg/ml e a sensibilidade reportada para ambos os analitos é de 2,0 pg/ml. Todas as amostras foram analisadas em um só ensaio para evitar a influência da variabilidade entre ensaios. Nossa variabilidade intra-ensaio foi menor que 3%.

Além dos níveis de Ang-(1-7) e Ang II dosados, a razão Ang-(1-7) /Ang II foi calculada como parâmetro do equilíbrio entre os eixos alternativo e clássico do SRA. Foram também analisadas as potenciais diferenças entre os resultados obtidos em amostras de sangue periférico e medular dos pacientes em estudo, visando identificar diferenças de concentração- que poderiam refletir, diferenças na concentração de Ang II e Ang-(1-7) nos tecidos periférico e medular.

### **4.6. Variáveis clínicas dos pacientes**

Para avaliar se houve alguma associação entre os níveis de Ang II e Ang-(1-7) com as características clínicas dos pacientes, foi realizada análise retrospectiva dos prontuários médicos. As seguintes variáveis foram incluídas: subtipo de LLA, cariótipo, biologia molecular, protocolo terapêutico utilizado, presença de hiperleucocitose ao diagnóstico, ocorrência de intercorrências e desfechos. Os pacientes foram divididos de acordo com a presença de linfoblastos ao diagnóstico no sistema nervoso central (SNC) em três grupos: SNC1 - ausência de blastos; SNC2 – contagem de leucócitos  $< 5/\mu\text{l}$  com presença de blastos e SNC3 – contagem de leucócitos  $\geq 5/\mu\text{l}$  com presença de blastos [78].

#### **4.7. Análise estatística**

As análises estatísticas foram feitas usando o software GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Para avaliar a distribuição normal dos dados, inspecionamos visualmente a distribuição de cada uma das variáveis contínuas, e as submetemos ao teste de Shapiro-Wilk. Com relação às variáveis contínuas, os dois grupos (Leucemia Aguda e controle) foram comparados por meio do teste U de Mann-Whitney ou Teste-T de Student não pareado, de acordo com sua distribuição. O teste exato de Fisher e o teste Qui-quadrado foram empregados para comparar variáveis categóricas (binárias) entre os grupos. As correlações entre variáveis foram calculadas usando o coeficiente de Spearman ou Pearson, conforme a distribuição. Quando a amostra do estudo foi subdividida em três categorias, as comparações foram feitas por análise de variância (ANOVA) ou pelo teste de Kruskal Wallis.

#### **4.8. Considerações éticas**

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os pacientes foram convidados a participar do estudo pela equipe de pesquisa. Aqueles que aceitaram participar, foram incluídos no estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Termo de Assentimento. Todas as informações do estudo foram mantidas em sigilo para preservar a identidade dos pacientes e todo material biológico coletado foi utilizado somente para pesquisa (COEP 5.192.807).

