

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

TÂMARA DAUARE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS
SINTÉTICOS DE ALCALOIDES DA CLASSE DOS 3-ALQUILPIRIDÍNICOS
EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA**

Belo Horizonte

2023

TÂMARA DAUARE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS
SINTÉTICOS DE ALCALOIDES DA CLASSE DOS 3-ALQUILPIRIDÍNICOS
EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA**

VERSÃO FINAL

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino.

Coorientadora: Dra. Fernanda Cristina Gontijo Evangelista

Belo Horizonte

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

A447a Almeida, Tâmara Dauare de.
Avaliação do mecanismo de ação citotóxico de análogos sintéticos de alcaloides da classe dos 3-alkilpiridínicos em linhagens celulares humanas de leucemia promielocítica aguda [recurso eletrônico] / Tâmara Dauare de Almeida. – 2023.
1 recurso eletrônico (102 f. : il.) : pdf

Orientador: Adriano de Paula Sabino.
Coorientadora: Fernanda Cristina Gontijo Evangelista.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Leucemia promielocítica aguda – Teses. 2. Quimioterápicos – Teses. 3. Leucemia – Teses. 4. Atividade citotóxica – Teses. 5. Alcaloides – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Evangelista, Fernanda Cristina Gontijo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.99419

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE ALCALOIDES DA CLASSE DOS 3-ALQUILPIRIDÍNICOS EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA"

TÂMARA DAUARE DE ALMEIDA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e sete de fevereiro de dois mil e vinte e três**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Vinícius Gonçalves Maltarollo

UFMG

Elaine Amaral Leite

UFMG

Debora Maria Abrantes Costa

UFMG

Ana Paula Lucas Mota

UFMG

Fernanda Cristina Gontijo Evangelista

Faculdade Pitágoras

Adriano de Paula Sabino - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 12:17, 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 **Vinícius Gonçalves Maltarollo, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 12:18, 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 **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 12:19, 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 **Adriano de Paula Sabino, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 12:20, 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 **Fernanda Cristina Gontijo Evangelista, Usuária Externa**, em 27/02/2023, às 13:53, 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 **Débora Maria Abrantes Costa, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 15:24, 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, informando o código verificador 2089794 e o código CRC 29369318.

“Biofótons é uma radiação eletromagnética coerente e ultra fraca, capaz de modular as atividades fisiológicas das células e dos sistemas vivos de ordem superior. A partir desse ponto de vista, os biofótons são pacotes de ondas que contém valor informacional, o qual é revelado pelos seus efeitos regulatórios sobre os sistemas vivos, que são justamente os receptores das mensagens transportados pelos biofótons”.

Vladimir Voiekov

RESUMO

A leucemia é uma desordem clonal de células hematológicas que se origina na medula óssea. A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) em especial, sem tratamento, tem sua evolução desfavorável por causar síndrome hemorrágica intensa. O tratamento quimioterápico, portanto, é uma das alternativas para melhorar a sobrevida dos pacientes. Nesse contexto, a busca por novos compostos com potencial ação quimioterápica é justificada e relevante. O presente trabalho avaliou a atividade citotóxica de 16 substâncias semissintéticas análogas de alcaloides 3-alquilpiridina (3-APA). Os perfis citotóxicos foram determinados pelo ensaio *in vitro* de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) para linhagens de leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α (NB4), leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α e resistente ao Ácido transretinóico (NB4-R2), leucemia promielocítica aguda (HL-60) e PBMC (célula mononuclear do sangue periférico). A avaliação da apoptose, assim como análise de parada do ciclo celular, foi realizada por citometria de fluxo; investigação do mecanismo de ação, por análise do ciclo celular; as alterações da expressão gênica de genes da apoptose (*TP53*, *p21*, *BAK*, *Bcl-2*, *AKT*) e estresse oxidativo (*NOX1*, *NOX2*, *NOX4*, *P47phox*) foram realizados por RT-qPCR. A fim de aprimorar a investigação sobre interação das substâncias, uma análise trivial de similaridade química foi realizada pelo ChEMBL para prever prováveis alvos das substâncias. As substâncias **6** e **7** foram as mais ativas e seletivas para NB4 (IC₅₀ de 38,81 μ M e 37,40 μ M respectivamente), as substâncias **1** e **10** mostraram-se mais ativas para o NB4-R2 (IC₅₀ de 42,40 μ M e 41,05 μ M) e as substâncias **1,2,3**, e **4** foram mais citotóxicas para HL60 (IC₅₀ de 18,02 μ M; 9,90 μ M; 25,40 μ M; e 31,42 μ M, respectivamente). Todas essas substâncias induziram a apoptose nas linhagens testadas. No que se refere à investigação do potencial mecanismo de ação dos compostos, observou-se que há um predomínio da diminuição de expressão de genes da antiapoptose (*p21*, *Bcl-2* e *AKT*) na indução do processo de morte celular. Notou-se uma tentativa de sobrevivência celular por genes de estresse oxidativo por aumento da expressão de *NOX2* e *p47phox* na linhagem NB4. Já o aumento de expressão de *NOX1* e *NOX4* na linhagem NB4-R2 pode estar relacionada ao dano celular. A busca por similaridades química no banco de dados ChEMBL retornou ROS1 e PARP1 como possíveis alvos para as substâncias estudadas neste trabalho. Os dados deste trabalho indicam os análogos do alcaloide 3-alquilpiridina como classe potencial de compostos com ação citotóxica (*in vitro*).

palavras chave: leucemia promielocítica aguda; novos quimioterápicos; análogos de alcaloides 3-alquilpiridina.

ABSTRACT

Leukemia is a malignant disease of clonal disorder that originates in the bone marrow, where blood cells are produced. Acute Promyelocytic Leukemia (APL) in particular, without treatment, has an unfavorable evolution because it causes an intense hemorrhagic syndrome. Chemotherapy treatment, therefore, is one of the alternatives to improve patient survival. In this context, the search for new compounds with potential antitumor action is justified and relevant. The present work evaluated the cytotoxic activity of 16 synthetic analog molecules of 3-alkylpyridine alkaloids (3-APA). Cytotoxic profiles were determined by in vitro assay of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium (MTT) against acute promyelocytic leukemia with PML-RAR α (NB4); acute promyelocytic leukemia with PML-RAR α and ATRA-resistant (NB4-R2) and acute promyelocytic leukemia (HL-60) and PBMC (peripheral blood mononuclear cell). Assessment of apoptosis, as well as analysis of cell cycle arrest, was performed by flow cytometry; investigation of the mechanism of action, by analyzing the cell cycle; gene expression alterations of apoptosis genes (*TP53*, *p21*, *BAK*, *Bcl-2*, *AKT*) and oxidative stress (*NOX1*, *NOX2*, *NOX4*, *P47phox*) were performed by RT-qPCR. In order to enhance the investigation on substance interaction, a trivial chemical similarity analysis was performed by ChEMBL to predict probable targets of the substances. Substances 6,7 were the most active and selective for NB4 (IC₅₀ of 38.81 μ M and 37.40 μ M respectively), substances 1 and 10 were more active for NB4-R2 (IC₅₀ of 42.40 μ M and 41.05 μ M) and substances 1,2,3, and 4 were more cytotoxic for HL60 (IC₅₀ of 18.02 μ M; 9.90 μ M; 25.40 μ M; and 31.42 μ M, respectively). All these molecules induced apoptosis in the cell lineages tested. With regard to the investigation of the mechanism of action of the compounds, it was observed that there is a predominance of decreased expression of anti-apoptosis genes (*p21*, *Bcl-2*, and *AKT*) inducing the cell death process. An attempt at cell survival by oxidative stress genes was noted by increasing the expression of *NOX2* and *p47phox* in the NB4 lineage. The increased expression of *NOX1* and *NOX4* in the NB4-R2 lineage could be related to cell damage. Trivial ChEMBL chemical similarities search returned ROS1 and PARP1 as possible targets for molecules studied in this work. The data presented in this work indicate that the 3-alkylpyridine alkaloid analogues are a potential class of compounds with cytotoxic action (in vitro).

keywords: acute promyelocytic leukemia; new chemotherapeutic ; analog molecules of 3-alkylpyridine alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Células progenitora (blasto) comumente vistas nas Leucemias Mieloides Agudas.	20
Figura 2-Exemplo de características microscópicas eletrônicas de diferentes tipos de morte celular.	28
Figura 3-Imagem de piroptose por microscopia confocal com lapso de tempo.	29
Figura 4-Exemplo de células em ferroptose.	31
Figura 5-Sinais de autofagia celular.	33
Figura 6-Regulação do ciclo celular.	36
Figura 7-Correpressores de ligação e dissociação de ATRA e ATO levando à diferenciação celular.	39
Figura 8-Gemtuzumab-Ozogamicina direcionado a CD33.	40
Figura 9-Mecanismo de Gilteritinib e Midostaurina através da inibição da FLT3 quinase.	42
Figura 10- O mecanismo de Venetoclax por meio da inibição de BCL-2.	43
Figura 11 -Estrutura dos análogos alcaloides de 3-alkilpiridina 1 a 16 e do núcleo progenitor 3-piridinopropanol.	48
Figura 12-Viabilidade celular (%) das células normais mononucleadas do sangue periférico.	50
Figura 13-Curva melting da quantificação da expressão do gene GAPDH.	55
Figura 14-Análise do tipo de morte celular induzida pelos alcaloides semi-sintéticos 3-APA nas linhagens leucêmicas.	62
Figura 15-Efeito dos alcaloides no ciclo celular em células NB4.	65
Figura 16-Efeito dos alcaloides no ciclo celular em células NB4-R2.	66
Figura 17-Efeito dos alcaloides no ciclo celular em células HL60.	67
Figura 18-Efeito das substâncias 6 e 7 na expressão dos genes alvos na linhagem NB4.	72
Figura 19-Efeito das substâncias 1 e 10 na expressão dos genes alvos na linhagem NB4-R2.	73
Figura 20-Efeito das substâncias 1,2,3 e 4 na expressão dos genes alvos na linhagem HL60.	74
Figura 21-Esquema de representação do equilíbrio de fatores pró e antiapoptóticos na sobrevivência ou morte celular.	77
Figura 22-Efeito das substâncias 6 e 7 na expressão dos genes de estresse oxidativo na linhagem NB4.	79
Figura 23-Efeito das substâncias 1 e 10 na expressão dos genes de estresse oxidativo na linhagem NB4-R2.	80
Figura 24-Efeito das substâncias 1,2,3 e 4 na expressão dos genes de estresse oxidativo na linhagem HL60.	81

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Organização das etapas de métodos e materiais.....	58
---	-----------

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-Oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-qPCR..... 56

Quadro 2- Resultados encontrados compilados por molécula e linhagem estudada.. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Sistema FAB: Características Morfológicas e Características Citoquímicas Principais nas Células Predominantes na LMA.....	22
Tabela 2-Citotoxicidade e seletividade dos 3-Alquilpiridínicos (3-APA).....	60
Tabela 3-Balço da expressão de genes pro e antiapoptose na linhagem celular NB4 para substâncias 6 e 7.	75
Tabela 4-Balço da expressão de genes pro e antiapoptose na linhagem celular NB4-R2 para substâncias 1 e 10.....	76
Tabela 5-Balço da expressão de genes pro e antiapoptose na linhagem celular HL60 para substâncias 1,2,3 e 4.....	77
Tabela 6. Relação de compostos e alvos encontrados por similaridade química com as substâncias selecionadas	86

LISTA DE ABREVIATURAS

2-HG- D-2-hidroxiglutarato

3-APA – 3-alquilpiridínicos

a-KG- α -cetoglutarato

AMPK- Proteína quinase ativada por AMP

APC -Células apresentadoras de antígeno

ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*

ATO- Trióxido de arsênio

ATP- Trifosfato de adenosina

ATRA- Ácido transretinoico

cDNA- DNA complementar

DAMPs -Padrões moleculares associados a danos

DEPC – Dietil pirocarbonato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido desoxirribonucleico

FAB – Franco-Americano-Britânico

FDA- do inglês *Food and Drug Administration*

FLT3-Tirosina quinase 3 semelhante a FMS

GI₅₀ concentração de inibição do crescimento de 50% das células (do inglês *Growth inhibitory dose*).

IC₅₀ -concentração que reduziu 50% da viabilidade das células

IDH1-Isocitrato desidrogenase

IDH2- Isocitrato desidrogenase-2

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IP – Iodeto de propídio

IS – Índice de seletividade

KRAS-Homólogo do oncogene viral do sarcoma do rato de Kirsten

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LPA- Leucemia Promielocítica Aguda

MCP- Morte Celular Programada

MCR- Morter Celular Regulada

mIDH1- IDH1 mutante

MLKL- tipo de domínio quinase de linhagem mista

Mrna- RNA mensageiro

Mtor- Alvo da rapamicina em mamífero

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol

NCCN- do inglês *National Comprehensive Cancer Network*

NOX- NADPH oxidase

NRAS-Homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMP- Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC – Células Mononucleares do sangue periférico

PBS – Solução salina de fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Solution*)

RIPK1- Proteína quinase 1 de interação com receptor

RIPK3-Proteína quinase 3 de interação com receptor

RNA- Ácido ribonucleico

ROS – Espécie reativa de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

RT- qPCR – Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa quantitativa em tempo real

SD- Síndrome de diferenciação

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

WT1- tumor de Wilms 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Leucemia Mieloide Aguda	18
2.2 Diagnóstico de LMA	20
2.3 Morte Celular	24
2.3.1 <i>Necrose</i>	24
2.3.2 <i>Apoptose</i>	25
2.3.3 <i>Necroptose</i>	26
2.3.4 <i>Piroptose</i>	28
2.3.5 <i>Ferroptose</i>	30
2.3.6 <i>Autofagia</i>	32
2.4 Ciclo Celular	34
2.4.1 O evento patognomônico	36
2.5 Tratamento de Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	37
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVOS	47
4.1 Objetivo geral	47
4.2 Objetivos específicos	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1 Síntese dos análogos de 3-Alquilpiridínicos (3-APA)	48
5.2 Cultura celular	48
5.3 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico	49
5.4 Tratamento celular	50
5.5 Ensaio de viabilidade celular	50
5.6 Análise da apoptose/necrose pelo método da Anexina-V/iodeto de propídio ...	51
5.7 Avaliação de ciclo celular	52
5.8 Análise da expressão gênica	53
5.8.1 <i>Extração de RNA</i>	53
5.8.2 <i>Síntese de cDNA</i>	54
5.8.3 <i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)</i>	54
5.9 Análises estatística	56
5.10 Avaliação de alvos moleculares por similaridade química das substâncias selecionadas	57

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1 Ensaio de Viabilidade Celular	59
6.2 Morte celular induzida pelas substâncias dos análogos de 3-APA em células leucêmicas.....	61
6.3 Efeito dos alcaloides marinhos semi-sintéticos no ciclo celular.....	64
6.4 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	71
<i>6.4.1 Expressão de genes da apoptose</i>	<i>71</i>
<i>6.4.2 Expressão de genes de estresse oxidativo</i>	<i>78</i>
6.5 Avaliação de alvos moleculares por similaridade química das substâncias selecionadas	84
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9. ANEXOS.....	104

1. INTRODUÇÃO

Leucemias são desordens clonais de células sanguíneas. São comumente classificadas, de acordo com o curso clínico, como aguda ou crônica, baseado na porcentagem de blastos ou células leucêmicas na medula óssea ou no sangue periférico, sendo classificadas como mieloide ou linfoide, com base na linhagem predominante das células malignas (BAGHERI-NESAMI et al., 2016). Tendo em vista que as classificações visam melhor manejo terapêutico, atenção especial é dada à leucemia promielocítica aguda (LPA), que é detectada em aproximadamente 7% das crianças e 15% dos adultos jovens com leucemia mieloide aguda (LMA) *de novo*, e é rara em indivíduos acima de 45 anos. Sem tratamento, sua evolução é desfavorável por causar síndrome hemorrágica intensa (ERICHSEN, 2009). O processo de leucemização envolve, por meio de alguma modificação e/ou mutação genética, tanto a multiplicação celular exacerbada quando a resistência à apoptose, justificando o acúmulo de células notado nesses pacientes (MEHDIPOUR; SANTORO; MINUCCI, 2015). Por isso, o desenvolvimento de quimioterápicos tem interesse em ações citotóxicas e/ou citostáticas que induzam a morte celular. Nesse contexto, não apenas o desenvolvimento de novos compostos interessa para a clínica, mas a elucidação de seus mecanismos também. Apesar da grande melhoria nas taxas de sobrevivência global, os pacientes com LMA ainda sofrem recaídas e morrem por causa da doença (GUPTA, et al., 2012). Nessa circunstância, análogos semi-sintéticos de alcaloides do tipo 3-alquilpiridina (3-APA) são bons candidatos para uma atividade antileucêmica, uma vez que apresentam atividade pró-apoptótica, antiangiogênica, antiproliferativa e ações citotóxicas em linhagens tumorais humanas (SUZUKI et al., 2017). Baseado nesses desenvolvimentos recentes, neste estudo, metodologias clássicas foram aplicadas para avaliar a viabilidade celular, a indução de alterações de expressão genética no desencadeamento do processo apoptótico em linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda. Foram selecionadas linhagens clássicas da LPA e linhagens com algum tipo de resistência para evidenciar o modo de ação molecular de análogos de 3-APA. Além disso, a similaridade química foi investigada para hipotetizar qual provável alvo das substâncias a fim de elucidar mecanismo de sinalização envolvidos nos efeitos celulares encontrados. Muitos dos alcaloides da classe dos 3-APA foram isolados de esponjas marinhas da ordem Haplosclerida. Esses

compostos são caracterizados pela presença de pelo menos um anel piridínico e uma cadeia alifática diversamente funcionalizada ligada ao anel piridínico no carbono da posição 3 (GONÇALVES et al., 2014b; ILANGO VAN et al., 2012). Neste trabalho, essas substâncias análogas de 3-APA são inéditas nesse contexto da LPA.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia é uma doença que atinge as células do sangue cuja principal característica é o acúmulo de blastos na medula óssea que substituem as células sanguíneas normais. A estimativa mundial mostra que a leucemia é o décimo tipo de câncer mais incidente entre todos os cânceres (BRAY *et al.*, 2018; FARLEY *et al.*, 2017). No Brasil, a taxa de incidência é de aproximadamente 2,6%, e também se classifica entre os 10 tipos de câncer mais incidentes. Em relação à mortalidade, em 2019, ocorreram no Brasil 7370 óbitos por leucemia e para o triênio 2023-2025 estima-se 1% de óbitos para esta neoplasia dentre os 704 mil novos casos de câncer previstos anualmente. Nas neoplasias infanto-juvenis, as leucemias representam 28 % de predominância (INCA, 2017; INCA 2022).