## **5. RESULTADOS**

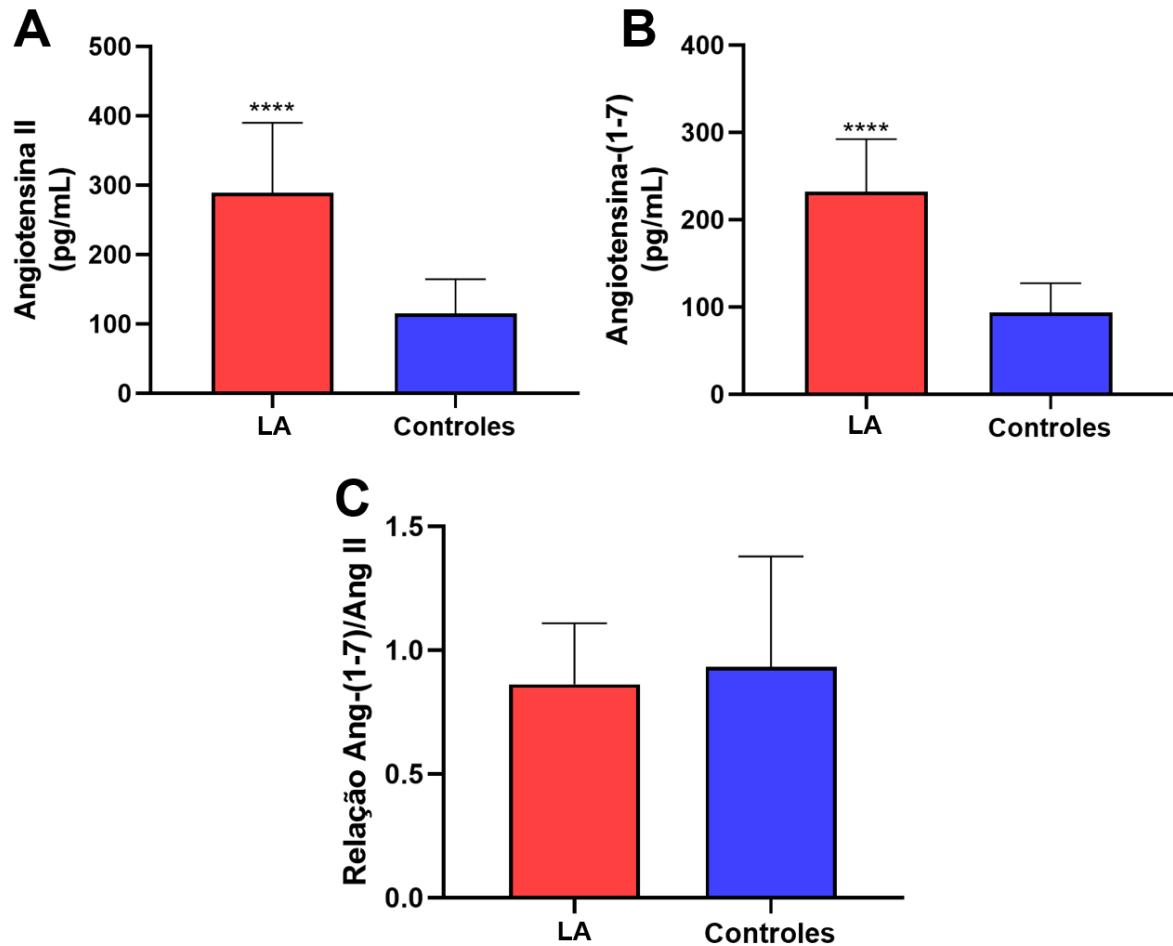
### 5.1. População do estudo

Foram incluídos 11 pacientes com leucemia aguda e 20 controles saudáveis pareados por sexo e por idade. No grupo dos pacientes, 8 (72,7%) eram do sexo masculino. A idade dos participantes variou de 11 meses a 13 anos ( $7,51 \pm 4,74$  anos de idade). As características dos pacientes e controles podem ser vistas na **Tabela 1**. Dos 11 pacientes com diagnóstico de LA, 8 (72,7%) apresentavam LLA B, 2 (18,2%) apresentavam LLA T, e apenas 1 (9,1%) apresentava LMA. Dos 8 pacientes com LLA B, 2 (25%) foram classificados como baixo risco, 3 (37,5%) como risco intermediário e 3 (37,5%) como alto risco. Em relação a classificação de envolvimento de sistema nervoso central (SNC) ao diagnóstico, dos pacientes acompanhados, 7 (63,6%) foram classificados como SNC1, 2 (18,2%) como SNC2 e 2 (18,2%) como SNC3. Apenas 2 (18,1%) pacientes apresentavam hiperplasia ao diagnóstico. O esquema terapêutico mais utilizado foi o BFM 2009 (72,7%), seguido pelo Nopho03 (9,1%) e pelo GBTLI 2009 (9,1%), sendo que, em apenas um (9,1%) paciente, foram realizados dois protocolos distintos, devido a mudança na classificação da doença (Nopho03 e o GBTLI). Com relação ao desfecho clínico, 10 (90,9%) pacientes encontravam-se em remissão morfológica e apenas 1 (9,1%) evoluiu para óbito durante tratamento de indução da doença. Dos pacientes em remissão, 8 (72,7%) permanecem em tratamento quimioterápico segundo protocolo, 1 (9,1%) foi encaminhado para transplante de medula óssea em outra instituição e 2 (18,2%) tiveram quimioterapia suspensa devido à alta toxicidade e morbidade associada, estando em acompanhamento regular no ambulatório, com reavaliação periódica de atividade da doença. As características individuais de cada paciente com leucemia aguda podem ser vistas na **Tabela 2**.

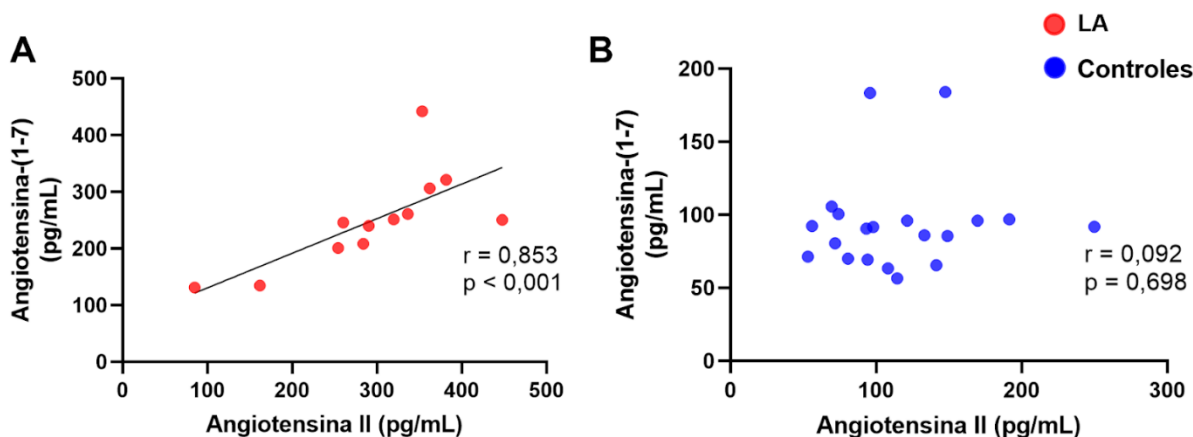
### 5.2 Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) em pacientes com leucemia aguda

Foram dosados os níveis sanguíneos de Ang II e Ang-(1-7) de pacientes com leucemia aguda e controles saudáveis. Foi notado que os pacientes com leucemia aguda apresentaram níveis significativamente mais elevados de ambos os peptídeos quando comparados com os controles saudáveis (**Tabela 1, gráficos 1A e 1B**). No entanto, não foi encontrada diferença significativa da relação Ang-(1-7) /Ang II entre os dois grupos (**Tabela 1, gráfico 1C**). Foi detectada uma correlação forte e positiva entre os níveis de Ang II e de Ang-(1-7) em pacientes com leucemia aguda ( $r = 0,853$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Gráfico 2A**). Resultado similar não foi encontrado nos controles saudáveis (**Gráfico 2B**). Entre os pacientes com leucemia aguda, não

foram observadas diferenças significativas nos níveis de Ang II e Ang-(1-7) e nem da relação Ang-(1-7) /Ang II entre amostras de sangue periférico e sangue medular ( $p > 0,05$  para todas as comparações).



**Gráfico 1.** Dosagem de Angiotensina II (Ang II) e Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. (A) Pacientes com leucemia aguda (LA) apresentam níveis mais elevados de Ang II (pg/mL) e (B) Ang-(1-7) quando comparados com controles saudáveis. (C) Não houve diferença significativa entre a relação Ang II/Ang-(1-7) entre os dois grupos. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



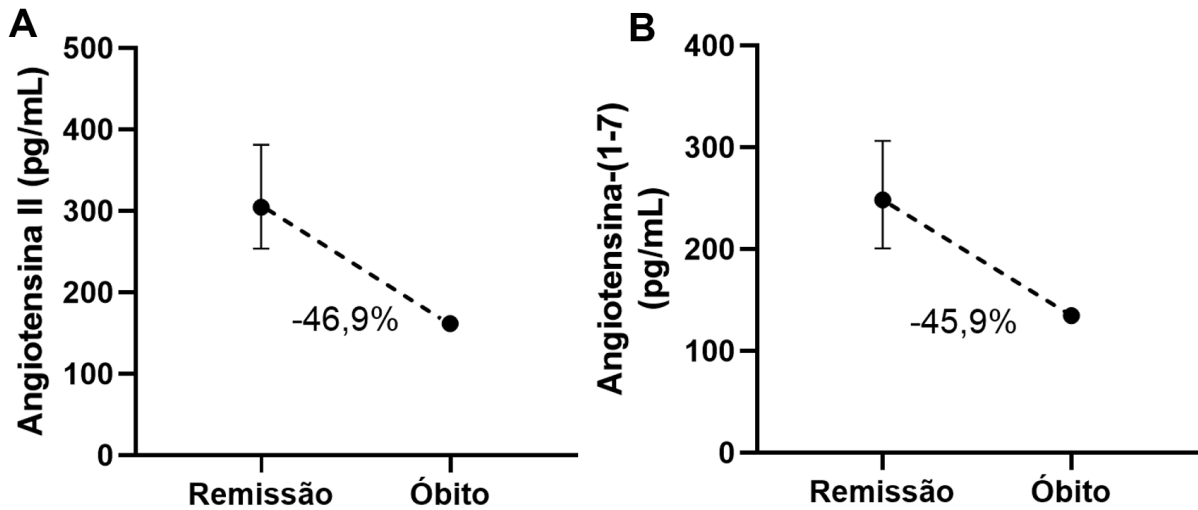
**Gráfico 2.** Correlação dos níveis de Angiotensina II e Angiotensina-1(1-7) no grupo de (A) pacientes com leucemia aguda (LA) e (B) controles saudáveis. Foi notada uma correlação positiva entre os níveis de ambas as moléculas apenas em pacientes com LA.