A incidência desses casos diagnosticados e estimados demonstraram a necessidade de uma boa articulação da clínica médica com a pesquisa laboratorial e os procedimentos terapêuticos corretos. Além de evitar a oneração do Sistema de saúde, uma conduta bem fundamentada aumentaria a sobrevivência dos pacientes acometidos. A classificação correta do tipo e subtipo de leucemia é imprescindível para o melhor tratamento de cada caso. No entanto, além das características imunofenotípicas, que já estão estabelecidas para orientação na clínica médica, muitas outras mutações e prognósticos distintos têm sido correlacionados.

Leucemias são comumente classificadas como aguda ou crônica, baseado na porcentagem de blastos ou células leucêmicas na medula óssea ou no sangue; e são classificadas como mieloide ou linfóide, com base na linhagem predominante das células malignas (INCA, 2019). A leucemia mieloide aguda (LMA) é retratada como um grupo de doenças clonais do tecido hematopoiético com proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mieloide (**Figura 1**), portanto pode acometer as linhagens granulocíticas, monocítica e eritrocítica. A contagem global de leucócitos nas LMAs geralmente é da ordem de 500 leucócitos/ μL , no entanto, pode ultrapassar os 800.000 leucócitos/ μL . A LMA é a leucemia aguda mais comum em adultos e também compreende cerca de 25% das leucemias infantis. Existe o conceito de perfil em “J” nos gráficos de incidência para LMA no mundo, com um pico antes dos 5 anos de idade e

outro pico entre 70 e 74 anos de idade (SHARMA; JANI, 2022). A média de idade predominante de diagnóstico é de 65 anos, acometendo portanto, mais os idosos, sendo o percentual de cura para esses pacientes de 5 a 15%, enquanto em pacientes com menos de 60 anos a taxa de cura aumenta para 35 a 40% (DOHNER, 2008; EYTAN M, et al., 2019; F. LORENZI, 2006; FAILACE, 2009).

Tendo em vista que as classificações visam melhor manejo terapêutico, atenção especial é dada ao subtipo Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), que é detectada em aproximadamente 7% das crianças e 15% dos adultos jovens com LMA *de novo*, e é rara em indivíduos acima de 45 anos. Sem tratamento, sua evolução é desfavorável por causar síndrome hemorrágica intensa (ERICHSEN, SANTIAGO, 2009). O gene de fusão nesse tipo de leucemia resulta na proteína de fusão PML RAR α , devido a uma translocação cromossômica entre cromossomos 15 e 17 t(15;17) e leva a um bloqueio de diferenciação, com acúmulo de células granulocíticas em fase promielocítica na medula óssea e no sangue periférico. A desintegração destas células com a liberação de proteínas pró-coagulantes causa uma coagulopatia grave, e há risco de vida com a coagulação intravascular disseminada, bem como o risco de fibrinólise primária (JIMENEZ *et al.*, 2020; THOMAS, 2019).



Figura 1-Células progenitora (blasto) comumente vistas nas Leucemias Mieloides Agudas. Campo da microscopia de LMA. A célula marcada (seta) é exemplo de blastos no campo de uma LPA, contendo granulações “azurófilas”, cromatina frouxa e nucléolos evidentes. A outra célula nucleada no campo é um neutrófilo. Já as células anucleadas e abundantes são as hemácias. Fonte: Atlas of Haematological Cytology [online]. 2016 [cit. 2023-2-05]. [www:http://www.leukemia-cell.org/atlas](http://www.leukemia-cell.org/atlas).

2.2 Diagnóstico de LMA

A primeira classificação importante sobre leucemias agudas foi publicada pelo grupo FAB em 1976 (BENNETT *et al.*, 1976). A sigla **FAB** foi originada pelos países envolvidos: Franceses, Americanos e Britânicos (do inglês French-American-British). O grupo FAB propôs a classificação da LMA baseados em critérios morfológicos e citotômicos das células e, com isso, classificou oito subtipos distintos morfológicamente: LMA M0 a M7 (**Tabela 1**). Subsequentemente, o desenvolvimento da técnica de imunofenotipagem forneceu uma base mais sólida para o diagnóstico das leucemias agudas. Atualmente, o diagnóstico e a classificação das leucemias agudas baseiam-se, em grande parte, em técnicas de citomorfologia, imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular e a tendência das futuras revisões dessas classificações

pela Organização Mundial de Saúde (OMS) continuará a se afastar dos descritores morfológicos e se aproximar cada vez mais das etiologias genéticas. Essa transição ocorre, pois, apesar da classificação morfológica ser importante no contexto histórico do diagnóstico de leucemias, o avanço das tecnologias acabou demonstrando que essa técnica é pouco específica. Ao longo do tempo, foi observada a falta de convergência entre as descobertas das alterações genéticas e a classificação FAB (OYEKUNLE *et al.*, 2011; PERCIVAL *et al.*, 2018; SANZ *et al.*, 2019).

Tabela 1-Sistema FAB: Características Morfológicas e Características Citoquímicas Principais nas Células Predominantes na LMA

Tipos	Características Morfológicas	Características Citoquímicas
M0	LMA com diferenciação mínima	MPO-; SBB-; esterases-
M1	LMA sem maturação; Blastos representam mais de 90% das células nucleadas da MO	MPO/SBB+ em $\geq 3\%$ das células
M2	LMA com maturação; Blastos $>30\%$ e $<90\%$ das células nucleadas da MO Componente monocítico	MPO+; SBB+
M3	Leucemia promielocítica aguda; Predomínio de promielócitos anormais	MPO++; SBB++
M4	Leucemia mielomonocítica aguda; Blastos $>30\%$ e $<90\%$ das células. Componente monocítico $> 20\%$ e $<0\%$ não eritroides	MPO+; SBB+; esterase inespecífica+ com inibição pelo NaF; ANAE+
M5	Leucemia monocítica aguda; Componente monocítico $>80\%$ das células não eritroides	MPO-; esterase++
M6	Leucemia eritroide aguda; Eritroblastos $>50\%$ das células nucleadas da MO; Blastos $>30\%$ das células não eritroides	MPO-; SBB-; ANAE++
M7	Leucemia megacariocítica aguda; Megacarioblastos $>30\%$ das células nucleadas da MO;(por método imunológico ou ultra estrutural)	MPO-; SBB-; ANAE+ na zona de Golgi

LMA: Leucemia Mieloide Aguda; MPO: mieloperoxidase; SBB: sudão negro B (Sudan black B); MO: medula óssea ;ANAE: alfa-naftil acetatoesterase; NaF: fluoreto de sódio; (+): positivo;(-): negativo. (C. DA SILVA, 2006; ERICHSEN, SANTIAGO, 2009; F. LORENZI, 2006)

De uma maneira geral, o diagnóstico clínico de LMA requer a presença de $\geq 20\%$ de blastos na medula óssea, e caracterização imunofenotípica de células mioeloides jovens com predomínio de moléculas de superfície como CD13, CD33, CD123, CD45, CD34, CD38, CD64, MPO entre outros (FANG *et al.*, 2022; PRADA-ARISMENDY; ARROYAVE; RÖTHLISBERGER, 2017). Em certos casos, a presença de anormalidades citogenéticas recorrentes, como as translocações características (8; 21 ou 15;17) definem LMA mesmo em uma contagem de blastos mais baixa (SANZ *et al.*, 2019).

A 5ª edição da Classificação da Organização Mundial da Saúde de Tumores Hematolinfóides: Mielóides e Histiocíticos/Neoplasias Dendríticas, em 2022, enfatiza uma base genética para definir doenças substituindo cada dia mais as análises morfológicas. Mas nessa edição, os especialistas mantiveram os requisitos de classificação para LPA, dentre as chamadas “Leucemia mioeloides aguda com

anormalidades genéticas definidoras”. A LPA, é definida pela presença do gene de fusão *PML-RAR α* . Notadamente, há outras translocações que se comportam fenotipicamente como *PML-RAR α* , chamadas de *PML-RAR α -Like*, por isso, a orientação de buscar o gene de fusão e não apenas a translocação cromossômica (KHOURY et al., 2022).

Pode-se avaliar, de uma maneira geral, as principais alterações moleculares nas LMA de acordo com a anormalidade que causam nas células: alterações relacionadas ao bloqueio da diferenciação, com destaque para proteína de fusão *PML-RAR α* , resultado de translocações entre cromossomos 15 e 17; auto renovação limitada; proliferação celular aumentada; resistência à apoptose, em especial alterações no gene *TP53*; instabilidade genética e instabilidade epigenética. Percebe-se, portanto, que o processo de leucemização envolve, por meio de alguma modificação e/ou mutação genética, tanto a multiplicação celular exacerbada quando a resistência à apoptose, justificando o acúmulo de células notado nesses pacientes (KORSOS; MILLER, 2022; MEHDIPOUR; SANTORO; MINUCCI, 2015). Por isso, o desenvolvimento de quimioterápicos tem tanto interesse em ações citotóxicas e/ou citostáticas que induzam a morte celular.

2.3 Morte Celular

A morte celular pode ocorrer de várias formas em resposta a diferentes estresses. A observação científica da morte celular regulada (MCR) historicamente começou em 1842 quando Karl Vogt notou células morrendo em sapos. No entanto, o aumento na pesquisa de MCR só começou quando John Kerr et al. (1972) trouxeram o termo “Apoptose” em 1972. Nessa ocasião, a apoptose ficou definida como uma forma de Morte Celular Programada (MCP) com mudanças morfológicas que diferem da necrose (KERR, *et al*, 1972). A apoptose e sua desregulação estão subjacentes a vários processos patológicos e fisiológicos, incluindo homeostase celular, remodelação do tecido e tumorigênese (SINGH, 2019).

Atualmente são conhecidos vários tipos de MCP que são diferenciadas com base em suas características moleculares. MCP pode ser classificada em vários subtipos, alguns já com relação fisiológica claramente descrita, como, a apoptose, necrose, necroptose e morte celular dependente de autofagia, enquanto outros, como ferroptose e piroptose são menos bem estudados e estão associados às respostas celulares às toxinas específicas que não refletem fisiologia normal (TANG *et al.*, 2019).

2.3.1 Necrose

A necrose celular ou morte celular necrótica engloba uma ampla variedade de processos de morte celular com um denominador comum: a perda da integridade da membrana plasmática seguida de vazamento citoplasmático. A necrose pode ocorrer simplesmente como consequência de um dano tão extenso que a integridade da célula é interrompida - por exemplo, em alta temperatura, após o congelamento-descongelamento ou sob estresse mecânico. Nesses casos, a morte celular é passiva e não requer a ativação de nenhuma via de sinalização específica. No entanto, a morte celular necrótica nem sempre é um processo acidental ou passivo e também pode ser o resultado de uma cascata de sinalização direcionada como é o caso da necroptose. (GREEN; LLAMBI, 2015) A necrose acontece em situações de estresse intenso, no qual envolve um processo de destruição desregulada, resultado de uma catástrofe bioenergética, incompatível com a sobrevivência celular. Morfológicamente é caracterizada pela presença de vacúolos no citoplasma, pela perda da integridade da membrana plasmática, pelo aumento do volume celular e por indução de inflamação nos tecidos vizinhos, em decorrência da liberação do

conteúdo celular e de moléculas inflamatórias (TUMMERS; GREEN, 2017; MASGRAS et al., 2017)(**Figura 2**).

2.3.2 Apoptose

A apoptose é caracterizada pelo formato celular redondo preservado, condensação nuclear e então formação de bolhas na membrana celular culminando com formação de corpos apoptóticos que serão fagocitados. Na apoptose, destaca-se ativação da via das caspases, fragmentação do DNA e exposição da membrana celular com fosfatidilserina. São importantes reguladores da apoptose, a via das caspases, família de genes antiapoptóticos *BCL-2* e pró-apoptóticos *TP53* (SINGH, 2019). A apoptose pode ocorrer por quatro vias distintas, sendo duas na intrínseca e duas na extrínseca. A apoptose intrínseca é uma forma de MCP iniciada por uma variedade de perturbações microambientais, incluindo (mas não se limitando a) retirada do fator de crescimento, dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático (ER), sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse de replicação, alterações microtubulares ou defeitos mitóticos (ROOS; THOMAS; KAINA, 2016). A etapa crítica para a apoptose intrínseca é irreversível: a permeabilização da membrana externa mitocondrial. No entanto, esse processo é controlado por membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família de proteínas BCL2. Em resposta a estímulos apoptóticos, a permeabilização da membrana é associada a um regulador de apoptose, o gene *BAK* que está entre os únicos membros da família BCL2 caracterizados até agora em células de mamíferos por sua capacidade de formar poros através da membrana mitocondrial externa. Essa alteração promove diretamente a liberação citosólica de fatores apoptóticos que normalmente residem no espaço intermembranar mitocondrial. Dentre as interações consequentes, a ativação da caspase 9 pode catalisar a ativação proteolítica de caspases 3 e 7, que são amplamente percebidas como as enzimas responsáveis pela demolição celular durante a apoptose em células de mamíferos e, portanto, são comumente conhecidas como caspases executoras (GALLUZZI et al., 2018) (**Figura 2**).

A apoptose extrínseca é uma modalidade de MCP iniciada por perturbações do microambiente extracelular, sendo principalmente conduzida por receptores da membrana plasmática. Após esse estágio inicial de indução do processo por um receptor de superfície, ocorre ativação das caspases iniciadoras, sendo a mais importante na via extrínseca a caspase 8. A caspase 8 (caspase iniciadora), por sua vez, ativa as caspases

executoras (3, 6 e 7), que ativam as endonucleases que fragmentarão o DNA (SINGH, 2019).

2.3.3 Necroptose

A necroptose é caracterizada pelo inchaço celular com ruptura da membrana plasmática e moderada condensação da cromatina. Neste mecanismo, ocorre a formação de necrossoma no citosol (WEINLICH *et al.*, 2017)(**Figura 2**).

A necroptose é independente da caspase e controlada por RIPK1(Proteína quinase 1 de interação com receptor), RIPK3(Proteína quinase 3 de interação com receptor) e MLKL (tipo de domínio quinase de linhagem mista). Anteriormente, a necrose era considerada um processo aleatório e passivo que não exigia eventos moleculares específicos. No entanto, um tipo regulado de necrose (chamada necroptose) foi recentemente descoberto por meio da identificação de inibidores químicos da morte celular necrótica (necrostatinas), o que ressalta sua natureza regulada. A RIPK1 é um regulador crítico da necroptose, já a RIPK3 atua como um mediador intermediário na cascata de RIPK1, e domínio da quinase semelhante ao de linhagem mista (MLKL) é considerada o fator-chave na execução da necroptose. Outra característica importante das células necroptóticas é a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e citocinas/quimiocinas devido à permeabilização da membrana plasmática, que pode posteriormente desencadear uma inflamação robusta e uma resposta imune. Em contraste, as células apoptóticas e/ou corpos apoptóticos são engolfados e então dissolvidos por meio de fagocitose por células apresentadoras de antígeno (APCs) ou por células vizinhas, que normalmente não induzem uma forte resposta imune. Na necroptose clássica, os necrossomas são formados por meio do modelo de ativação RIPK1-RIPK3 por meio do domínio RHIM (domínio respectivo de interação homotípica). A fosforilação de RIPK1 e RIPK3 no domínio quinase induz interações mediadas por RHIM, que resultam na formação de complexos de sinalização filamentosos semelhantes a amiloide e culminam com necroptose. Além de RIPK1/3, outras proteínas, como TRIF (interferon- β indutor de adaptador contendo domínio TIR); também conhecido como TICAM1, molécula adaptadora contendo domínio TIR 1), DAI (ativador de DNA de interferon; também conhecido como ZBP1, Proteína de ligação de Z-DNA 1) e ICP6 (subunidade grande da ribonucleotídeo redutase viral) também têm domínios RHIM. Essas proteínas contendo o

domínio RHIM podem funcionar como uma plataforma que permite a oligomerização, autofosforilação e ativação de RIPK3 por meio de um mecanismo independente de RIPK1 que frequentemente envolve uma interação RHIM-RHIM. Após a estabilização do complexo RIPK1-RIPK3, MLKL é recrutado para formar um necrossomo funcional. Normalmente, MLKL permanece inativo como um monômero no citosol. Uma vez que o necrossomo se forma, o RIPK3 ativado recruta e fosforila o MLKL na cascata de reações, o que resulta em uma mudança conformacional aberta de MLKL e exposição de seu domínio de feixe helicoidal. A desestabilização da estrutura promove a oligomerização de MLKL, resultando na translocação do oligômero de MLKL do citosol para as membranas plasmáticas (bem como para as membranas intracelulares), onde compromete a integridade da membrana para promover a morte necroptótica. Os oligômeros de MLKL também têm como alvo a membrana mitocondrial e induzir alteração da transição da permeabilidade mitocondrial, que pode subsequentemente causar ruptura mitocondrial. A ruptura mitocondrial induz a depleção de trifosfato de adenosina (ATP) e a produção excessiva de ROS para contribuir para a morte celular. ROS são importantes efetores durante a morte celular necroptótica e podem matar células em um ciclo de feedback positivo. Embora tenhamos listado vários mecanismos de execução na cascata dos necrossomas, o processo de morte celular necroptótica completa ainda precisa ser elucidado (KLIONSKY *et al.*, 2016; WU; DONG; SHENG, 2020; ZHANG *et al.*, 2017).