### 5.3 Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) e características e desfechos dos pacientes com leucemia aguda

Foram realizadas análises quanto aos níveis dos dois peptídeos e diferentes características clínicas dos pacientes com leucemia aguda e controles saudáveis. Como esperado, não foram encontradas diferenças dos níveis de Ang II e de Ang-(1-7) de acordo com o sexo dos pacientes com leucemia aguda e dos controles saudáveis. Contudo, notou-se que houve uma correlação positiva da idade e os níveis de Ang II nos controles saudáveis ( $r = 0,630$ ;  $p = 0,002$ ), resultado esse não encontrado em pacientes com leucemia aguda (**Tabela 3**). Ademais, percebeu-se que apenas nesse grupo de controles saudáveis houve uma correlação negativa da relação Ang-(1-7) /Ang II e idade ( $r = -0,580$ ;  $p = 0,073$ ). Não houve diferença significativa entre os níveis de Ang II e Ang-(1-7), assim como da relação Ang-(1-7) /Ang II, entre os diferentes níveis de acometimento do SNC ( $p > 0,05$ ), assim como entre os pacientes com LLA B, LLA T e LMA ( $p > 0,05$ ). Similarmente, a presença de hiperplasticidade não esteve associada a níveis distintos de nenhum dos peptídeos avaliados e nem de sua relação ( $p > 0,05$ ). Nenhum protocolo de tratamento ou cariótipo foi associado a níveis superiores ou inferiores de Ang II e Ang-(1-7) ( $p > 0,05$ ).

Apenas um paciente (**Tabela 2**, Paciente 4) faleceu durante o período de análise, dificultando a análise do desfecho óbito com relação às dosagens de Ang II e Ang-(1-7). No

entanto, notou-se que esse paciente apresentou níveis sanguíneos de Ang II e Ang-(1-7) inferiores à mediana dos pacientes em remissão (**Gráfico 3**).



**Gráfico 3.** Níveis sanguíneos de (A) angiotensina II (Ang II) e (B) angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] em pacientes com leucemia aguda em remissão comparados com o paciente falecido (Paciente 4). Resultados do paciente em remissão expresso por mediana e intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 1.** Comparação entre pacientes com leucemia aguda (LA) e controles saudáveis.

Variáveis	Pacientes (n = 11)	Controles (n = 20)	valor-p
Sexo (M / F)	8 / 3	12 / 8	0,698
Idade (anos)	7,51 ± 4,74	8,25 ± 3,72	0,634
Ang-(1-7) (pg/mL)	232,1 ± 60,37	93,91 ± 33,62	<0,001
Ang II (pg/mL)	289,3 ± 101,1	115,5 ± 49,22	<0,001
Relação Ang-(1-7)/AngII	0,86 ± 0,24	0,93 ± 0,44	0,984

Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7); Ang II: Angiotensina II; F: feminino; M: masculino. \*Teste de U de Mann Whitney ou Teste-T de Student não pareado. Valores em média ou mediana ± desvio padrão.

**Tabela 2.** Características individuais dos pacientes com leucemia aguda (LA) (n = 12).

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	SNC	Cariótipo	Protocolo	Desfecho
1	1,67	F	LLA B RI hiperleucocitaria	SNC2	46,XX,i(7)(q10)[05]/46,XX[11]	BFM2009	Remissão
2	12,00	F	LLA B AR	SNC1	46,XY	BFM 2009	Remissão
3	5,58	M	LLA pró B MLL+/ Switch hiperleucocitaria	SNC1	46,XX,t(4;11)(q21;q23)/46,XX	GBTLI LLA BFM 2009/Nopho93	TMO
4	1,92	M	LLA early T	SNC1	45,XY,-8[03]/46,XY[12]	BFM 2009	Óbito
5	8,00	M	LLA pré B RI	SNC3	NOMA	BFM2009	Remissão
6	0,92	F	LMA M7 + trissomia do 21	SNC1	47,XY,+21[12]/48,XY,+8,+21[0 8]	Nopho03	Remissão
7	4,42	M	LLA pré B ph+ AR	SNC3	NOMA	BFM2009	Remissão
8	5,92	M	LLA T AR hiperleucocitario	SNC2	NOMA	GBTLI 2009	Remissão
9	6,00	M	LLA B BR	SNC1	NOMA	BFM2009	Remissão
10	16,50	M	LLA B BR	SNC1	NOMA	BFM2009	Remissão
11	8,33	F	LLA B RI	SNC1	NOMA	BFM 2009	Remissão

LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia mieloblástica aguda; F: feminino; NOMA: não foram obtidas metafíses suficientes para análise de cariótipo ao diagnóstico; M: masculino; TMO: transplante de medula óssea; BR: baixo risco; RI: risco intermediário; AR: alto risco; SNC: sistema nervoso central



**Tabela 3.** Correlações entre níveis de angiotensina II (Ang II), angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e relação Ang-(1-7) /Ang II em pacientes com leucemia aguda e controles saudáveis.

Variáveis	Coefficiente rho (r)*	IC95%	valor-p*
<b>Pacientes (n = 11)</b>			
Ang-(1-7) (pg/mL)	-0,081	-0,661 – 0,559	0,817
Ang II (pg/mL)	-0,036	-0,6350 – 0,5896	0,924
Relação Ang-(1-7) /AngII	0,06364	-0,571 – 0,651	0,8603
<b>Controles (n = 20)</b>			
Ang-(1-7) (pg/mL)	-0,130	-0,551 – 0,343	0,582
Ang II (pg/mL)	<b>0,630</b>	<b>0,248 – 0,843</b>	<b>0,002</b>
Relação Ang-(1-7) /AngII	<b>-0,580</b>	<b>-0,818 – -0,171</b>	<b>0,007</b>

Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7); Ang II: Angiotensina II; IC95%: Intervalo de Confiança de 95%.

\*Coeficiente de Spearman

## 6. DISCUSSÃO

As leucemias agudas constituem o grupo de neoplasias mais comuns no período da infância, e, apesar de atualmente apresentar uma taxa de sobrevida em torno de 80%, a doença e as morbidades associadas ao tratamento apresentam grande impacto na qualidade de vida desses pacientes em curto, médio e longo prazo.

A boa resposta ao tratamento e aumento da sobrevida desses pacientes nas últimas décadas deve-se ao maior entendimento da fisiopatologia da doença, assim como dos mecanismos genéticos e moleculares em suas diferentes formas de apresentação.

Este conhecimento tornou possível, nos últimos anos, o desenvolvimento de inúmeras drogas que têm como alvo as vias moleculares associadas ao surgimento, proliferação e manutenção dos clones leucêmicos. Dentre as moléculas que poderiam potencialmente atuar diretamente em cada um desses processos de crescimento e manutenção de células clonais leucêmicas, está a Ang-(1-7).

A Ang-(1-7) é um hormônio heptapeptídeo endógeno do SRA responsável por coordenar respostas biológicas pela ativação de um único receptor, o receptor Mas, podendo atingir alvos específicos quando utilizada como agente terapêutico.