Diferentes linhagens de células cancerosas variam em termos de sua sensibilidade à necroptose devido a diferentes ambientes, como a disponibilidade de oxigênio ou nutrientes. Por exemplo, as células do carcinoma colorretal humano são mais sensíveis à necroptose sob as circunstâncias de hipóxia ou na ausência de glicose em comparação com aquelas na presença de oxigênio ou glicose abundantes, possivelmente por causa da eliminação do piruvato de radicais livres mitocondriais. Além disso, o nível de expressão de RIPK3 é fundamental para induzir a necroptose. Numerosas linhagens de células de câncer, como a linhagem de células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, a linha de células renais humanas HEK293 e a linhagem de células de adenocarcinoma de colo humano HeLa, são inadequadas para terapia baseada em necroptose devido ao baixo nível de expressão de RIPK3. Portanto, a quimioterapia baseada em necroptose só é eficaz em linhagens de células tumorais limitadas (HUANG *et al.*, 2018).

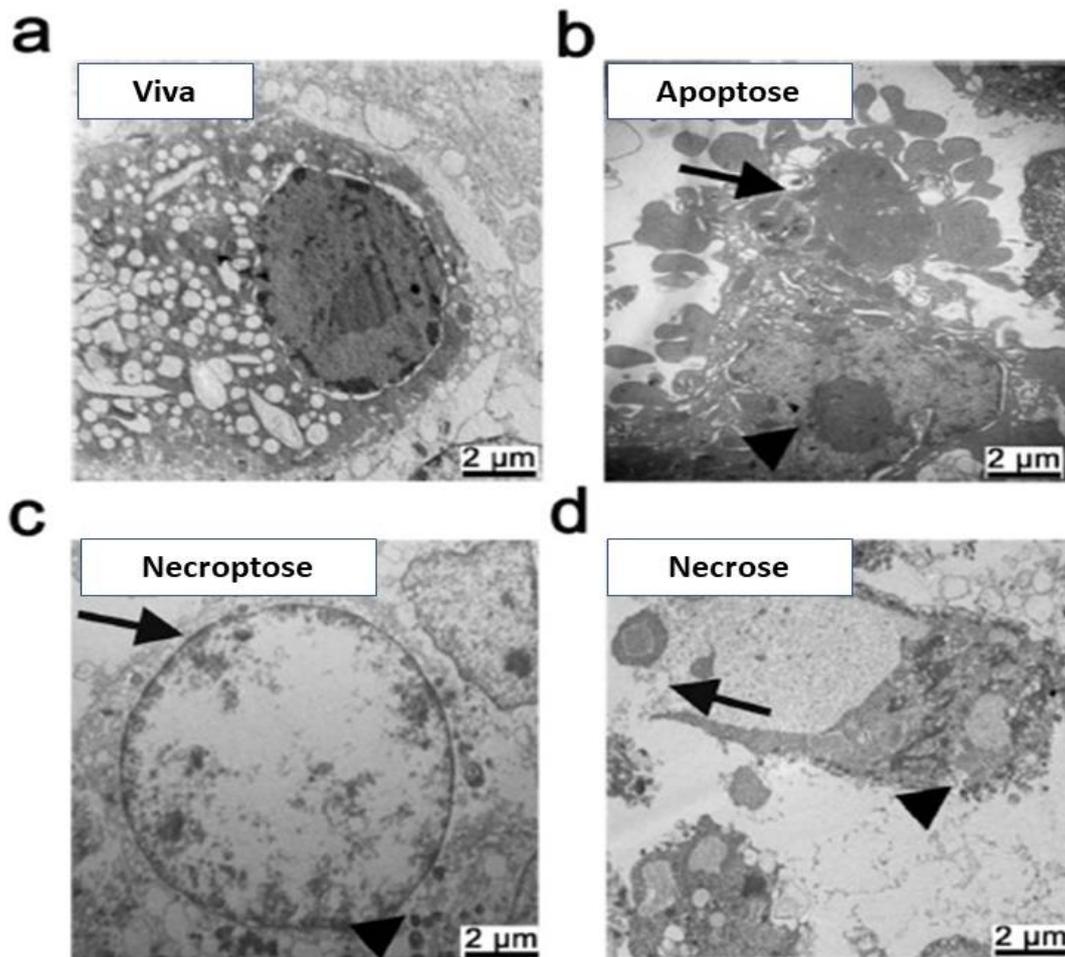


Figura 2-Exemplo de características microscópicas eletrônicas de diferentes tipos de morte celular. (a) Uma célula viável com grandes gotículas de lipídios, organelas de células normais, bem como plasma intacto e membranas nucleares. (b) Célula apoptótica mostrando encolhimento nuclear, condensação da cromatina (triângulo) e formação de corpo apoptótico (seta). (c) Célula necroptótica mostrando núcleo inchado (seta), volume celular aumentado, membrana celular rompida integridade e organelas inchadas (triângulo). (d) Célula necrótica mostrando sinais de núcleo rompido e membrana plasmática, perda de conteúdo intracelular (seta) e organelas rompidas (triângulo). A barra de escala é 2 μ m (TIAN et al., 2016).

2.3.4 Piroptose

A piroptose pode ser identificada por inchaço citoplasmático, ruptura da membrana por indução da formação de poros, e formação de bolhas na membrana com moderada condensação da cromatina) (FINK; COOKSON, 2005) (**Figura 3**).

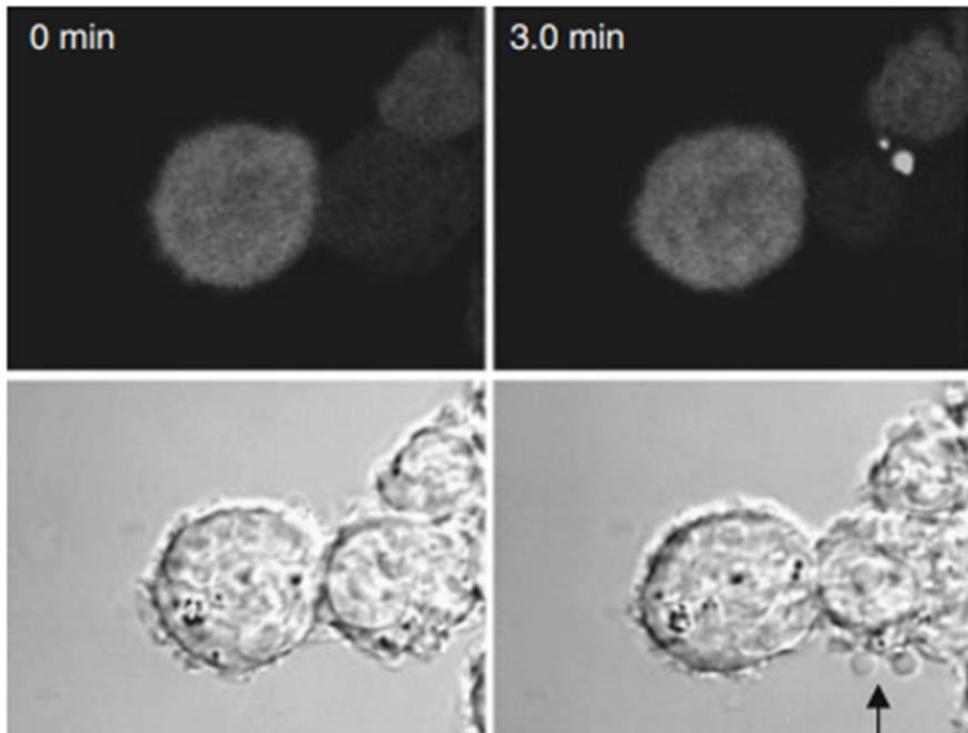


Figura 3-Imagem de piroptose por microscopia confocal com lapso de tempo. A piroptose foi induzida em células THP-1- diferenciadas com Lipopolissacarídeo bruto. Linha superior; imagens de fluorescência representando a formação do piroptossoma citoplasmático. Linha inferior; ruptura da membrana plasmática foi observada rapidamente (seta preta) (Adaptada de (LABBE, 2011)).

A piroptose é, portanto, um tipo lítico e inflamatório de morte celular regulada que requer proteínas gasdermina que danificam a membrana, caracterizada pelo inchaço e lise das células e liberação de muitos fatores pró-inflamatórios. Os complexos citoplasmáticos que direcionam a resposta inflamatória, a família da caspase e da gasdermina desempenham papéis importantes na piroptose. A piroptose, suas vias de sinalização associadas e a liberação de vários mediadores inflamatórios estão intimamente relacionadas à tumorigênese e resistência aos medicamentos quimioterápicos. A piroptose pode ser induzida por meio das vias inflamatórias que ativam a caspase-1. Na piroptose canônica, uma gama de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou DAMPs, incluindo peptidoglicanos bacterianos, ATP, RNA viral e o nível elevado de ROS, ativam os complexos citoplasmáticos que direcionam a resposta inflamatória. A caspase-1 ativada é então capaz de levar à maturação e secreção de IL-1 β e IL-18. Ao mesmo tempo, a caspase-1 ativada também cliva a gasdermina D em dois fragmentos: o domínio N-terminal e o domínio C-terminal. O fragmento N-terminal se transloca para o folheto interno da membrana plasmática e forma poros de membrana com um diâmetro

interno de 10-15nm. Os poros da membrana promovem ainda mais a descarga de fatores inflamatórios, edema celular, ruptura da membrana e, eventualmente, levam à piroptose (WANG, YAN YANG; LIU; ZHAO, 2019).

A tumorigênese está relacionada a vários fatores, incluindo a atividade de proto e antioncogenes, microambiente imunológico, estresse oxidativo e inflamação crônica. A exposição de longo prazo de tecidos e/ou células ao ambiente inflamatório aumenta o risco de câncer. A ativação da piroptose leva à liberação dos mediadores inflamatórios IL-1 e IL-18, que poderiam promover a ocorrência de câncer de várias maneiras. Estudos mostraram que camundongos sem complexos citoplasmáticos que direcionam a resposta inflamatória ativos são mais sensíveis ao câncer de cólon associado à colite induzido por azoximetano / dextrano sulfato de sódio do que os camundongos controle. Esses estudos indicaram que a piroptose pode desempenhar um papel duplo na promoção e inibição do crescimento de células tumorais em diferentes células tumorais. No entanto, o mecanismo específico da piroptose e sua relação na tumorigênese merecem um estudo mais aprofundado (XIA *et al.*, 2019).

2.3.5 Ferroptose

A ferroptose é determinada por alterações mitocondriais que levam a ruptura de sua membrana. Nesse evento celular percebe-se acúmulo de ferro e peroxidação lipídica (BATTAGLIA *et al.*, 2020)(**Figura 4**).

A ferroptose é definida por três marcas essenciais: oxidação de fosfolípidios de membrana contendo ácidos graxos poli-insaturados; disponibilidade de ferro redox ativo; e perda da capacidade de reparo do hidroperóxido lipídico. A função fisiológica da ferroptose, bem como seu envolvimento em várias doenças humanas, como lesão de órgão isquêmico, neurodegeneração e câncer, tem sido investigada. Ao contrário das outras mortes celulares programadas, a ferroptose parece mais uma “sabotagem” celular do que um mecanismo próativo de “suicídio”. Enquanto a via do "suicídio" (ou seja, apoptose, necroptose e piroptose) é ativamente desencadeada por um mecanismo molecular pró-morte dedicado, o mecanismo de "sabotagem" ocorre quando a inativação ou hiperativação de processos fisiológicos causa um desequilíbrio metabólico letal com um envolvimento até agora indefinido de proteínas pró-morte. Durante a ferroptose, as

células são “sabotadas” por seu próprio metabolismo contínuo. No câncer, esse desequilíbrio metabólico promove a remoção de células tumorais, sugerindo que a ferroptose é um tipo de resposta adaptativa que exerce uma função supressora de tumor. Nesta perspectiva, a modulação da ferroptose pode representar uma abordagem terapêutica potencial para as chamadas células cancerígenas "persistentes", resistentes à quimioterapia padrão ou terapias direcionadas a moléculas.

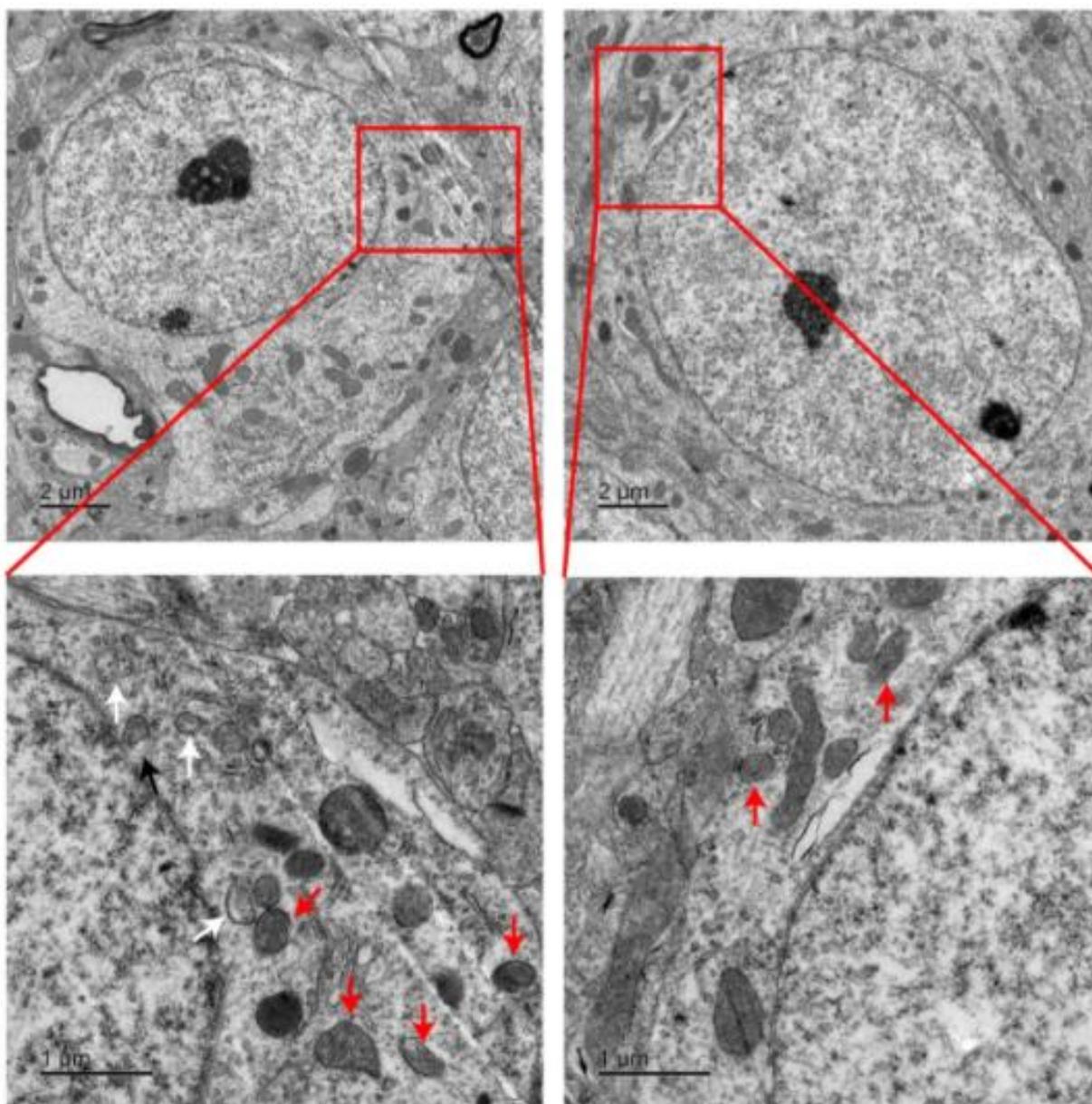


Figura 4-Exemplo de células em ferroptose. Alterações mitocondriais são sinais clássicos da ferroptose (Nas pontas de setas vermelhas: mitocôndrias encolhidas; pontas de flechas brancas: cristas reduzidas / desaparecendo; e nas pontas de flechas pretas: ruptura da membrana externa. (DIXON et al., 2012).