Estudos prévios [5,7] associaram a Ang-(1-7) à inibição do crescimento e redução da proliferação de células cancerígenas humanas e em tumores xenográficos por meio de diversos mecanismos, incluindo redução da angiogênese e da inflamação induzidas pelo tumor e pelas metástases.

Outro estudo [6] mostrou que a Ang-(1-7) acelera a recuperação hematopoiética no sangue periférico e na medula óssea após a quimioterapia, atuando em sinergia com fatores de crescimento multi-linhagem previamente existentes e incrementando o efeito proliferativo sobre progenitores medulares.

O principal objetivo do presente estudo foi mensurar as concentrações de Ang II e Ang-(1-7) no sangue periférico e na medula óssea de crianças portadoras de leucemias agudas. Tais mensurações foram comparadas com as dosagens sanguíneas dos mesmos marcadores no grupo controle, tentando estabelecer relação entre a dosagem dos peptídeos, o perfil de atuação do SRA nesses pacientes e a forma de apresentação, evolução e desfecho da doença.

No nosso estudo, os pacientes com leucemia aguda apresentaram níveis significativamente mais elevados de Ang II e Ang-(1-7) quando comparados com os controles saudáveis, porém não foi encontrada diferença significativa da relação Ang-(1-7) /Ang II entre os dois grupos. Entre os resultados foi encontrada uma correlação positiva da idade e os níveis de Ang II nos controles saudáveis ( $r = 0,630$ ;  $p = 0,002$ ), resultado este não encontrado em pacientes com leucemia aguda. Esse achado é compatível com descrito em estudo prévio que demonstrou aumento dos peptídeos relacionados ao eixo clássico do SRA com aumento da idade [79]. Percebeu-se ainda que apenas nesse grupo de controles saudáveis houve uma correlação negativa da relação Ang-(1-7) /Ang II e idade ( $r = -0,580$ ;  $p = 0,073$ ), corroborando com dados previamente descritos na literatura [76]. O aumento da concentração de Ang II nos pacientes com leucemia em relação ao grupo controle, está compatível com estudo prévio que associou altos níveis de atividade de ECA na medula óssea a uma proliferação excessiva e desordenada de progenitores hematopoiéticos e células tronco hematopoiéticas pluripotentes [52]. Esses achados reforçam ainda a hipótese de que exista uma alteração na homeostase e funcionamento do SRA nos pacientes com diagnóstico de leucemia. A ausência de correlação positiva entre idade e níveis de Ang II nos pacientes com leucemia reforça a hipótese de que as alterações encontradas nas concentrações dos peptídeos nesses pacientes sejam atribuíveis à doença de base. O aumento de Ang II era esperado entre esses pacientes considerando sua ação pro-tumorigênica e pro-inflamatória já demonstrada *in vitro* e *in vivo* [61,62]. O aumento equivalente e proporcional na concentração de ambos os peptídeos nos pacientes sugere um

aumento de Ang-(1-7) decorrente de maior conversão da Ang II pela ECA2, gerando como produto final Ang-(1-7) [77].

Por outro lado, não houve diferença significativa entre os níveis de Ang II e Ang-(1-7), assim como da relação Ang-(1-7) /Ang II, entre os diferentes níveis de acometimento do SNC ( $p > 0,05$ ), o que pode sugerir um baixo envolvimento dessas moléculas no processo de infiltração do SNC desses pacientes. Esses achados diferem do relatado em estudos prévios nos quais relacionou-se a atuação dessas moléculas diretamente à capacidade de tumores sólidos se proliferarem e gerarem metástases [43], bem como à atuação biológica importante de Ang - (1-7) no tecido cerebral [78]. Cabe ressaltar que o tamanho reduzido de nossa amostra de pacientes pediátricos com leucemia aguda pode ter comprometido tal análise.

Também não houve diferença significativa entre os níveis de Ang II e Ang-(1-7) entre os pacientes com LLA B, LLA T e LMA ( $p > 0,05$ ), o que sugere que os mecanismos de atuação e funcionamento do SRA nas neoplasias hematológicas ocorram de maneira semelhantes nos diversos tipos de apresentação da leucemia. Neste caso também, o tamanho amostral reduzido pode ter impedido a detecção de diferenças significativas entre os subgrupos.

A presença de hiperplasticidade ao diagnóstico não esteve associada a níveis distintos de nenhum dos peptídeos avaliados e nem de sua relação ( $p > 0,05$ ). Nenhum protocolo de tratamento ou cariótipo foi associado a níveis superiores ou inferiores de Ang II e Ang-(1-7) ( $p > 0,05$ ). Dessa maneira, o nosso estudo não permitiu, deste ponto de vista, estabelecimento de relação entre estratificação de risco inicial da doença e perfil de expressão dos peptídeos estudados. Tivemos em nosso estudo apenas um paciente que faleceu. O referido paciente apresentou níveis sanguíneos de Ang II e Ang-(1-7) significativamente inferiores à mediana dos demais pacientes em remissão da doença (**Gráfico 3**), porém consideramos comprometida a análise de desfecho óbito devido ao fato de ter sido apenas um paciente.

Finalmente, entre os pacientes com leucemia aguda, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de Ang II e Ang-(1-7) e nem da relação Ang-(1-7) /Ang II entre amostras de sangue periférico e sangue medular ( $p > 0,05$  para todas as comparações), sugerindo semelhança na expressão de receptores e atuação das moléculas do SRA em nível periférico e medular.

O presente estudo apresentou várias limitações, dentre elas um número amostral relativamente pequeno, devido à especificidade de critério de inclusão para participação. Na concepção deste estudo, planejamos recrutamento de maior número de pacientes e a realização de mais experimentos, como, por exemplo, a dosagem de outras moléculas do SRA. Tais aspectos foram diretamente afetados pelo cenário de pandemia e escassez de recursos

financeiros para pesquisa. Para melhor entendimento da ação dos peptídeos do SRA nas leucemias agudas seria importante um acompanhamento de longo prazo em um número maior de pacientes, bem como da possibilidade de dosagem dessas e de outras moléculas nos tecidos periféricos e medular dos mesmos. Neste caso, a dosagem de ECA2 ou a medida de atividade enzimática, por exemplo, poderia reforçar a hipótese sugerida de aumento de Ang-(1-7) nesses pacientes secundária ao aumento de degradação da Ang II pela ECA2. Além disso, a possibilidade de dosagens dos peptídeos no líquido dos pacientes poderia elucidar melhor o papel deles na infiltração de SNC pela doença de base.

Dessa forma, estudos adicionais são necessários para estabelecermos uma relação segura entre o perfil de expressão e a atuação das moléculas do SRA nos pacientes pediátricos com leucemia aguda.

## 7. CONCLUSÕES

- As concentrações sanguíneas de Ang II e Ang-(1-7) nos pacientes pediátricos com leucemia aguda apresentaram níveis significativamente mais elevados quando comparados com os controles saudáveis.
- Não foi encontrada diferença significativa da relação Ang-(1-7) /Ang II entre os dois grupos estudados.
- Os controles saudáveis apresentaram uma correlação negativa da relação Ang-(1-7) /Ang II e idade ( $r = -0,580$ ;  $p = 0,073$ ). Tal achado não foi detectado no grupo de pacientes com leucemia aguda.
- Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de Ang II e Ang-(1-7) e nem da relação Ang-(1-7) /Ang II entre amostras de sangue periférico e sangue medular.
- Não foi observada relação entre as estratificações de risco e gravidade da doença e o perfil de expressão de Ang II e Ang-(1-7) entre os pacientes com leucemia aguda.

## REFERÊNCIAS

1. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014: Cancer in Children and Adolescents. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. março de 2014;64(2):83–103.
2. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA A Cancer J Clin*. setembro de 2019;69(5):363–85.
3. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, organizador. *N Engl J Med*. 15 de outubro de 2015;373(16):1541–52.
4. Blanco E, Beyene J, Maloney AM, Almeida R, Ethier MC, Winick N, et al. Non-relapse mortality in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Leukemia & Lymphoma*. maio de 2012;53(5):878–85.
5. Gallagher PE, Arter AL, Deng G, Tallant EA. Angiotensin-(1-7): A Peptide Hormone with Anti-Cancer Activity. *CMC*. 11 de maio de 2014;21(21):2417–23.
6. Gaffney K, Weinberg M, Soto M, Louie S, Rodgers K. Development of angiotensin II (1-7) analog as an oral therapeutic for the treatment of chemotherapy-induced myelosuppression. *Haematologica*. dezembro de 2018;103(12):e567–70.
7. Krishnan B, Torti FM, Gallagher PE, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) reduces proliferation and angiogenesis of human prostate cancer xenografts with a decrease in angiogenic factors and an increase in sFlt-1. *Prostate*. janeiro de 2013;73(1):60–70.
8. Kuhlen M, Klusmann JH, Hoell JI. Molecular Approaches to Treating Pediatric Leukemias. *Front Pediatr*. 6 de setembro de 2019;7:368.
9. Hickok J, Thomas D. Nitric Oxide and Cancer Therapy: The Emperor has NO Clothes. *CPD*. 1º de fevereiro de 2010;16(4):381–91.
10. Petty WJ, Aklilu M, Varela VA, Lovato J, Savage PD, Miller AA. Reverse translation of phase I biomarker findings links the activity of angiotensin-(1–7) to repression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in vascular sarcomas. *BMC Cancer*. dezembro de 2012;12(1):404.
11. Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends in Immunology*. junho de 2001;22(6):328–36.
12. Dubinett SM, Sharma S, Huang M, Dohadwala M, Pold M, Mao JT. Cyclooxygenase-2 in Lung Cancer. Em: Dannenberg AJ, DuBois RN, organizadores. *Progress in Experimental Tumor Research* [Internet]. Basel: KARGER; 2003 [citado 24 de julho de 2022]. p. 138–62. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/71371>
13. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW. Aspirin Use and Reduced Risk of Fatal Colon Cancer. *N Engl J Med*. 5 de dezembro de 1991;325(23):1593–6.
14. Logan RF, Little J, Hawtin PG, Hardcastle JD. Effect of aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas: case-control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screening programme. *BMJ*. 31 de julho de 1993;307(6899):285–9.
15. Carvalho WA, Carvalho RDS, Rios-Santos F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. *Rev Bras Anestesiologia*. junho de 2004;54(3):448–64.

16. Gallagher PE. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis*. 3 de junho de 2004;25(11):2045–52.
17. Rodgers KE, Oliver J, diZerega GS. Phase I/II dose escalation study of angiotensin 1-7 [A(1-7)] administered before and after chemotherapy in patients with newly diagnosed breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. maio de 2006;57(5):559–68.
18. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. janeiro de 2009;144(2):147–56.
19. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. junho de 2015;47(6):672–6.
20. Gimple RC, Wang X. RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Front Oncol*. 24 de setembro de 2019;9:965.
21. Dastugue N, Suciú S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 28 de março de 2013;121(13):2415–23.
22. Synold TW, Relling MV, Boyett JM, Rivera GK, Sandlund JT, Mahmoud H, et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1º de novembro de 1994;94(5):1996–2001.
23. El Chaer F, Keng M, Ballen KK. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. abril de 2020;15(2):83–9.
24. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaur G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. fevereiro de 2018;32(2):273–84.
25. Bitoun E, Oliver PL, Davies KE. The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Human Molecular Genetics*. 1º de janeiro de 2007;16(1):92–106.
26. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. abril de 2020;395(10230):1146–62.
27. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. junho de 1973;243(5405):290–3.
28. Pullarkat V, Slovak ML, Kopecky KJ, Forman SJ, Appelbaum FR. Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. *Blood*. 1º de março de 2008;111(5):2563–72.
29. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children’s Oncology Group Study AALL0031. *Leukemia*. julho de 2014;28(7):1467–71.
30. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. dezembro de 2016;35(1):48.
31. Jang W, Park J, Kwon A, Choi H, Kim J, Lee GD, et al. CDKN2B downregulation and other genetic characteristics in T-acute lymphoblastic leukemia. *Exp Mol Med*. janeiro de 2019;51(1):1–15.
32. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1º de outubro de 2012;122(10):3398–406.

33. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science*. 8 de outubro de 2004;306(5694):269–71.
34. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013). 1º de abril de 2020;103(3):38–40.
35. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. ‘Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update’. *Blood Cancer Journal*. julho de 2016;6(7):e441–e441.
36. Elgarten CW, Aplenc R. Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy. *Current Opinion in Pediatrics*. fevereiro de 2020;32(1):57–66.
37. Bose P, Vachhani P, Cortes JE. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options in Oncol*. março de 2017;18(3):17.
38. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 30 de maio de 2013;368(22):2059–74.
39. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 22 de março de 2012;366(12):1079–89.
40. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*. janeiro de 2017;31(1):63–76.
41. Haznedaroğlu IC, Tuncer S, Gürsoy M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. *Medical Hypotheses*. junho de 1996;46(6):507–10.
42. Ciftçiler R, Haznedaroglu IC. Pathobiological Interactions of Local Bone Marrow Renin-Angiotensin System and Central Nervous System in Systemic Arterial Hypertension. *Front Endocrinol*. 7 de agosto de 2020;11:425.
43. Afsar B, Afsar RE, Ertuglu LA, Kuwabara M, Ortiz A, Covic A, et al. Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin Transl Oncol*. abril de 2021;23(4):682–96.
44. Haznedaroglu IC, Malkan UY. Local bone marrow renin-angiotensin system in the genesis of leukemia and other malignancies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. outubro de 2016;20(19):4089–111.
45. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. outubro de 2000;275(43):33238–43.
46. Santos RAS, e Silva ACS, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 8 de julho de 2003;100(14):8258–63.
47. Leung P. The Peptide Hormone Angiotensin II: Its New Functions in Tissues and Organs. *CPPS*. 1º de agosto de 2004;5(4):267–73.
48. Rodgers KE, Xiong S, Steer R, diZerega GS. Effect of Angiotensin II on Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation. *STEM CELLS*. julho de 2000;18(4):287–94.
49. Ellefson DD, diZerega GS, Espinoza T, Roda N, Maldonado S, Rodgers KE. Synergistic effects of co-administration of angiotensin 1–7 and Neupogen on hematopoietic recovery in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. janeiro de 2004;53(1):15–24.
50. Shi RZ, Wang JC, Huang SH, Wang XJ, Li QP. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*. janeiro de 2009;315(1):10–5.