2.3.6 Autofagia

Na autofagia, há uma vacuolização autofágica e aumento do fluxo lisossomal causando morte celular e reciclagem dos nutrientes intracelularmente (KROEMER; MARINÑO; LEVINE, 2010).

A autofagia é uma via vesicular através da qual os componentes celulares são sequestrados em uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo e, em seguida, entregue aos lisossomas para degradação. A autofagia é induzida em resposta a uma variedade de estresses intrínsecos e ambientais, incluindo nutrientes e condições limitantes de energia, estresse do retículo endoplasmático e níveis de ROS. Evidências indicam que os blastos de LMA primários mostram níveis baixos de genes de autofagia em comparação com células não leucêmicas ou em diferenciação na LMA. Durante a autofagia, vários materiais intracelulares, incluindo agregados de proteínas e organelas danificadas, são sequestrados dentro de vesículas de membrana dupla (chamadas autofagossomos) e, em seguida, entregues ao lisossoma para degradação e reciclagem. A autofagia é orquestrada por um conjunto de genes relacionados à autofagia que estão sob o controle de várias vias de sinalização, incluindo o alvo da rapamicina em mamífero (mTOR) e eixos da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). O processo de autofagia ocorre por meio de um processo de várias etapas envolvendo iniciação, alongamento e maturação. A etapa de iniciação é a formação da membrana de iniciação ou fagóforo que requer a assistência de dois complexos, o unc-51 como autofagia ativando quinase 1 (ULK1) / proteína de interação da família de quinase de adesão focal de 200 kD (Fip200) e o complexo de classe II fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/BECN 1. Isso resulta na geração de fosfato de fosfatidil inositol 3, que subsequentemente se liga à proteína de repetição WD interagindo com os efetores de proteínas de fosfoinosítídeos (WIPI), permitindo o recrutamento de vários complexos de multiproteínas. Esta etapa é fundamental para a expansão e fechamento da membrana autofagossômica. A última etapa é a degradação do conteúdo do autofagossomo pelas hidrolases ácidas lisossomais após a fusão autofagossomo-lisossoma, que permite a produção de energia e reciclagem de biomateriais (por exemplo, aminoácidos, ácidos graxos livres e monossacarídeos)(MOOSAVI; DJAVAHERI-MERGNY, 2019a) (Figura 5).

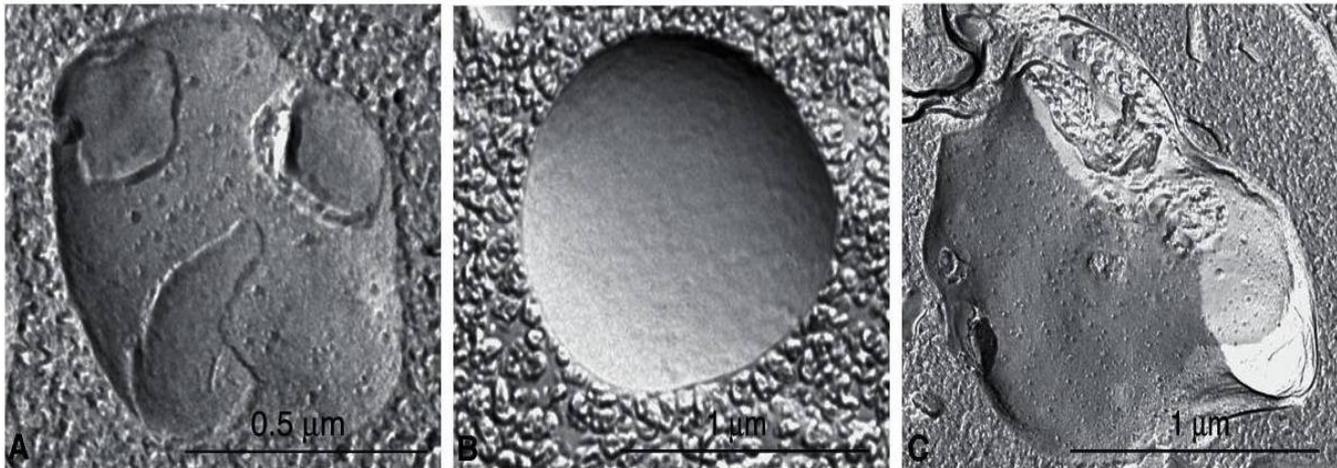


Figura 5-Sinais de autofagia celular. Diferentes vacúolos autofágicos observados após fratura por congelamento em células de osteossarcoma cultivadas após tratamento com o indutor de autofagia. (A) Autofagossomo inicial delimitado por uma membrana dupla. (B) Monocamada interna de uma membrana autofagossômica privada de partículas de proteína. (C) Auto lisossomo delimitado por uma única membrana rica em partículas de proteína. Na porção capturada (à direita), o perfil da membrana única e o material digerido interno são facilmente visíveis (KLIONSKY *et al.*, 2016).

Na verdade, no percurso do dano celular, várias vias de sinalização são recrutadas, seja para sobrevivência, seja para a morte celular. O equilíbrio desses fatores é que resultarão em apoptose ou sobrevivência celular. Por exemplo, há ativação de genes como *AKT* e *Bcl-2* para sobrevivência celular enquanto genes como *TP53*, *p21* e *BAK* atuam no sentido da morte celular nas LMAs (GREEN; LLAMBI, 2015). Além disso, apesar de vários trabalhos descreverem morte celular como eventos independentes, alguns estudos sugerem que exista, na verdade, a natureza da sobreposição dos processos no evento da morte celular. Múltiplos tipos de morte, e várias vias de sinalização podem ser observados simultaneamente em cultura de células expostas aos mesmos estímulos (ANKARCRONA *et al.*, 1995; KORNBLAU *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2019). Nesse contexto, não apenas desenvolvimento de novos compostos interessam para clínica, mas a elucidação de seus mecanismos também, como compreender o nível de dano celular e/ou genético que causam para resultar no evento citostático ou citotóxico desejado. No contexto das alterações em células leucêmicas, dois processos ganham especial atenção por conterem maiores elucidações: a apoptose, com mecanismo de programação de morte celular e a necrose.

2.4 Ciclo Celular

O ciclo celular é um processo que leva à divisão celular. Ele desempenha um papel crítico no crescimento, desenvolvimento e regeneração de tecidos de organismos multicelulares. O ciclo de divisão celular é um evento sequencial no qual uma série de etapas precisamente orquestradas ocorrem. O ciclo celular é dividido nas fases G₀ / G₁, S, G₂ e M (mitose). Durante essas quatro fases principais, as células saem de um estado quiescente (G₀) mediante estímulos de fatores de crescimento, entrando em um estado ativo (G₁); as células então progridem para a fase S, na qual ocorre a síntese para duplicação de DNA; após as fases G₁ / S estão as fases G₂ e M, dentro dos quais eventos mitóticos ocorrem. Há duas fases mais críticas: a fase S, em que a célula replica o seu DNA, e a fase M, onde se divide em duas células descendentes (mitose). Após a divisão, as células descendentes geralmente entram novamente no ciclo celular e retornam à fase G₁. (MURA *et al.*, 2019).

Para promover a progressão do ciclo celular, as ciclinas se agrupam sequencialmente e ativam uma família de proteínas quinases serina-treonina, CDKs. CDK4 e CDK6 formam complexos com ciclinas do tipo D e funcionam na fase G₁ em resposta a fatores de crescimento. CDK2 em complexo com ciclina E ou ciclina A2 é essencial para a transição G₁ / S e replicação de DNA, enquanto a ciclina B1 / CDK1 promove a transição de fase G₂ / M. As ciclinas e suas cinases parceiras CDK4 / 6 têm propriedades proto-oncogênicas e sua atividade é cuidadosamente regulada em vários níveis, incluindo o controle negativo por duas famílias de inibidores de CDK. Enquanto as proteínas membro da família INK4 (p16, p15, p18, p19) interagem especificamente com CDK4 e CDK6, os inibidores p21, p27 e p57 inibem um espectro mais amplo de CDKs. A ligação das ciclinas aos CDKs leva à fosforilação da proteína supressora de tumor, a proteína retinoblastoma (pRb). O pRb controla o progresso da fase G₁ para a fase S. A hiperfosforilação de pRb começa no final do G₁ e permanece alta até o final da fase M. A entrada na mitose é determinada pela atividade do complexo ciclina B/ Cdk1, que é fortemente regulado por seu status de fosforilação. As fosfatases Cdc25B e Cdc25C que pertencem à família de proteínas do ciclo de divisão celular 25 (Cdc25) são então ativadas. Cdc25B e Cdc25C desfosforila o complexo CDK1 / ciclina B removendo as fosforilações inibitórias em CDK1, o que leva ao início da mitose. A inativação, por sua

vez, se dá por fosforilações por inibidores de quinase ativadora de CDK (CAK) (JOHANSSON; PERSSON, 2012; ROOS; THOMAS; KAINA, 2016).

A proteína p53 tem papel importante no ciclo celular. Em muitas células, a resposta inicial mediada por p53 ao dano agudo do DNA é a indução da parada transitória do ciclo celular na fase G1, que permite a detecção e reparo do dano ao DNA antes da replicação do genoma na fase S e subsequente divisão celular (AUBREY; STRASSER; KELLY, 2016).

Acredita-se que o mediador chave da parada do ciclo celular G1 induzida por p53 seja p21, que, portanto, contribui para a supressão do tumor mediada por p53. Isso apoia a noção de que a instabilidade genômica é o principal impulsionador do desenvolvimento do câncer na ausência ou mutação da proteína p53. A p21 por sua vez, tem papel dual, pois revisões recentes apontam que p21 não está atuando apenas como um supressor de tumor, ao atuar como um inibidor do ciclo celular, indutor de senescência e supressor de tumor, mas também como um oncogene dependendo do contexto celular. Foi proposto um modelo no qual o equilíbrio entre a expressão de p21 e o dano ao DNA é crucial para a decisão entre o reparo do DNA ou a indução da apoptose. Baixo dano ao DNA tende a provocar uma inibição da apoptose dependente de p21, permitindo o reparo do DNA, enquanto o dano grave ao DNA causa a indução de apoptose, provavelmente por meio da clivagem de p21 por caspase-3 (KREIS; LOUWEN; YUAN, 2019b) (**Figura 6**).

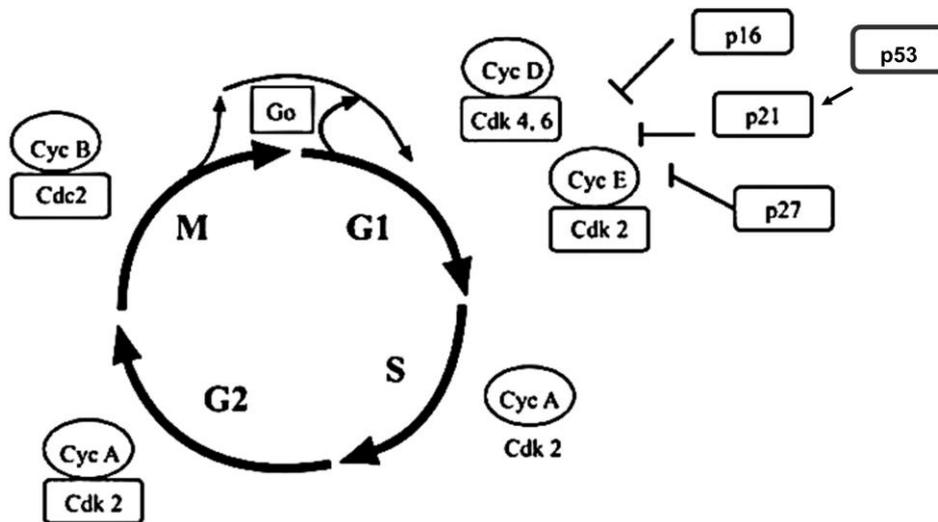


Figura 6-Regulação do ciclo celular. Interação de ciclinas e outras proteínas de controle da progressão da divisão celular. A fase G0 depende de fatores de crescimento e outros estímulos para entrar na fase G1, importante para conduzir à fase S, na qual ocorre a síntese e duplicação do DNA. Em G2 há uma verificação da qualidade da duplicação do DNA para prosseguir à fase M, onde ocorre a divisão celular propriamente dita. (Adaptado de (JOHANSSON; PERSSON, 2012))

2.4.1 O evento patognomônico

Muitos processos celulares atuam como mecanismos de defesa que impedem a perpetuação da transformação celular, sendo a morte celular programada por senescência um exemplo. A proteína PML é sensível a essa sinalização de estresse celular sendo recrutada pela via de sinalização da p53, no entanto, células com função PML comprometida, como na LPA, demonstram resistência ao processo de senescência e apoptose mesmo em um evento de ativação de p53. (AUBREY; STRASSER; KELLY, 2016)

A proteína quimérica PML-RAR α mantém o bloqueio aos domínios de ligação ao RAR, sendo assim considerada o evento oncogênico crítico que leva à patologia da LPA. Dois mecanismos principais são propostos: promover resistência à apoptose e interromper a transcrição de alvos do RAR, como a diferenciação celular epigenética. A proteína p53 já tem sua importância no ciclo celular muito bem caracterizada. Fundamentalmente, essa proteína causa a parada do ciclo celular por meio da sinalização de dano celular, interrompendo a mitose na célula da fase G1 para reparo celular antes da fase S e divisão

celular. Notavelmente, o ciclo celular em G2/M é verificado novamente pela p53, pois nesta fase a replicação do DNA já está concluída e as células estão prontas para a divisão celular, mas se for notada, a falta de reparo celular a célula pode ser induzida à apoptose. Esse mecanismo elucidou a noção de como as instabilidades genômicas são eventos chave para a tumorigênese ao interferir no mecanismo de ação da p53, seja por uma mutação na própria proteína ou nos complexos que ela recruta, como os que contêm PML. Em relação à LPA, o complexo PML-RAR α interage com o mecanismo da p53 e tem ação negativa dominante na transcrição, inibindo a ativação por ligantes fisiológicos, causando parada na maturação no estágio de promielócito. (KREIS; LOUWEN; YUAN, 2019a; NOGUERA *et al.*, 2019)

Apesar da compreensão da atuação da PML-RAR α , a LPA parece ser causada pela associação de fatores genéticos, e não apenas por um único evento de mutação. Um exemplo disso é o desenvolvimento de LPA impulsionado por PML-RAR α em tumores murinos que requerem eventos oncogênicos secundários, como tumor de Wilms 1 (WT1), KRAS (homólogo do oncogene viral do sarcoma do rato de Kirsten), mutações NRAS (homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma) e ativação de tirosina quinase 3 semelhante a FMS (FLT3) (MOOSAVI; DJAVAHERI-MERGNY, 2019b).

2.5 Tratamento de Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

O tratamento da LMA no Sistema Único de Saúde brasileiro ocorre em duas fases, a indução da remissão e a consolidação da remissão, que interferem com a divisão celular, seja por mecanismos intercalantes ao material genético, seja por causar alterações significativas o suficiente para as células entrarem em apoptose. Geralmente, são utilizados para pacientes pediátricos, os fármacos antraciclina, citarabina, e etoposido na primeira fase e daunorrubicina ou idarrubicina, associado a citarabina para segunda fase. Para pacientes adultos, a terapia de indução consiste em três dias de antraciclina (ou daunorrubicina ou idarrubicina ou mitoxantrona) e sete dias de citosina arabinosídeo (protocolo “7 + 3”). Já a terapia de consolidação que tem o objetivo de retardar ou prevenir a recidiva do paciente jovem, tem-se preconizado a terapia pós-remissão, que consiste em ciclos repetitivos (pelo menos três ciclos) de citosina arabinosídeo em altas doses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O padrão do tratamento, tanto para adultos como crianças com LPA, é considerado ser a indução concomitante com ATRA e

quimioterapia baseada em antraciclina (por exemplo: idarrubicina/mitoxantrona ou danorrubicina). Esta conduta terapêutica resultou na primeira remissão completa em mais de 90% dos casos e sobrevida livre de doença em cinco anos de aproximadamente 80% (HU, 2011). A ligação de ATRA induz mudanças conformacionais que causam a dissociação de correpressores e a indução da ativação transcricional de genes em disfunção pela formação da proteína de fusão PML-RAR α , reativando a diferenciação celular. O mecanismo de ação pioneiro do ATRA está relacionado à sua capacidade de ligação ao receptor que direciona as células para a diferenciação, removendo-as do estágio de promielócito. Outro importante tratamento complementar ao ATRA é o uso de ATO (Trióxido de Arsênio), que por sua vez, ativa cascatas de apoptose ou diferenciação parcial das células. Portanto, a combinação de ATRA/ATO tem sido largamente utilizada no contexto da LPA. Elucidações em modelos animais e exames de medula óssea de pacientes com LPA demonstraram que altas concentrações de ATO induzem à apoptose ativando os mecanismos via mitocôndria. Por outro lado, em baixas concentrações, o ATO promoveu diferenciação. Ao longo dos anos, a atividade pró-apoptótica do ATO tem sido investigada a nível molecular e seu impacto em genes e proteínas tem sido descrito. Avaliado criticamente, o ATO não ativa a transcrição dependente de RAR, embora possa induzir a síndrome de diferenciação em pacientes com LPA. Pesquisas subsequentes mostraram que a eficácia da terapia com ATO é devido ao seu efeito na porção PML da proteína de fusão PML-RAR α . A ligação de ATO ao componente PML via dois resíduos de cisteína induz sua oxidação e a formação de uma ligação dissulfeto. Na etapa final, o ATO faz a mediação do recrutamento do proteassoma 11S, um processo essencial para a degradação de PML e proteínas PML-RAR α (RABELLINO; SCAGLIONI, 2013; STAHL; TALLMAN, 2019a) (**Figura 7**).