51. Lin C, Datta V, Okwan-Duodu D, Chen X, Fuchs S, Alsabeh R, et al. Angiotensin-converting enzyme is required for normal myelopoiesis. *FASEB j.* abril de 2011;25(4):1145–55.
52. Comte L, Lorgeot V, Volkov L, Allegraud A, Aldigier JC, Praloran V. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril on blood haematopoietic progenitors and Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro concentrations. *Eur J Clin Invest.* setembro de 1997;27(9):788–90.
53. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood.* 1º de janeiro de 2000;95(1):19–29.
54. Miura O, Cleveland JL, Ihle JN. Inactivation of erythropoietin receptor function by point mutations in a region having homology with other cytokine receptors. *Mol Cell Biol.* março de 1993;13(3):1788–95.
55. Schmid U, Stopper H, Schweda F, Queisser N, Schupp N. Angiotensin II Induces DNA Damage in the Kidney. *Cancer Research.* 15 de novembro de 2008;68(22):9239–46.
56. Aksu S, Beyazit Y, Haznedaroglu IC, Canpinar H, Kekilli M, Uner A, et al. Over-expression of angiotensin-converting enzyme (CD 143) on leukemic blasts as a clue for the activated local bone marrow RAS in AML. *Leukemia & Lymphoma.* janeiro de 2006;47(5):891–6.
57. Purclutepe O, Guniz I, Hatice K, Burcin T, Nur S, Cigir A, Buket K, et al. 2012. “Enalapril-Induced Apoptosis of Acute Promyelocytic Leukaemia Cells Involves STAT5A.” *Anticancer Research* 32 (7): 2885–93.
58. de la Grange PB, Ivanovic Z, Leprivey-Lorgeot V, Praloran V. Angiotensin II That Reduces the Colony-Forming Ability of Hematopoietic Progenitors in Serum Free Medium Has an Inverse Effect in Serum-Supplemented Medium. *STEM CELLS.* maio de 2002;20(3):269–71.
59. Kim S, Zingler M, Harrison JK, Scott EW, Cogle CR, Luo D, et al. Angiotensin II Regulation of Proliferation, Differentiation, and Engraftment of Hematopoietic Stem Cells. *Hypertension.* março de 2016;67(3):574–84.
60. Pham H, Schwartz BM, Delmore JE, Reed E, Cruickshank S, Drummond L, et al. Pharmacodynamic stimulation of thrombogenesis by angiotensin (1–7) in recurrent ovarian cancer patients receiving gemcitabine and platinum-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* abril de 2013;71(4):965–72.
61. Unger T, Steckelings UM, Santos RS dos. The protective arm of the renin angiotensin: functional aspects and therapeutic implications. 2015.
62. Clere N, Corre I, Faure S, Guihot AL, Vessières E, Chalopin M, et al. Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *Int J Cancer.* 8 de fevereiro de 2010;127(10):2279–91.
63. Takagi T. Hemizygous mice for the angiotensin II type 2 receptor gene have attenuated susceptibility to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 1º de julho de 2002;23(7):1235–41.
64. Kanehira T, Tani T, Takagi T, Nakano Y, Howard EF, Tamura M. Angiotensin II Type 2 Receptor Gene Deficiency Attenuates Susceptibility to Tobacco-Specific Nitrosamine-Induced Lung Tumorigenesis: Involvement of Transforming Growth Factor- $\beta$ -Dependent Cell Growth Attenuation. *Cancer Research.* 1º de setembro de 2005;65(17):7660–5.
65. Ziche M, Morbidelli L. [No title found]. *Journal of Neuro-Oncology.* 2000;50(1/2):139–48.



66. Ziche M, Morbidelli L, Parenti A, Amerini S, Granger J, and Maggi A. 1993. Substance P Increases Cyclic GMP Levels on Coronary Postcapillary Venular Endothelial Cells. *Life Sciences* 53 (14): PL229–34.
67. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 15 de fevereiro de 1995;55(4):727–30.
68. Klotz T, Bloch W, Volberg C, Engelmann U, Addicks K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. *Cancer.* 15 de maio de 1998;82(10):1897–903.
69. Thomsen LL, Scott JM, Topley P, Knowles RG, Keerie AJ, Frennd AJ. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor. *Cancer Res.* 1º de agosto de 1997;57(15):3300–4.
70. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension.* janeiro de 2007;49(1):185–92.
71. Petty WJ, Miller AA, McCoy TP, Gallagher PE, Tallant EA, Torti FM. Phase I and Pharmacokinetic Study of Angiotensin-(1-7), an Endogenous Antiangiogenic Hormone. *Clinical Cancer Research.* 1º de dezembro de 2009;15(23):7398–404.
72. Rodrigues Prestes TR, Rocha NP, Miranda AS, Teixeira AL, Simoes-e-Silva AC. The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research. *CDT [Internet].* 10 de agosto de 2017 [citado 24 de julho de 2022];18(11). Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/144300/article>
73. Sayitoglu M, Haznedaroğlu I, Hatirnaz O, Erbilgin Y, Aksu S, Koca E, et al. Effects of Imatinib Mesylate on Renin–Angiotensin System (RAS) Activity during the Clinical Course of Chronic Myeloid Leukaemia. *J Int Med Res.* agosto de 2009;37(4):1018–28.
74. Zhao YT, Li PY, Zhang JQ, Wang L, Yi Z. Angiotensin II Receptor Blockers and Cancer Risk: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine.* maio de 2016;95(18):e3600.
75. ALL IC-BFM 2009 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia, August-14-2009.
76. AlGhatrif M, Tanaka T, Moore AZ, Bandinelli S, Lakatta EG, Ferrucci L. Age-associated difference in circulating ACE2, the gateway for SARS-COV-2, in humans: results from the InCHIANTI study. *GeroScience.* abril de 2021;43(2):619–27.
77. Chappell MC, Marshall AC, Alzayadneh EM, Shaltout HA, Diz DI. Update on the Angiotensin Converting Enzyme 2-Angiotensin (1–7)-Mas Receptor Axis: Fetal Programming, Sex Differences, and Intracellular Pathways. *Front Endocrinol [Internet].* 2014 [citado 24 de julho de 2022];4. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00201/abstract>
78. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* junho de 1988;85(11):4095–8.
79. Simões e Silva AC, Lanza K, Palmeira VA, Costa LB, Flynn JT. 2020 update on the renin–angiotensin–aldosterone system in pediatric kidney disease and its interactions with coronavirus. *Pediatr Nephrol.* junho de 2021;36(6):1407–26.

**ANEXOS**

**ANEXO 1- Termo de consentimento**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
Versão 1.0 datada de 08 de Fevereiro de 2020

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do Projeto:** Avaliação de componentes do sistema renina-angiotensina em pacientes pediátricos com diagnóstico de neoplasia

Pesquisadoras responsáveis: Professoras Ana Cristina Simões e Silva, Camila Silva Peres Cancela e Karla Emília de Sá Rodrigues.

Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Telefone: 31 3307 9440

#### INTRODUÇÃO

Estamos convidando seu filho para participar neste estudo porque ele tem uma doença do grupo das doenças onco-hematológicas. As responsáveis por este estudo são as Professoras Ana Cristina Simões e Silva, Camila Silva Peres Cancela e Karla Emília de Sá Rodrigues.

Antes de decidir se você deseja que seu filho participe deste estudo, queremos que você saiba mais de que se trata o estudo. Este é um formulário de consentimento que lhe dará informações sobre o estudo, você deverá assinar este formulário de consentimento se concordar que seu filho participe do estudo. Você receberá uma cópia do consentimento para seus arquivos pessoais.

#### POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

O propósito deste estudo é obter informações sobre crianças e adolescentes com doenças onco-hematológicas durante o seu tratamento, estudar os tipos de tratamento oferecidos, ajudar os médicos a identificar os fatores que favorecem o desenvolvimento de complicações que podem acontecer neste período e colaborar para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento.

#### O QUE MEU FILHO PRECISAREMOS FAZER DURANTE O ESTUDO?

Seu filho será examinado por seu médico conforme rotina da equipe assistencial, essas avaliações não fazem parte do estudo. Durante o tratamento serão obtidas informações sobre seu filho, será realizado o exame médico, e serão colhidos sangue e urina para a realização de exames de laboratório relacionados com o tratamento. Esses exames serão pedidos conforme a orientação de seu médico (da pediatria, da oncologia ou da hematologia) que cuida de seu filho e não são exames extras deste estudo. As informações serão coletadas em um outro formulário além do prontuário como dados do estudo aqui proposto. Seu filho receberá um Número de Identificação de Paciente (NIP). As informações recolhidas não irão conter o nome de seu filho, assim a identidade dele não será revelada.

#### QUANTO TEMPO MEU FILHO FICARÁ NO ESTUDO?

Seu filho permanecerá no estudo até o final do tratamento dele. É importante dizer que o final do tratamento será determinado pela equipe médica de seu filho e não está condicionada a participação neste estudo.

#### QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?

A coleta de sangue pode provocar desconforto, sangramento ou hematomas, onde a agulha penetrar no corpo, da mesma forma que qualquer exame de sangue realizado. Durante a entrevista médica, você poderá se sentir constrangida (o) com os questionamentos do estudo, mas faremos todo o possível para que isso não aconteça.

#### QUAIS OS BENEFÍCIOS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

Os resultados deste estudo ajudarão os médicos a entender melhor as características das crianças com doenças onco-hematológicas. Ajudarão também a avaliar os riscos e os benefícios dos medicamentos administrados durante o tratamento e a descrever as principais anormalidades que possam ocorrer com essas crianças durante o tratamento. Entretanto, nenhum benefício direto pela participação de seu filho neste estudo é garantida.

#### O QUE PODE OCORRER SE EU NÃO CONCORDAR EM PARTICIPAR?

Se você decidir não permitir a participação de seu filho, mesmo assim ele continuará a receber todo o tratamento necessário. Seu filho continuará a ser tratado e acompanhado durante o tempo que for necessário para o tratamento de sua doença.

#### CONFIDENCIALIDADE

Todos os registros serão mantidos em um fichário trancado e eles poderão ser vistos por indivíduos que trabalham neste estudo. Os resultados poderão ser publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos médicos, mas seu filho não será pessoalmente identificado em publicação resultante da informação recolhida neste estudo.

#### HÁ ALGUM CUSTO PARA MIM?

Não há nenhum custo para você relacionado com as visitas clínicas, exames ou testes de laboratório em conexão com o estudo.

#### MEU FILHO RECEBERÁ ALGUM PAGAMENTO?

Nem você nem seu filho receberão qualquer pagamento por participar neste estudo.

#### QUAIS SÃO OS DIREITOS DE MEU FILHO COMO SUJEITOS DA PESQUISA?

A participação neste estudo é completamente voluntária. A qualquer momento você poderá optar por não tomar parte ou por não permitir que seu filho tome parte neste estudo, você também poderá desistir de participar do estudo durante a internação de seu filho.

#### NOVAS DESCOBERTAS OU RESULTADOS DO ESTUDO

Qualquer descoberta de importância que resultar do estudo lhe será transmitida por um membro da equipe. No final, quando os resultados do estudo estiverem prontos, eles serão publicados e a equipe médica que acompanha seu filho será comunicada. Não há garantias de que você ou seu filho sejam comunicados pessoalmente.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
Versão 1.0 datada de 08 de Fevereiro de 2020

O QUE DEVO FAZER SE TIVER PROBLEMAS OU PERGUNTAS?

No caso de perguntas sobre este estudo ou lesão relacionada com a pesquisa, fazer contato com as Professoras Ana Cristina Simões e Silva, Camila Silva Peres Cancela e Karla Emília de Sá Rodrigues, nos tels 3307-9440 ou 3409-9773. Você pode entrar em contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa no tel 34094592 (endereço Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 no Campus Pampulha em Belo Horizonte) caso você tiver dúvidas sobre a condução ética deste estudo.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu li este formulário de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em tomar parte neste estudo. Estou ciente de que meu filho pode sair a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos.

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável (legível)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo estudo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_\_

## ANEXO 2- Termo de assentimento

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
Versão 1.0 datada de 08 de Fevereiro de 2020

### TERMO DE ASSENTIMENTO

**Título do Projeto:** Avaliação de componentes do sistema renina-angiotensina em pacientes pediátricos com diagnóstico de neoplasia

Pesquisadoras responsáveis: Professoras Ana Cristina Simões e Silva, Camila Silva Peres Cancela e Karla Emília de Sá Rodrigues.

Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Telefone: 31 3307 9440

#### INTRODUÇÃO

Estamos convidando você para participar neste estudo porque você tem uma doença do grupo das doenças onco-hematológicas. Antes de decidir se você deseja participar deste estudo, queremos que você saiba mais de que se trata o estudo. Este é um formulário de consentimento que lhe dará informações sobre o estudo, você deverá assinar este documento se concordar que em participar do estudo. Queremos saber sua opinião.

#### POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A razão pela qual estamos realizando este estudo é tentar entender como a sua doença e os medicamentos utilizados afetam seu corpo e os corpos de outras crianças como você. Também vamos estudar como funcionam os medicamentos que você está usando para combater o câncer.