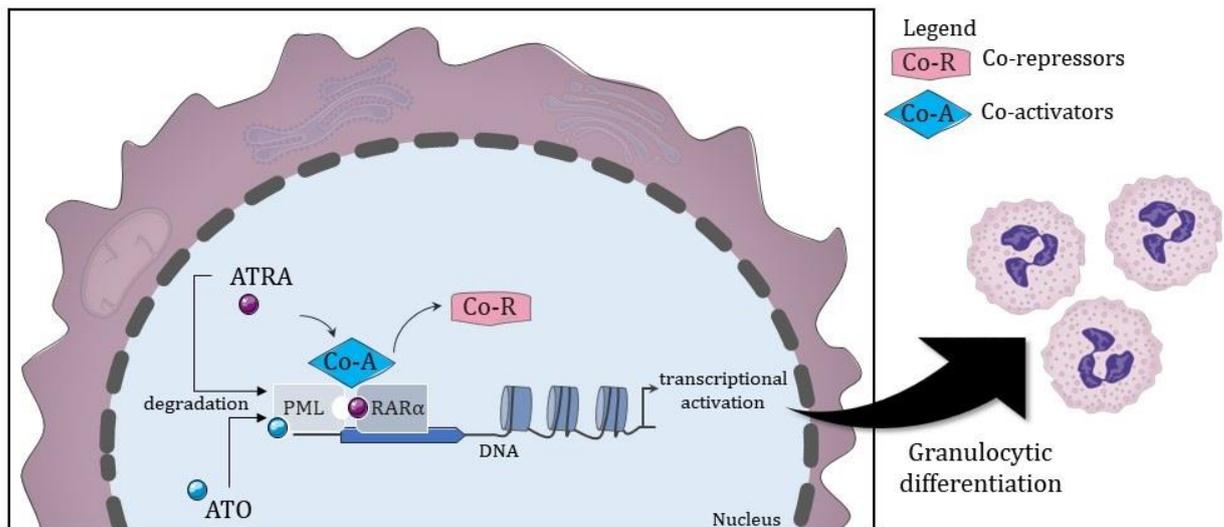


Figura 7-Correpressores de ligação e dissociação de ATRA e ATO levando à diferenciação celular. A Terapia alvo de LPA desativa o complexo de repressão causado pela proteína PML-RAR α e retoma a transcrição genética para diferenciação celular. Isso leva as células de volta à capacidade de responder à morte celular provocada pelos mecanismos da quimioterapia. *degradation: degradação; Co-repressors: correpressores; co-activators: coativadores; granulocytic differentiation: diferenciação dos granulócitos; transcriptional activation: ativação da transcrição;nucleus:núcleo.* Fonte: (DE ALMEIDA; EVANGELISTA; SABINO, 2023)

Por sua vez, a diferenciação celular em pacientes com global de leucócitos elevada leva à Síndrome de Diferenciação (SD). Essa síndrome ocorre entre 50% dos pacientes com LPA tratados com ATRA, dentro de 2 a 21 dias após o início do tratamento (WATTS; TALLMAN, 2014). Patogênese da SD não foi bem definida; a hipótese derivada de pesquisas em cultura primária e utilizando linhagens celulares sugere uma resposta inflamatória sistêmica impulsionada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, com dano endotelial, extravasamento capilar e alterações na expressão de moléculas de adesão celular levando à infiltração tecidual por células leucêmicas e oclusão da microcirculação. (LABELLA et al., 2022; STAHL; TALLMAN, 2019).

Aqui a terapêutica esbarra em um novo desafio, o principal quimioterápico específico torna-se fator de diminuição de sobrevida desses pacientes e a interrupção do tratamento com ATRA é obrigatória. Assim, nessa necessidade de diminuição de celularidade, moléculas citotóxicas mais específicas se tornam cada vez mais necessárias. Além disso, foi relatado que cerca de 20% dos pacientes tiveram recidiva após ATRA e regimes de quimioterapia (THOMAS, 2019).

Além dessas recomendações, o National Comprehensive Cancer Network- NCCN- (Diretrizes de Prática Clínica da NCCN em Oncologia (NCCN Guidelines®, 2020) incluem também nesse mesmo protocolo de tratamento, a cladribina, clofarabine e

methotrexato. Há também o Vyxeos™ que se trata de um lipossoma de citarabina e daunorrubicina. A grande diferença no protocolo do NCCN são as recomendações de terapias alvo específicas ou terapia direcionada. A terapia direcionada é uma terapia medicamentosa que se concentra em características específicas ou únicas das células cancerosas. A terapia direcionada pode ser usada sozinha ou em combinação com a quimioterapia. Suas maiores vantagens são a especificidade e redução de efeitos colaterais. Já aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), alguns exemplos são gemtuzumabe midostaurina, gilteritinibe, sorafenibe, venetoclax, enasidenibe e ivosidenibe (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2020).

O gemtuzumabe é um conjugado de anticorpo-fármacodirigido para o CD33, ou seja, um anticorpo monoclonal dirigido para CD33, covalentemente ligado ao agente citotóxico N-acetil- γ -caliqueamicina. A sua eficácia está enraizada na natureza ubíqua do CD33 como um marcador de antígeno em pacientes com LMA, pois está presente em blastos de 90% dos pacientes de LMA. Isso o torna um marcador alvo potente para opções imunoterapêuticas para LMA (GBADAMOSI; MESHINCHI; LAMBA, 2018) (**Figura 8**).

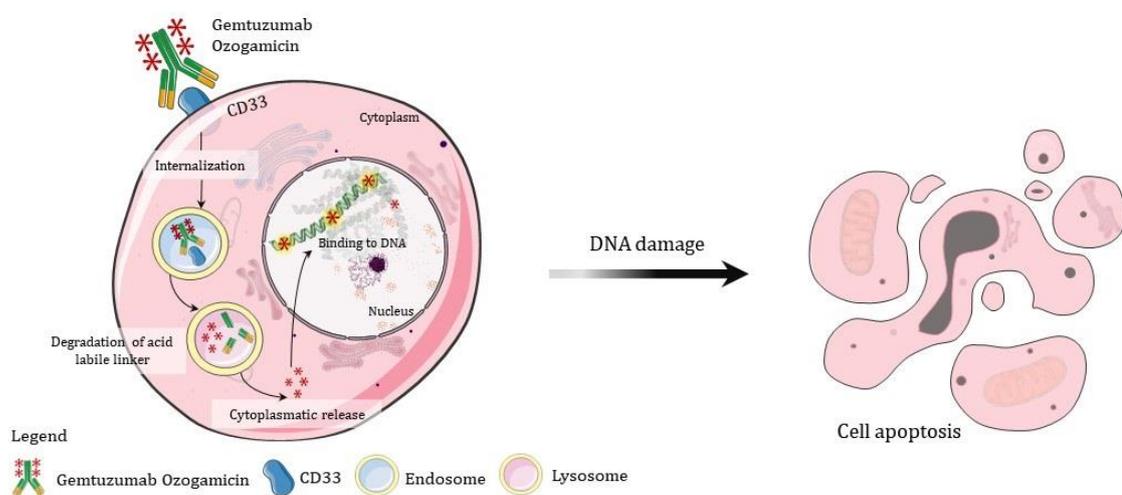


Figura 8-Gemtuzumab-Ozogamicina direcionado a CD33. Uma vez que o receptor CD33 conduz as moléculas à endocitose e degradação, o agente citotóxico causa danos ao DNA e promove a morte celular. *Internalization: internalização; Degradation of acid labile linker: degradação ácida do ligante; Cytoplasmic release: liberação citoplasmática; Binding to DNA: ligação ao DNA; DNA damage: dano ao DNA; Cell apoptosis: apoptose celular Endosome: endossomo; Lysosome: lisossomo.* Fonte: (DE ALMEIDA; EVANGELISTA; SABINO, 2023)

O FLT3 é um receptor tirosina quinase e importante regulador precoce da hematopoiese, em que mutações são vistas em aproximadamente um terço dos pacientes com LMA.

Mutações de duplicações em tandem internas de FLT3 (ITD), observadas em aproximadamente 25% dos pacientes com LMA, resultam na ativação constitutiva de vias e suas cascatas de sinalização que promovem a sobrevivência e proliferação celular, incluindo as vias MAPK/ERK, PI3K/AKT e JAK/STAT, compreensivelmente, conferindo um prognóstico ruim. A inibição direta de FLT3 é, portanto, uma via terapêutica promissora, com alguns agentes já disponíveis para uso imediato. A midostaurina, um inibidor multiquinase de primeira geração, foi aprovada pela FDA dos Estados Unidos em abril de 2017 para uso em pacientes recém-diagnosticados com LMA com mutação em FLT3, em combinação com citarabina 7 + 3 padrão e indução com daunorrubicina e consolidação de citarabina. No entanto, em pacientes com mais de 60 anos e aqueles com outras comorbidades, a quimioterapia 7 + 3 não é bem tolerada devido às suas extensas toxicidades e efeitos colaterais graves. Já o Gilteritinibe foi aprovado pelo FDA dos EUA em novembro de 2018 para uso em pacientes adultos com LMA com mutação em FLT3 recidivante ou refratária. Sorafenibe também é um inibidor de quinase FLT3. Estes inibidores de múltiplas quinases direcionam não apenas FLT3, mas também outras quinases, incluindo PKC, AKT, PKA, KIT, FGR, SRC e PDGFRa/b. Os efeitos antileucêmicos desses inibidores não específicos provavelmente derivam não apenas da inibição de FLT3, mas também da inibição de alvos nessas vias paralelas (KENNEDY; SMITH, 2020; MA et al., 2019) (**Figura 9**).

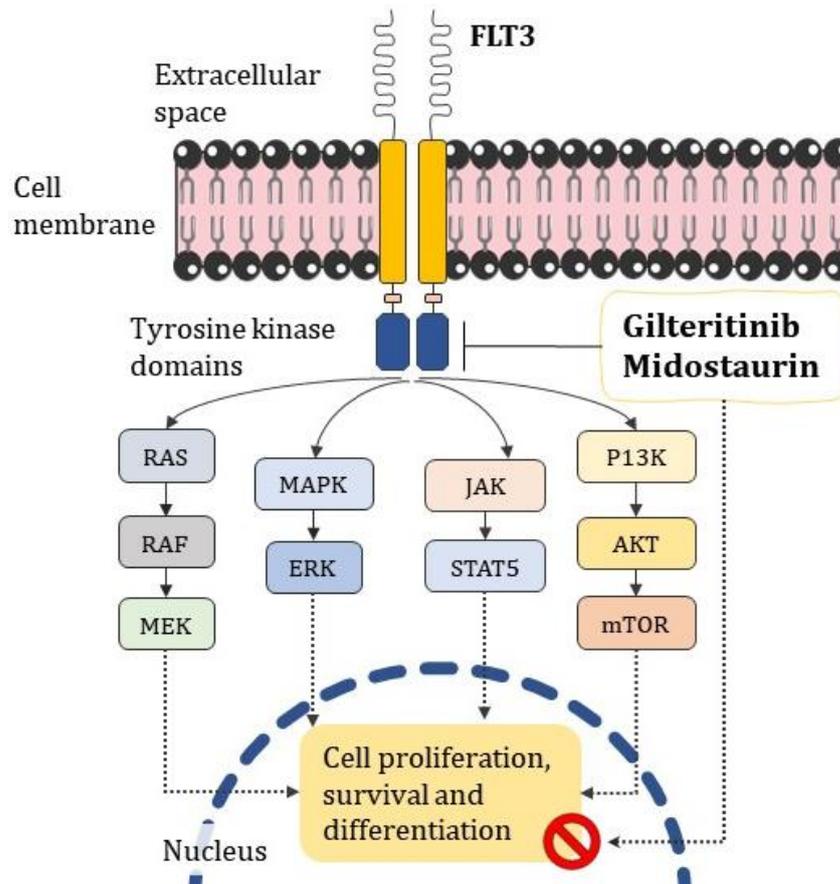


Figura 9-Mecanismo de Gilteritinib e Midostaurina através da inibição da FLT3 quinase. As mutações do FLT3 levam as células à proliferação, sobrevivência e falta de diferenciação. Gilteritinibe, midostaurina, e sorafenibe são ligantes intracelulares para receptores de quinase que bloqueiam esse efeito cascata, devolvendo metabolismo para a divisão celular e controle da morte celular. *Extracellular space: espaço extracelular; Cell membrane: membrana celular; Tyrosine kinase domains: domínios tirosino-quinases; Nucleus: núcleo; Cell proliferation, survival and differentiation: proliferação , sobrevivência e diferenciação celular.* Fonte: (DE ALMEIDA; EVANGELISTA; SABINO, 2023)

O venetoclax é um inibidor oral de BCL-2, mediador da sobrevivência da célula tumoral, sendo associado a resistência à quimioterapia. O venetoclax liga-se diretamente à proteína BCL-2 e inibe seletivamente BCL-2 ao realocar as proteínas pró-apoptóticas, restaurando a apoptose (KUCUKYURT; ESKAZAN, 2019) (**Figura 10**).

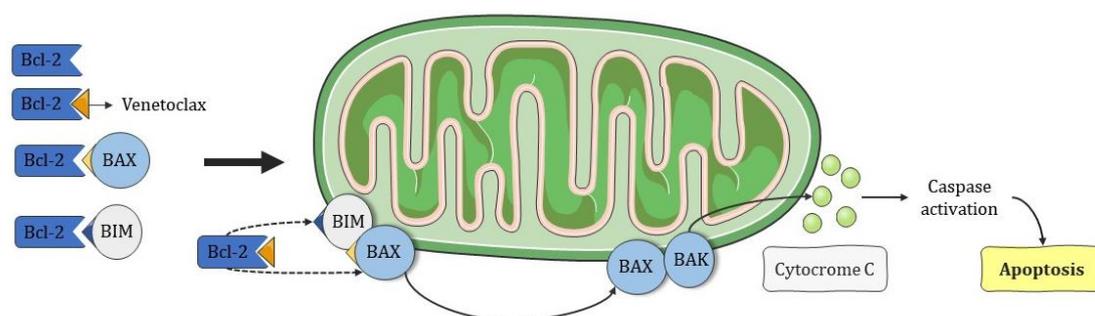


Figura 10- O mecanismo de Venetoclax por meio da inibição de BCL-2. BCL-2 associado a proteína X (BAX) é uma proteína pró-apoptótica que é recrutada pelo Venetoclax. Na presença de um sinal apoptótico, a BAX é translocada do citoplasma para as proximidades da mitocôndria, onde sofre ativação e modificação conformacional antes de aderir à membrana mitocondrial externa. Pequenas unidades de proteínas BAX ativadas formam oligômeros que eventualmente penetram na membrana mitocondrial externa e liberam o Citocromo C, que ativa a cascata celular para a apoptose via caspases. *Cytocrome C*: Citocromo C, *Caspase activation*: ativação de caspases; *apoptosis*: apoptose. Fonte: (DE ALMEIDA; EVANGELISTA; SABINO, 2023).

Aproximadamente 8% a 19% dos pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) apresentam mutações na isocitrato desidrogenase-2 (IDH2), que ocorrem nos resíduos de arginina do sítio ativo R140 e R172. As mutações IDH2 produzem um oncometabólito, o 2-hidroxiglutarato (2-HG), que leva à hipermetilação do DNA e das histonas e à diferenciação hematopoiética prejudicada. O enasidenibe é um inibidor oral das proteínas IDH2 mutantes. Enasidenib foi bem tolerado e induziu remissões moleculares e respostas hematológicas em pacientes com LMA para os quais os tratamentos anteriores falharam (EYTAN M, et al, 2019).

A isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) é uma enzima metabólica que catalisa a descarboxilação oxidativa de isocitrato para α -cetoglutarato (α -KG). Mutações em IDH1 ocorrem em; 6% a 10% de pacientes com LMA. A IDH1 mutante (mIDH1) catalisa a redução neomórfica de α -KG ao oncometabólito D-2-hidroxiglutarato (2-HG). 2-HG inibe competitivamente α -KG-dependente de enzimas, levando a alterações epigenéticas e diferenciação hematopoiética prejudicada. Além disso, a 2-HG também podem exercer ação leucemogênica induzindo mutações em *BCL-2*. mIDH1 foi associada a prognóstico adverso em pacientes com LMA e o ivosidenib é uma pequena molécula oral direcionada inibidor de mIDH1. A monoterapia com ivosidenib tem sido bem tolerada e induziu remissões duráveis e independência de transfusão em pacientes recém diagnosticados

com LMA (ROBOZ *et al.*, 2020). Recentemente em dezembro de 2022, o FDA também aprovou o olutasidenib recomendado para pacientes adultos com leucemia mieloide aguda (LMA) recidivante ou refratária com uma mutação IDH1 suscetível na arginina (R)132 (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2022).

Os estudos e aprovações contínuas tem modificado a estratégia, e a “quimioterapia 3+7” “citarabina mais daunorrubicina tem sido atualizada para pacientes com LMA, uma vez que estudos recentes mostram que a inclusão de combinações alternativas com terapias-alvo substituiu a quimioterapia clássica nesses casos com taxas interessantes de sobrevida livre de doença. A terapia-alvo combinada está despontando no que se refere às tendências das estratégias terapêuticas emergentes para a LMA (Liu, 2021). Para pacientes recém-diagnosticados, resultados promissores foram relatados para uma combinação do agente hipometilante azacitidina (AZA), venetoclax e decitabina. Enquanto a combinação de AZA e ivosidenib ou enasidenib relatou remissão completa para complicações de IDH1/2 (DINARDO *et al.*, 2019, 2020).

Apesar da grande melhoria nas taxas de sobrevida global, os pacientes com LMA ainda sofrem recaídas e morrem por causa da doença. A maioria dos óbitos é decorrente da doença progressiva, mas 5% a 15% dos pacientes morrem por complicações relacionadas ao tratamento, como infecções ocorrentes no momento do diagnóstico e tratamento, além de outros efeitos colaterais que se manifestam a longo prazo devidos ao tratamento de alta intensidade. Portanto, é importante identificar a base genética correlacionada à clínica da doença, de modo que estratégias de tratamento alternativas possam ser desenvolvidas. As melhorias nas taxas de sobrevida de pacientes com LMA irão requerer a introdução de terapias individualizadas, em que medicamentos-alvo mais específicos para a leucemia sejam utilizados na tentativa de erradicar a leucemia, em combinação com o melhor tratamento de suporte, para prevenir óbitos, principalmente, aqueles relacionados ao tratamento (GUPTA, SUMIT *et al.*, 2012).

Neste contexto, análogos semi-sintéticos de 3-APA são bons candidatos para uma suposta atividade antileucêmica, uma vez que apresentam atividades pró-apoptótica, antiangiogênica, antiproliferativa e ações citotóxicas frente às linhagens tumorais humanas (SUZUKI *et al.*, 2017). Esses compostos são caracterizados pela presença de pelo menos um anel de piridina e uma cadeia alifática funcionalizada diversa anexada ao anel de piridina no carbono da posição 3 (EVANGELISTA *et al.*, 2019). Os alcaloides

marinhos são uma das principais classes de metabólitos secundários isolados de diferentes organismos marinhos tais como cianobactérias, tunicados, ascídios, anêmonas e esponjas. Esses compostos possuem diferentes atividades biológicas descritas na literatura tais como anti-inflamatória, antimicrobiano e antimalárica (SUGUMARAN; ROBINSON, 2010). No entanto, os alcaloides, bem como os seus análogos sintéticos, destacam-se pela sua marcante citotoxicidade, o que os torna atraentes para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer. Análogos semi-sintéticos de alcaloides do tipo 3-APA já apresentaram atividade pró-apoptótica em linhagens tumorais de carcinoma de cólon humano (RKO-AS-45-1) (BARBOSA *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2014b; PEREIRA *et al.*, 2012). Vários outros estudos, confirmaram a atividade citotóxica dos análogos sintéticos de alcaloides marinhos, relatando ações antiangiogênica (LOPES *et al.*, 2009) , antiproliferativa (SUZUKI *et al.*, 2017), inibição da atividade da topoisomerase (NITISS, 2009), polimerização da tubulina (JORDAN; WILSON, 2004), indução de apoptose (ROSENKRANZ; WINK, 2007) e citotoxicidade (WANG, X., *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

A estimativa mundial é de que ocorreram 249 mil casos novos de leucemias em 2018, e aproximadamente 334 mil mortes em 2019 (BRAY et al., 2018; SHARMA, 2022). Nesse cenário, a quimioterapia apresenta-se como uma importante estratégia de tratamento, que vem proporcionando aumento da expectativa de vida de pacientes com câncer. A busca de novos compostos com potencial atividade citotóxica que possam substituir ou melhorar os atuais tem sido uma necessidade e prioridade em pesquisa. Além do surgimento de resistência aos fármacos que representa um grande obstáculo para a melhoria da resposta ao tratamento e sobrevida dos pacientes (VADAKEKOLATHU *et al.*, 2020)

As formas convencionais de encontrar novos compostos citotóxicos dependem de técnicas de triagem que empregam bibliotecas de compostos sintéticos e naturais. No entanto, essas técnicas de triagem não geraram o arsenal de produtos químicos necessário para combater as heterogêneas manifestações de tumores hematológicos. Portanto, uma estratégia sistemática diferente poderia ser mais eficiente, como usar dados estruturais conhecidos em grupos específicos de compostos bioativos que foram isolados de invertebrados marinhos para identificar prováveis compostos bioativos e, em seguida, usar produtos de modificações químicas e síntese para aumentar a potência da molécula (SUGUMARAN; ROBINSON, 2010).

Nessas circunstâncias, uma série de novos análogos oxigenados de alcaloides marinhos de 3-alkilpiridina foram preparados a partir de 3- piridinopropanol com bons rendimentos e demonstraram potencial anticâncer frente às linhagens de tumor sólidos e também leucemias mielóides (EVANGELISTA *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2014b).

Baseado nesses desenvolvimentos recentes, neste estudo, metodologias clássicas foram aplicadas para avaliar a viabilidade celular, a indução alterações de expressão genética no desencadeamento do processo apoptótico em linhagens de LPA após o tratamento com alguns alcaloides sintéticos para evidenciar o modo de ação molecular de análogos de 3-APA.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o mecanismo de ação citotóxica (*in vitro*) das substâncias semi-sintéticas, análogas ao alcaloide 3-alkilpiridínico, em células leucêmicas humanas do tipo promielocítica aguda.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar o índice de seletividade *in vitro* destes compostos comparando sua ação em células normais mononucleares do sangue periférico (PBMC);
- Avaliar a indução de apoptose *in vitro* nas linhagens celulares submetidas aos tratamentos;
- Avaliar alterações no ciclo celular nas linhagens celulares submetidas aos tratamentos;
- Comparar as expressões dos genes da sinalização de apoptose *TP53*, *p21*, *BAK*, *AKT* e *Bcl-2* nas linhagens celulares submetidas aos tratamentos;
- Avaliar o perfil de expressão gênica de *NOX-1*, *NOX-2*, *NOX-4* e *p47-phox* nas linhagens submetidas aos tratamentos para marcadores da via de estresse oxidativo;
- Avaliar os potenciais alvos moleculares das substâncias selecionadas por similaridade química.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Síntese dos análogos de 3-Alquilpiridínicos (3-APA)

A síntese das substâncias nomeadas 1 a 16 foi realizada previamente pelo grupo colaborador, coordenado pelo Prof. Gustavo Viana, da Universidade Federal de São João Del Rei: i) substâncias 1 a 8, (GONÇALVES *et al.*, 2014a) ii) compostos 9 a 12 (BARBOSA *et al.*, 2018) iii) composto 13, (OTÁVIO *et al.*, 2015) iv) compostos 14 e 15, (BARBOSA *et al.*, 2018) e v) composto 16, (HILÁRIO *et al.*, 2011). O núcleo progenitor do alcaloide marinho de 3-alkilpiridina (3-piridinopropanol) foi adquirido junto à Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (número de catálogo: P71207). A estrutura dos análogos de 3-APA são mostradas na **Figura 11**.

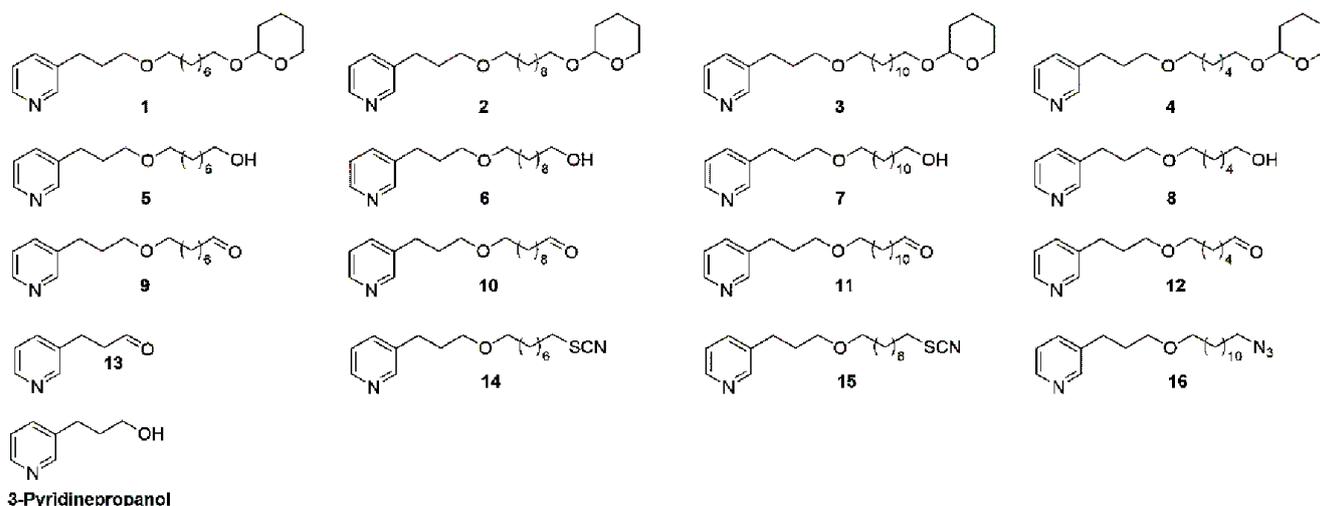


Figura 11 -Estrutura dos análogos alcaloides de 3-alkilpiridina 1 a 16 e do núcleo progenitor 3-piridinopropanol.

5.2 Cultura celular

As linhagens celulares humanas utilizadas para análise de citotoxicidade foram: Leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α (NB4) (DSMZ® ACC 207); leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α e resistente ao ATRA (NB4-R2)(NB4-LR2 (RRID:CVCL_U081)) e Leucemia promielocítica aguda (HL-60 (ATCC® CCL-240™)

(ATCC, Manassas, Virgínia, EUA). As células leucêmicas foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 10 mM HEPES, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), em estufa umidificada, a 37°C e com 5% de CO_2 . Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA)(DEVITA; CHU, 2008)e a contagem realizada na câmara de Neubauer.

5.3 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

Para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), seguiu-se rigorosamente as recomendações do fabricante do Ficoll® (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), que consiste em um polissacarídeo ramificado que promove a separação por gradiente de densidade celular. Foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (alunos da Universidade Federal de Minas Gerais), os quais possuem hemograma dentro da faixa de referência e relatam não ter nenhuma doença. Foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1), de acordo com o projeto aprovado no COEP-02177612.0.0000.5149 (ANEXO 2).

O pellet de células obtido pela técnica de PBMC foi ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 a 10% de soro fetal bovino e transferido para as garrafas de cultura celular mantido na estufa umidificada, a 37°C e com 5% CO_2 .

Primeiramente, obteve-se a curva de sobrevivência com o objetivo de avaliar a viabilidade em função do tempo das células mononucleadas em meio de cultura. Isto foi essencial para determinar o melhor intervalo de tempo para aplicação dos tratamentos propostos. Para obtenção da curva, as células (PBMC) foram cultivadas 1×10^6 células por poço em placas de 6 poços com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. As contagens das células foram realizadas diariamente pelo método de Azul de Trypan. Posteriormente às contagens, realizou-se o cálculo de viabilidade celular (%). Os dados de viabilidade em função do tempo foram plotados em um gráfico conforme representação da figura **Figura 12**.

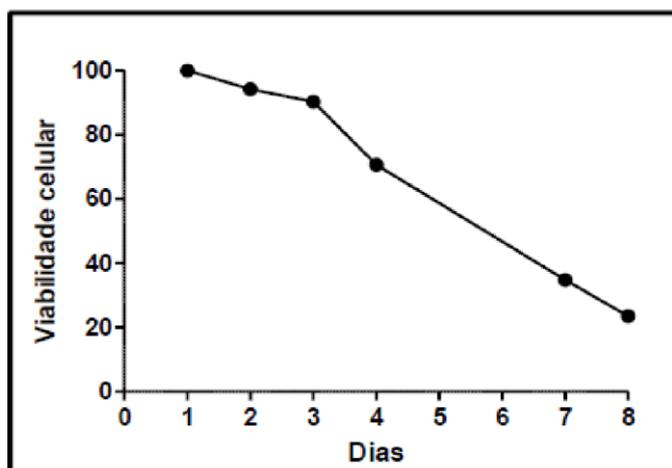


Figura 12-Viabilidade celular (%) das células normais mononucleadas do sangue periférico.

5.4 Tratamento celular

Os compostos foram dissolvidos em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a 4°C. Essas soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas nos experimentos (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0 μM). As linhagens leucêmicas e as células PBMC foram incubadas com os alcaloides 3-alquilpiridínicos sintéticos em placas de 96 poços, com diferentes concentrações e tempos. Foram utilizados controles de células sem tratamento e com tratamento com DMSO, diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos. A concentração máxima de DMSO adicionada às células foi de 0,1%.

5.5 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular dos compostos semi-sintéticos em linhagens celulares e nas células PBMC foi avaliada pelo ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol (MTT). Este método é baseado na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase que se encontra ativa apenas em células metabolicamente funcionais. Essa enzima reduz o sal de tetrazólio solúvel de cor amarela em um produto insolúvel de cor violeta, cristais de formazan (CARMICHAEL *et al.*, 1987; PARK *et al.*, 1987) cuja quantidade pode ser determinada por espectrofotometria, sendo a intensidade da cor resultante da dissolução

dos cristais proporcional à atividade enzimática e, por conseguinte ao número de células viáveis.

As células leucêmicas e PBMC são células em suspensão. Desta forma, foram transferidas para uma placa de 96 poços em concentração de 1×10^7 células/poço. Após a realização dos tratamentos (compostos de 1 ao 16 e citarabina) em diferentes concentrações (conforme 5.4), a placa foi incubada em estufa de CO₂, a 37°C por 48 horas. O tempo de 48 horas foi escolhido baseado no controle *ex-vivo* de PBMC no qual a partir de 72 horas há uma diminuição significativa na viabilidade celular (**Figura 12**), sendo, portanto, esse intervalo de 48 horas uma escolha segura sobre a viabilidade celular. Após esses períodos foram adicionados 100 µL do sal tetrazólico MTT (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 5 mg/mL. A placa foi incubada por 3 horas e, após esse tempo, foi centrifugada por 5 min a 320 xg. Então, retirou-se o sobrenadante e aplicou-se 50 µL de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. Para cálculo da viabilidade celular faz-se a leitura da absorbância a 550 nm em um leitor de microplacas SpectraMax plus 384. Os dados foram analisados a partir de três experimentos independentes.

A concentração que reduziu 50% da viabilidade das células (IC₅₀) na presença dos compostos testes, foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos (considerada 100% de viabilidade).

5.6 Análise da apoptose/necrose pelo método da Anexina-V/iodeto de propídio

Para avaliar as células em apoptose foi utilizado o kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection (BD biosciences, cat # 556547, EUA) seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante, pelo método de citometria de fluxo. Neste teste, células apoptóticas são marcadas com Anexina V-FITC que se liga à fosfatidilserina externalizada destas células enquanto células com rompimento de membrana coram com o iodeto de propídio (IP). Portanto, IP é usado frequentemente como indicador da viabilidade celular, uma vez que células viáveis conseguem excluir o fluoróforo e células em estágio inicial de apoptose ainda tem suas membranas plasmáticas íntegras. Diferentemente da apoptose tardia e necrose nas quais as integridades das membranas plasmática e nuclear diminuem, permitindo que o IP intercale com ácidos nucleicos e emita a fluorescência. Desta forma, quando se expõe as células simultaneamente à Anexina V e IP podemos identificar e

quantificar as células apoptóticas (Anexina V positivas), as células necróticas (IP positivas), as células em apoptose tardia (Anexina V e IP positivas) e as células viáveis (Anexina V e IP negativas).

Os tratamentos foram realizados em 48 horas em todas as linhagens, e foram levadas para leitura no citômetro o equivalente à uma quantidade de 1×10^6 células/tubo. Após os tratamentos (compostos mais ativos na concentração de IC_{50} expostos por 48 horas) as células foram lavadas 2 vezes com *salina tamponada com fosfato* (PBS-*phosphate buffered saline*) à 4°C e ressuspendidas em 0,15 mL de tampão de ligação de anexina (1x). As células foram marcadas com mix de marcação contendo anexina V-FITC e IP (3 mM) e incubadas por 15 minutos à 4°C no escuro. 20.000 eventos foram utilizados para a quantificação celular em citômetro de fluxo (LSR Fortessa BD biosciences). Foram utilizadas como controle, as células da mesma linhagem sob mesmas condições de cultivo, porém sem exposição à nenhuma das substâncias em estudo. Controles não corados foram utilizados para avaliar a autofluorescência das células e controles de células não tratadas foram marcadas com anexina e iodeto de propídio para avaliar a morte celular das células sem tratamento. A necrose foi induzida pelo calor (60 C°) por 10 minutos. A população de células em cada quadrante foi determinada usando o software FlowJo x10.0.7 (CHEN *et al.*, 2014).