#### QUE ACONTECERÁ COMIGO NESTE ESTUDO?

Se você estiver em nosso estudo, um médico vai fazer um exame físico de você (escutarão seu coração, pulmões e palparão sua barriga) sempre que necessário durante o seu tratamento. Você será pesado e medido para ver como é que está crescendo. Seu médico também fará algumas perguntas a você para saber como é que você se sente. Por favor, esteja certo de fazer qualquer pergunta que você tenha. Durante o tratamento também será necessário fazer exames de sangue e de urina. Estes exames vão nos ajudar a saber como você está. Como você sabe, às vezes quando se faz um exame de sangue pode ser um pouco doloroso. Às vezes ocorre um hematoma ou mesmo um sangramento onde o exame foi feito. Os exames do médico e os exames de sangue farão parte da avaliação de como seu tratamento está indo e não dependem deste estudo.

#### O QUE ACONTECE SE EU NÃO QUISER FICAR NESTE ESTUDO?

Já falamos com os seus pais para ter a autorização deles para que você possa participar deste estudo. Por favor, fale com os seus pais ou com o médico sobre o estudo antes de decidir participar dele. Você pode decidir não participar no estudo, se você não quiser. De qualquer maneira, você deverá continuar sendo internado neste Hospital para seu tratamento.

Se você tiver alguma pergunta, pode fazê-la durante a avaliação do seu médico ou conversar com um dos responsáveis por este estudo. Pode pedir para chamar Professoras Ana Cristina Simões e Silva, Camila Silva Peres Cancela e Karla Emília de Sá Rodrigues.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
Versão 1.0 datada de 08 de Fevereiro de 2020

Se você desejar participar no estudo, escreva seu nome nesta página. Vamos lhe entregar uma via desta folha depois que você a assinar.

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Idade

\_\_\_\_\_  
Grau de escolaridade

\_\_\_\_\_  
Membro da equipe do estudo  
que realizou a entrevista  
de consentimento

\_\_\_\_\_  
Assinatura do membro da equipe

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador principal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador principal

\_\_\_\_\_  
Data

## ANEXO 3- Parecer do COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** MENSURAÇÃO DE MEDIADORES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS PORTADORES DE LEUCEMIAS AGUDAS

**Pesquisador:** Ana Cristina Simões e Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 53250821.0.0000.6348

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.192.807

## Apresentação do Projeto:

**Tipo de estudo:** Será realizado um estudo transversal.

Os participantes da pesquisa serão submetidos à coleta de dados clínicos, laboratoriais e à mensuração de biomarcadores. Amostras de sangue e medula óssea serão coletadas de todos os pacientes com leucemias agudas após consentimento livre e esclarecido para pesquisa de biomarcadores.

**Casística:** Serão avaliados os pacientes com idade até 17 anos, com diagnóstico de leucemias agudas, acompanhados no serviço de hematologia pediátrica do HC-UFMG. Considerando o caráter exploratório do estudo, não há como calcular com exatidão o número de indivíduos a ser estudado, mas estima-se que a população estudada consistirá de 10 a 20 pacientes num período de 02 anos. Serão incluídas 20 crianças e adolescentes saudáveis como grupo controle.

## Critérios de Inclusão

Pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemias agudas que ainda não foram submetidos a tratamento quimioterápico e que concordarem em participar do estudo.

**Critério de Exclusão:** Pacientes que foram submetidos a tratamento quimioterápico ou os pacientes que recusarem a participar da pesquisa em questão

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 4.º Andar 4 Sala 2055 4 Campus Pampulha  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: S.164.755

**Objetivo da Pesquisa:**

**Hipótese:**

Os níveis circulantes de moléculas do SRA podem se associar a desfechos diferentes em pacientes pediátricos com leucemias agudas.

**Objetivo Primário:**

Avallar os níveis circulantes de moléculas do SRA em pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemias agudas.

**Objetivo Secundário:**

Avallar se níveis circulantes de moléculas do SRA podem se associar a variáveis clínicas, laboratoriais e desfechos diferentes em pacientes pediátricos leucemias agudas. Identificar biomarcadores para diagnóstico e prognóstico, além de possíveis novos alvos terapêuticos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Trata-se de estudo que envolve o levantamento de dados a partir de prontuários médicos e dos resultados das dosagens dos biomarcadores que esta pesquisa se propõe. Não serão realizados novos procedimentos, clínicos ou laboratoriais.

Esses dados serão analisados de forma estritamente confidencial. Todas as coletas de amostras biológicas serão realizadas juntamente com coletas de rotina que os pacientes já realizam.

**Benefícios:**

A análise da associação de moléculas do SRA com dados clínicos, laboratoriais e de prognóstico de pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemias agudas atendidos no serviço contribuirá para o conhecimento na área além de ter o potencial de gerar produção intelectual, por meio de publicações de artigos científicos, bem como divulgação e participação em congressos nacionais e internacionais. Além disso, há potencial de o projeto gerar inovação. Em síntese, o desenvolvimento do projeto poderá contribuir para o melhor entendimento do comportamento das leucemias agudas em pacientes pediátricos, a definição de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico e a identificação de potenciais alvos terapêuticos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante para a área de conhecimento

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627, 2º Andar, Sala 2005, Campus Pampulha  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.164.755

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- 1) Folha de rosto preenchida e assinada.
- 2) Aprovação da Câmara Departamental da Pediatría
- 3) Parecer da Gerência de Ensino e Pesquisa-HC .
- 4) Instrumentos de coleta de dados
- 5) Projeto completo
- 6) TCLE como carta convite, resguardando a confidencialidade dos dados, o anonimato, o direito à recusa, e desistir do projeto a qualquer momento sem qualquer prejuízo. Foi informado sobre a metodologia, o objetivo e o armazenamento de 05 anos dos dados, salvaguardando a sua consulta. Esclarece que não haverá qualquer forma de pagamento, mas disponibiliza apoio em caso de gerar algum risco à integridade física, mental ou de qualquer outra natureza ao participante. Consentimento para registro de áudio, vídeo, imagens. Dados do pesquisador e do COEP relacionados.
- 7) Termo de Biorepositório
- 8) TALE

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pelo apresentado somos pela aprovação

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P RQ/ETO_1766228.pdf	09/12/2021 07:33:46		Acelto
Outros	CartarespostaCEP.pdf	09/12/2021 07:33:32	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto
Declaração de Manuseio Material	Termobiorepositorio.pdf	07/12/2021 09:48:31	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - 2ª. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@ppq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.164.755

Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termobiorrepositorio.pdf	07/12/2021 09:48:31	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	07/12/2021 09:48:05	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	07/12/2021 09:47:45	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.pdf	07/12/2021 09:46:49	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto
Parecer Anterior	ParecerGEP.pdf	12/11/2021 16:04:35	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto
Parecer Anterior	ParecerPed.pdf	11/11/2021 13:05:16	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto
Folha de Rosto	FRassinada.pdf	31/05/2021 11:33:07	Ana Cristina Simões e Silva	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreensão da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 14 de Dezembro de 2021

Assinado por:

Crista Carem Palva Fontinha  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 2, Campus Pampulha  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@pppq.ufmg.br