5.7 Avaliação de ciclo celular

Foram utilizadas como controle, as células da mesma linhagem sob mesmas condições de cultivo, porém sem exposição à nenhuma das substâncias em estudo. Dessa maneira, foram selecionadas as características para aquisição dos dados no citômetro de fluxo conforme tamanho, granulosidade e a fluorescência do marcador para material genético por IP de células em cada quadrante determinada usando o software FlowJo x10.0.7 . A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA, definindo as células em diferentes fases do ciclo celular, e células apoptóticas, com menos DNA marcado do que as células viáveis em G0/G1. Assim, células na fase G2M do ciclo têm o dobro de DNA do que as células na fase G0/G1, representadas pela intensidade de fluorescência Citometria de Fluxo em escala linear. Isso é, DNA normal (classificado região G0/G1, antes da síntese DNA), DNA em processo de duplicação (região S) e DNA duplicado (poliploide região G2/M). Este protocolo é referente à placa com 12 poços, e volumes

podem ser ajustados conforme a placa. Células plaqueadas nas condições estabelecidas (com ou sem tratamento) na quantidade de 4×10^3 células/poço, então o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com 600mL de PBS. O PBS foi então removido até 50 ml de volume final, e como não se tratava de células aderentes, não foi necessário incubação com tripsina. As células em seguida foram centrifugadas 5 minutos a 1500rpm, seguindo da remoção do sobrenadante. O pellet de células foi ressuscitado com 1ml de PBS 1X e centrifugado a 1500rpm por 5 minutos. As células então foram fixadas com 1ml de etanol (70% em PBS 1X) gelado e gotejando-o enquanto as células eram agitadas no vortex. Então as células foram centrifugadas por 6 minutos a 1500rpm. Esse pellet foi ressuscitado em 1ml de PBS 1X e centrifugado a 1500rpm por 6 minutos. Por fim, o pellet foi ressuscitado em 200ul de PSSI (Triton-X, RNase, Iodeto de Propídeo e PBS) e incubado por pelo menos 15 minutos a 37°C. Todas concentrações de IC₅₀ e substâncias selecionadas para os testes nas linhagens foram realizados em triplicatas e em dois experimentos independentes.

5.8 Análise da expressão gênica

5.8.1 Extração de RNA

Os compostos semi-sintéticos foram incubados juntamente com 1×10^7 células/poço nas concentrações de IC₅₀ por 48 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 400xg por 10 minutos e o RNA total foi extraído com 0,1 mL de Trizol LS (Invitrogen, EUA). Após incubação à 4°C, às amostras foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as mesmas foram agitadas e incubadas por 10 minutos a 4°C. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g (4°C). A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo onde adicionou-se mais 0,1 mL de álcool isopropílico (Merck, Alemanha). Agitou-se, incubou-se por 10 minutos a 4°C e centrifugou-se por 10 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi removido, o *pellet* foi lavado com etanol (Merck) 75% e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 7500 xg (4°C). O sobrenadante foi removido novamente e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e o RNA total foi dissolvido em 30µL de água livre de nucleases.

O RNA extraído foi quantificado por leitura espectrofotométrica em equipamento Nano drop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) a pureza foi avaliada por meio da razão 260/280 e 260/230, e foram aceitas amostras com razão 260/280 entre 1,6 e 1,8. Os RNAs

foram tratados com DNase (Invitrogen, EUA) segundo protocolo do fabricante. Assim foi obtido um volume final de 20 μL de RNA (100 ng/ μL) armazenado a -20°C até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR).

5.8.2 Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se cerca de 10 μL de RNA total (100 ng/ μL) e o seguinte programa de ciclagem: 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; 85°C por 5 min; sendo finalizado a 4°C , em Termociclador convencional (Amplitherm TX25, São Paulo). Assim, foi obtido um volume final de 20 μL de cDNA (100 ng/ μL) armazenado a -20°C até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativo (RT-qPCR).

5.8.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada por meio da quantificação relativa de cada gene alvo, normalizada em relação à expressão de um gene endógeno de referência. A quantificação relativa descreve mudanças de nível de expressão de um gene de interesse em uma amostra teste, relacionando esses valores a uma amostra utilizada como calibrador. Esta amostra de referência trata-se de uma amostra que não recebeu o tratamento em estudo, ou uma amostra no tempo zero de tratamento. A partir destes critérios, aplicou-se o método comparativo $2^{\Delta\Delta Ct}$ para comparação relativa dos níveis de expressão entre os genes alvo das amostras tratadas e o calibrador (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A expressão dos genes *TP53*, *p21*, *BAK*, *Bcl-2*, *AKT*, *NOX-1*, *NOX-2*, *NOX-4* e *p47-phox* foi quantificada por meio do método de PCR quantitativo (qPCR) utilizando-se o *GAPDH* como gene endógeno, as sequências dos pares de oligonucleotídeos podem ser vistas no **Quadro 1**. Foi utilizado reagente Brilliant III Ultra Fast SYBER® Green QPCR (Agilent Technologies, Texas, USA) para essa análise de expressão, conforme indicações do fabricante.

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em termociclador *StepOne* Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), nas seguintes condições: 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 60 °C por 1 minuto. Para término do processo acrescentou-se o estágio da curva de dissociação (95 °C por 15 segundos).

Após o processo de amplificação, as amostras foram submetidas a curva de dissociação (curva melting) dos amplicons que representa a temperatura na qual a metade das fitas de cDNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice (**Figura 13**). A curva de dissociação permite verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos, amplificações inespecíficas e contaminações. Os dados foram analisados a partir de dois experimentos independentes, em que as amostras são avaliadas em duplicata.

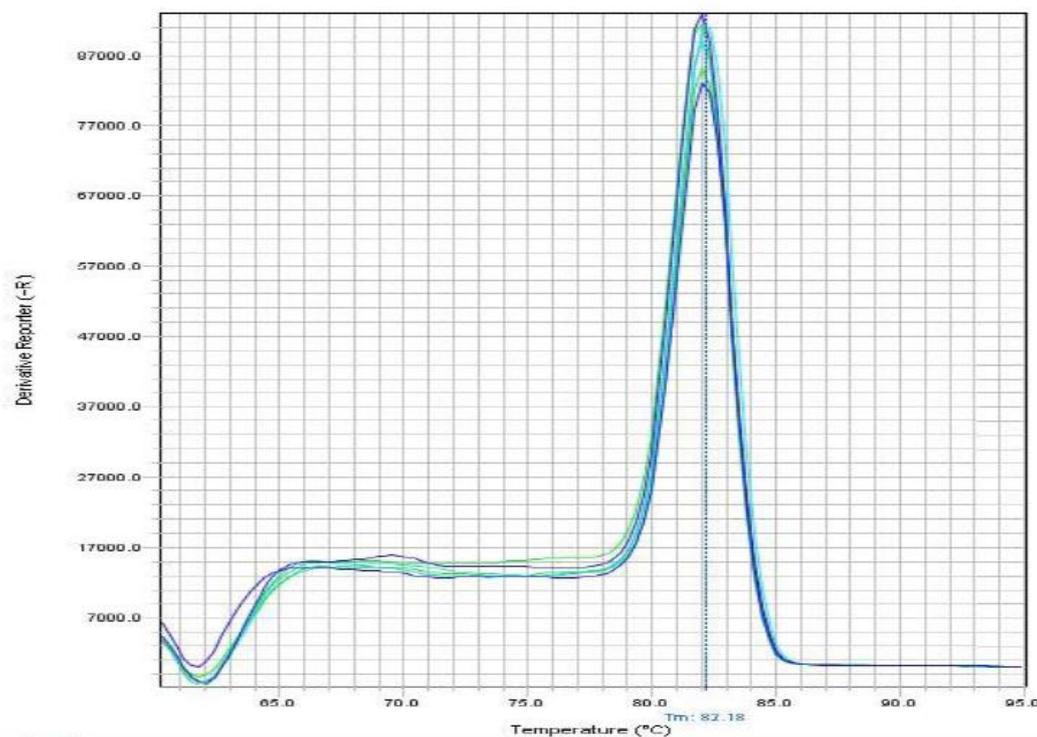


Figura 13-Curva melting da quantificação da expressão do gene GAPDH.

GAPDH senso	5'GAA GGT GAA GGT CGG AGT 3'
GAPDH antisenso	5'GAA GAT GGT GAT GGG ATT 3'
p21 senso	5'TGA GCC GCG ACT GTG ATG 3'
p21 antisenso	5'GTC TCG GTG ACA AAG TCG AAG 3'
BAK senso	5' TCT GGC CCT ACA 3'
BAK antisenso	5' ACA AAC TGG CCC AAC TGA 3'
AKT senso	5' TTA CTG CTC GCT GGA TTC ATC 3'
AKT antisenso	5'GTC TCT TGA TAA CCG TCT CTG 3'
TP53 senso	5' TGC AGC TGT GGG TTG ATT 3'
TP53 antisenso	5' AAA CAC GCA CCT CAA AGC TGT 3'
NOX-1 senso	5'-GCCTGTGCCCCGAGCGTCTGC-3'
NOX-1 antisenso	5'-ACCAATGCCGTGAATCCCTAAGC-3'
NOX-2 senso	5'-GGAGTTTCAAGATGCGTGGAAACTA-3'
NOX-2 antisenso	5'-CCAGACTCAGAGTTGGAGATGCT-3'
NOX-4 senso	5'-GTCATAAGTCATCCCTCAGA-3'
NOX-4 antisenso	5'-TCAGCTGAAAGACTCTTTAT-3'
P47-phox senso	5'-TTGAGAAGCGCTTCGTACCC-3'
P47-phox antisenso	5'-CGTCAAACCACTTG GGAGCT-3'

Quadro 1-Oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-qPCR. Genes cuja expressão foi avaliada. Gene GAPDH como controle de gene endógeno, genes *P21*, *BAK*, *AKT* e *TP53* relacionados à apoptose. Genes *NOX-1*, *NOX-2*, *NOX-4* e *p47-phox* relacionados ao estresse oxidativo

5.9 Análises estatística

Os resultados de viabilidade celular, e análise de apoptose e necrose foram expressos como a média \pm desvio padrão (teste de normalidade Shapiro-Wilk) e cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos três vezes. Os valores de IC₅₀ foram calculados usando-se o programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Os resultados da expressão gênica foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism, Versão 6.01 (GraphPad Software, 2012). Para os dados que apresentaram distribuição normal foi empregada análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Tukey. Para aqueles que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do

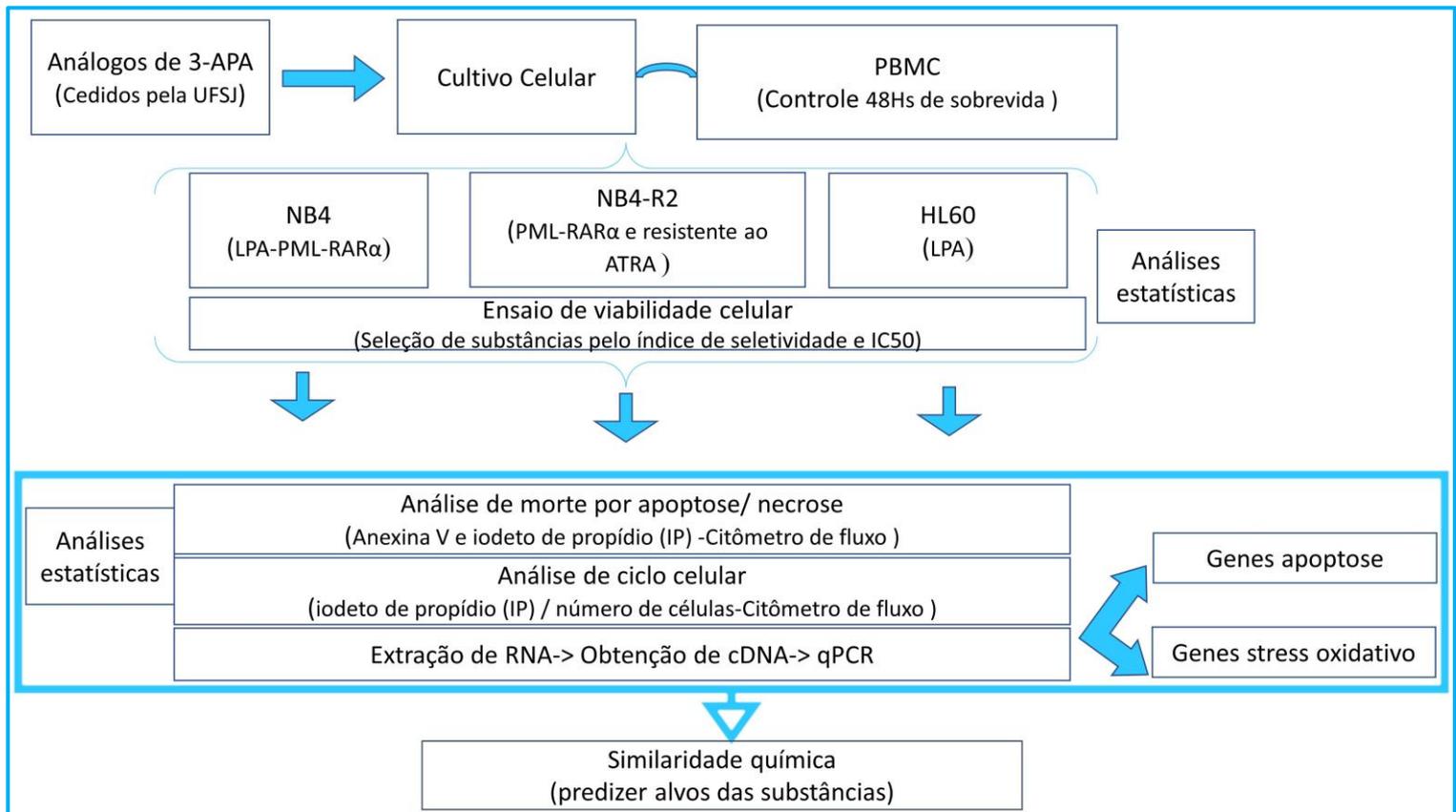
teste de comparação múltipla de Holm-Sidak. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

5.10 Avaliação de alvos moleculares por similaridade química das substâncias selecionadas

ChemMapper Server (GONG *et al.*, 2013) é um servidor que permite realizar cálculos de similaridade molecular 3D utilizando o algoritmo SHAFTS, um método que combina a sobreposição de moléculas usando a forma molecular e a correspondência de grupos químicos.

Foram selecionadas moléculas com pelo menos 75% de similaridade química com as substâncias avaliadas neste trabalho. Com o intuito de avaliar potenciais alvos das moléculas previamente selecionadas nos testes *in vitro*, inicialmente, os dados dos compostos com ação citotóxica foram obtidos no banco de dados ChEMBL v24 (BENTO *et al.*, 2014). Foram selecionados os compostos com concentração de inibição do crescimento de 50% das células IC₅₀ e GI₅₀ (do inglês, *Growth inhibitory dose 50%*). O banco de dados obtido foi filtrado para remover entradas sem atividade experimental determinada moléculas inativas, e misturas de compostos. Todas as substâncias com IC₅₀ e GI₅₀ determinados experimentalmente foram consideradas.

A fim de simplificar a compreensão das etapas, as metodologias foram organizadas no **Fluxograma 1** abaixo.



Fluxograma 1. Organização das etapas de métodos e materiais. A partir da exposição das linhagens celulares às 16 substâncias análogas de 3-APA, foram selecionadas as substâncias com melhor índice de seletividade e IC_{50} . A partir dessa triagem inicial, as células submetidas ao tratamento com substâncias selecionadas foram avaliadas quanto ao tipo de morte predominante quanto a apoptose e necrose. Então, por citometria de fluxo, foram avaliadas quanto a fase de parda de ciclo celular. Posteriormente, as linhagens expostas às substâncias selecionadas também foram avaliadas quanto à expressão de genes da sinalização da apoptose e do estresse oxidativo. Por fim, a partir das informações das prováveis vias alteradas e estrutura química, as substâncias selecionadas foram triadas quanto à similaridade química para hipotetizar prováveis alvos de interação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaio de Viabilidade Celular

A fim de avaliar a atividade citotóxica (*in vitro*) dos compostos, foram realizados ensaios de MTT nas linhagens celulares humanas NB4, NB4-R2 e HL60 (linhagens tumorais) e PBMC (não tumoral), utilizando como composto citotóxico padrão o quimioterápico citarabina e ácido transretinoico (ATRA). Na Tabela 2 estão apresentados os dados dos testes de citotoxicidade e de seletividade. Foi calculada a citotoxicidade do DMSO, no qual não se obteve diferença significativa ($p > 0,05$) com o controle de tratamento (o controle de vida das células sem tratamento). Considera-se o índice de Seletividade a proporção entre valor de IC_{50} na linhagem normal sobre valor de IC_{50} da linhagem neoplásica (EVANGELISTA *et. Al*, 2019).

Tabela 2-Citotoxicidade e seletividade dos 3-Alquilpiridínicos (3-APA).

Substâncias	IC ₅₀ (µM) ± DP *				IS		
	HL60	NB4	NB4 R2	PBMC	HL60	NB4	NB4R2
1	18,02±0,85	>300	42,40±4,15	126,06±4,64	7	ND	2,97
2	9,90± 1,80	62,93±5,27	93,97±7,90	42,85±3,57	4,33	0,68	0,46
3	25,40±0,98	52,40±8,80	56,21±5,90	136,34±5,10	5,37	2,6	2,43
4	31,42±3,95	>300	>300	225,14±10,55	7,17	>x	>x
5	250±13,90	21,80±2,50	>350	>350	>x	>x	>x
6	165,50±13,30	38,81±2,20	>350	192,37±6,54	1,16	4,96	>x
7	120,90±13,15	37,40±3,10	65,10±6,30	215,93±6,50	1,79	5,77	3,32
8	>400	>400	>400	246,86±10,62	>x	>x	>x
9	107,15±8,45	>350	>350	77,10±4,84	0,72	>x	>x
10	81,25±5,10	>400	41,05±4,70	148,61±5,76	1,83	>x	3,62
11	34,40±1,90	120,65±12,10	74,40±6,35	72,21±4,73	2,1	0,6	0,97
12	115,22±15,12	100,12±7,30	65,25±4,52	194,63±4,59	1,69	1,94	2,98
13	162,40±12,44	>400	>400	156,78±10,41	0,97	>x	>x
14	20,25±2,82	40,70±4,11	43,80±3,75	75,47±5,10	3,73	1,85	1,72
15	320,24±13,05	52,68±4,92	120,60±9,50	81,37±9,69	0,25	1,54	0,67
16	175,50± 8,95	284,35±13,77	105,30±12,05	48,51±5,61	0,27	0,17	0,46
Citarabina	28,50±2,15	ND	ND	180,72±10,45	6,34	ND	ND
ATRA	ND	60,00±2,98	60,00±9,8	210,20±13,15	ND	3,5	3,5

Valores apresentados como média ± desvio padrão. >x – maior que limite de cálculo .ND- Não determinado. IS- Índice de Seletividade

O principal objetivo de um ensaio de viabilidade e citotoxicidade celular é selecionar as substâncias com maior potencial de causar morte celular, com a menor dose, e então estudar seus prováveis mecanismos citotóxicos. Neste trabalho foram consideradas seletivas as amostras com IS maior que 2, apontando que esta atividade é duas vezes mais seletiva para células tumorais. Observou-se, conforme a tabela 2, que para a linhagem HL60 em 48 horas, as substâncias **1**, **2**, **3** e **4**, cujos valores de IC₅₀ foram 18,02; 9,90; 25,40; e 31,42 µM, respectivamente, foram comparáveis em relação a citarabina (20,50 µM), composto já utilizado como quimioterápico (p<0,05). Já na linhagem NB4 as substâncias mais efetivas foram **6** (38,81 µM) e **7** (37,40µM) (p<0,05), em comparação ATRA (60,0 µM), em 48 horas. Enquanto na linhagem NB4-R2 os compostos mais efetivos foram **1** (42,40 µM) e **10** (41,05 µM), em comparação ATRA (60,0 µM). Assim, essas substâncias que demonstraram um melhor potencial citotóxico nos modelos celulares estudados no presente trabalho foram selecionadas para que suas prováveis vias de sinalização envolvidas nesse processo fossem investigadas (**Tabela 2**).

6.2 Morte celular induzida pelas substâncias dos análogos de 3-APA em células leucêmicas

A fim de caracterizar a morte celular induzida pelos compostos, foi realizado o teste da Anexina-V e do Iodeto de Propídio por citometria de fluxo, que permite a quantificação das células nas diferentes fases de morte celular.

Após a análise das células no citômetro de fluxo, foi obtido um gráfico do número de células encontradas com cada tipo de marcação (anexina-V e iodeto de propídio) (**Figura 14**). Cada um dos quadrantes obtidos representa um estágio da análise de morte celular. O quadrante superior esquerdo (Q1) representa as células em necrose, o quadrante superior direito (Q2) as células em apoptose tardia, o quadrante inferior direito (Q3) representa as células em apoptose recente, e o quadrante inferior esquerdo (Q4) as células viáveis.

O tipo de morte celular majoritário induzido por todos os alcaloides (**substâncias 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 10**) em 48 horas foi a apoptose (**Figura 14**), pode-se verificar que a morte foi de aproximadamente 50% das células por apoptose (dose de tratamento foi o IC₅₀). Os resultados expressos foram considerados estatisticamente significativos (p<0,05) quando comparados com o grupo controle de células viáveis (sem tratamento).

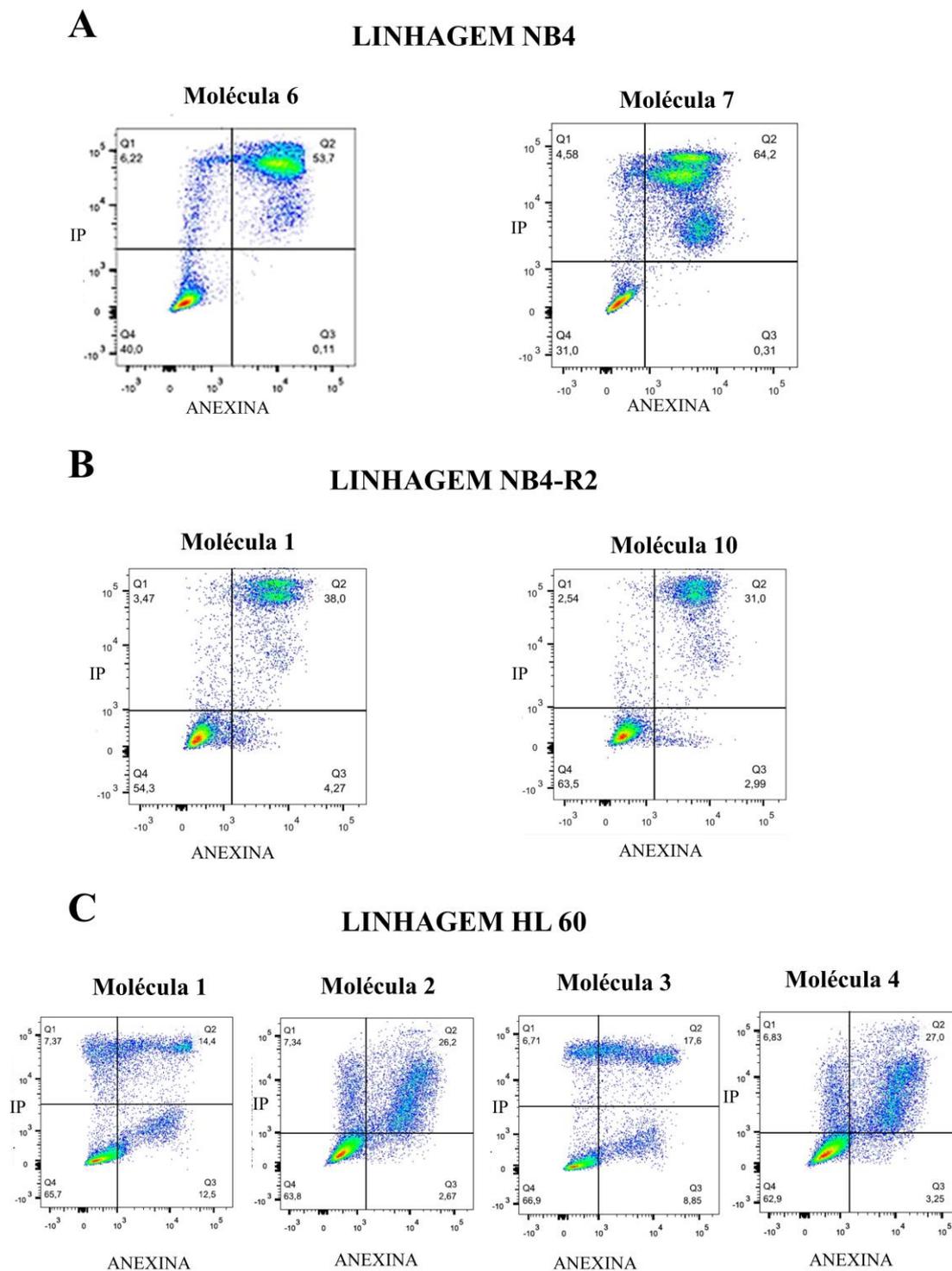


Figura 14-Análise do tipo de morte celular induzida pelos alcaloides semi-sintéticos 3-APA nas linhagens leucêmicas. A apoptose foi determinada pela análise da marcação com anexina V FITC e a necrose pela marcação com IP, e testes realizados em triplicata. As células foram incubadas por 48 horas com as substâncias sintéticas de alcaloides nas concentrações de IC₅₀

correspondentes. Substâncias 6 e 7 na linhagem NB4 (A), substâncias 1 e 10 na linhagem NB4-R2 (B), substâncias 1,2 3 e 4 na linhagem HL60(C).

Nos primeiros estudos sobre morte celular, existia uma clara separação entre as duas possíveis maneiras por meio da qual uma célula morreria, por necrose que seria acidentalmente ou por apoptose que seria uma maneira programada. Enquanto a primeira seria encontrada em situações patológicas e estaria ligada somente a processos lesivos, a segunda estaria envolvida na homeostase do organismo, eliminando células não mais desejadas pelo sistema. Porém, este paradigma foi quebrado com o descobrimento de que apoptose não é a única programação de morte existente e que vários outros mecanismos celulares, tais como piroptose e necroptose, também são relevantes para o funcionamento adequado dos diferentes sistemas fisiológicos e que as vias intracelulares estão interconectadas e não são exclusivas entre si, isso é, podem ocorrer simultaneamente (FISCHER *et al.*, 2000).

Além disso, da mesma forma, tem sido sugerido que a apoptose de células cancerosas gera espaço para subclones mais agressivos e, portanto, poderia na verdade promover a evolução do tumor (LABI; ERLACHER, 2015).

Nesse atual enquadramento, a apoptose como o único objetivo da terapia do câncer parece controversa. Embora a apoptose seja utilizada no programa de desenvolvimento de um organismo para evitar a cicatriz associada à necrose, não há objetivo de evitar a necrose tumoral na terapia do câncer. A quimioterapia pode falhar não porque causa necrose tumoral, mas porque não causa morte celular. Há uma necessidade urgente de aumentar a eficácia do tratamento e reduzir a resistência aos medicamentos. Ao escolher agentes terapêuticos com múltiplos mecanismos de ação, diferentes locais e vias podem ser atacados e vários processos envolvidos na sobrevivência das células tumorais podem ser inibidos simultaneamente (BLAGOSKLONNY, 2000; LABI; ERLACHER, 2015).

Neste presente trabalho a morte celular foi avaliada pelo teste da Anexina-V e do Iodeto de Propídio por citometria de fluxo que permite a quantificação das células nos diferentes estágios de morte celular. Observou-se que resultados confirmam que os alcaloides marinhos semi-sintéticos utilizados induziram as células à morte celular, predominantemente à apoptose, e são, portanto, promissores para o estudo de novos quimioterápicos. Outros autores também relataram que diferentes alcaloides marinhos induziram a apoptose de células leucêmicas (DASSONNEVILLE *et al.*, 2000; BALLOT *et al.*, 2009; TOMAŠIČ *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016a; PALANISAMY *et al.*, 2017)

e de outros tipos tumorais (RAJESH; ANNAPPAN, 2015; DYSHLOVOY *et al.*, 2017; HABLI *et al.*, 2017).

A cadeia carbônica costuma estar intimamente relacionada com lipofilicidade, e tem muita interferência da interação das substâncias com as linhagens celulares, mas além disso, baseando-se nas diferenças estruturais, uma análise perfunctória sugere uma relação das estruturas e provável seletividade entre as substâncias e as células. Uma prévia e superficial análise é sugestiva que para linhagem HL60 as substâncias que possuem anel tetraidropirano demonstraram melhor atividade (substâncias 1 a 4 da **Figura 11**). Inclusive, esses foram os ensaios que tiveram maiores valores para necrose simultânea à apoptose, e isso pode refletir o caráter agressivo da substância, uma vez que a intensidade aumentada das alterações iniciais sofridas pelas células nesses eventos citotóxicos pode ser o estímulo para ativar diferentes mecanismos de morte celular simultaneamente (GALLUZZI *et al.*, 2018; LABI; ERLACHER, 2015; ZYSK *et al.*, 2000).

Já para células da linhagem NB4, há uma sugestão de que as estruturas de melhor atividade foram das substâncias 6 e 7 nas quais se destacam as hidroxilas terminais.

Curiosamente a linhagem NB4-R2, que é uma linhagem com mutação que leva à resistência ao tratamento com ATRA, apresentou resposta heterogênea com bom IC₅₀ para substâncias 1 e 10 (**Figura 11**), a primeira com anel tetraidropirano, mas a única linhagem com seletividade para grupo aldeído na substância 10.

6.3 Efeito dos alcaloides marinhos semi-sintéticos no ciclo celular

Buscando-se elucidar um possível mecanismo de ação dos alcaloides semi-sintéticos 3-APA no ciclo celular, foi avaliado neste estudo o efeito deles após 48 horas de incubação, com a concentração de IC₅₀, nas diferentes fases do ciclo celular. As substâncias analisadas foram as que apresentaram maior toxicidade em menores doses, conforme descrito no item 6.1.

Em comparação com o grupo controle, as células NB4 tratadas com as substâncias 6 e 7 mantiveram predomínio de células na fase G₀/G₁ e um discreto aumento da parada do ciclo na fase G₂ comparadas ao controle. Entende-se por controle nessa avaliação, as células de mesma linhagem celular que foram mantidas nas mesmas condições de cultivo sem exposição à nenhuma substância em estudo. (**Figura 15**).

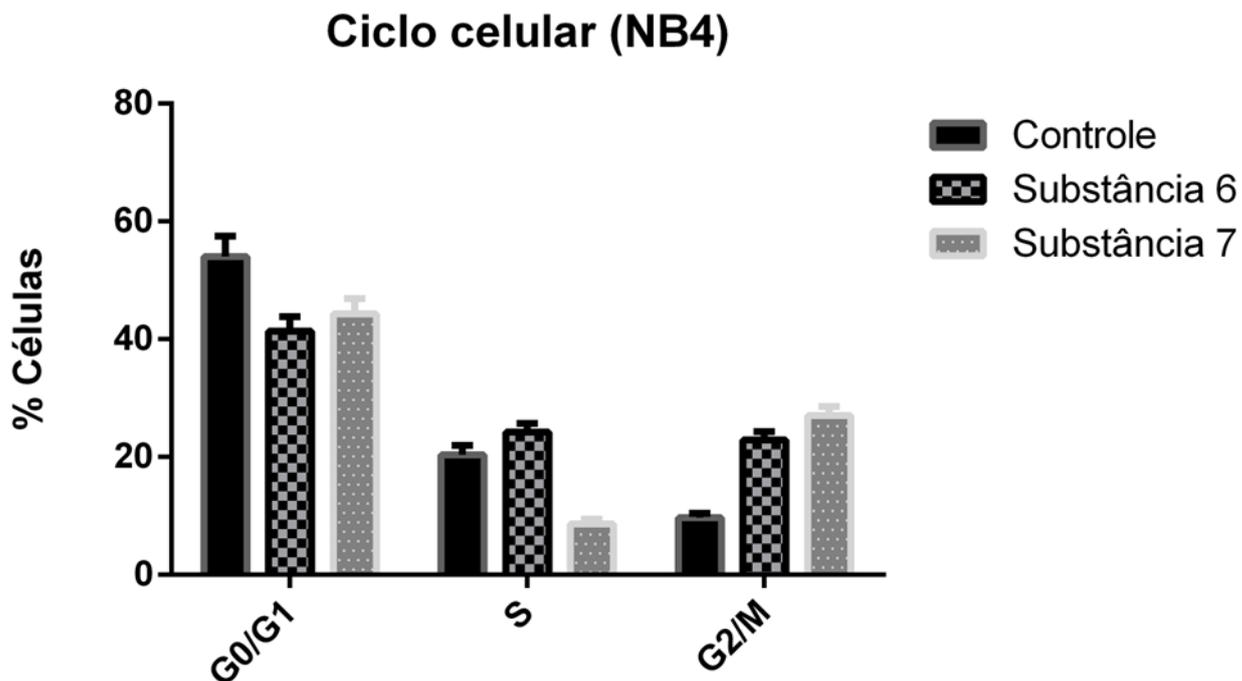


Figura 15-Efeito dos alcaloides no ciclo celular em células NB4. Células NB4 foram incubadas com os alcaloides semi-sintéticos (6 e 7), e as células sem nenhum fármaco utilizado como controle de tratamento, por 48 horas. As fases G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo software FlowJo x10.0.7.

A linhagem NB4-R2 tratada com as substâncias **1** e **10** mostraram um perfil com acúmulo de células nas fases S e G0/G1, e dessas, um predomínio maior na fase S em relação ao controle.(**Figura 16**).

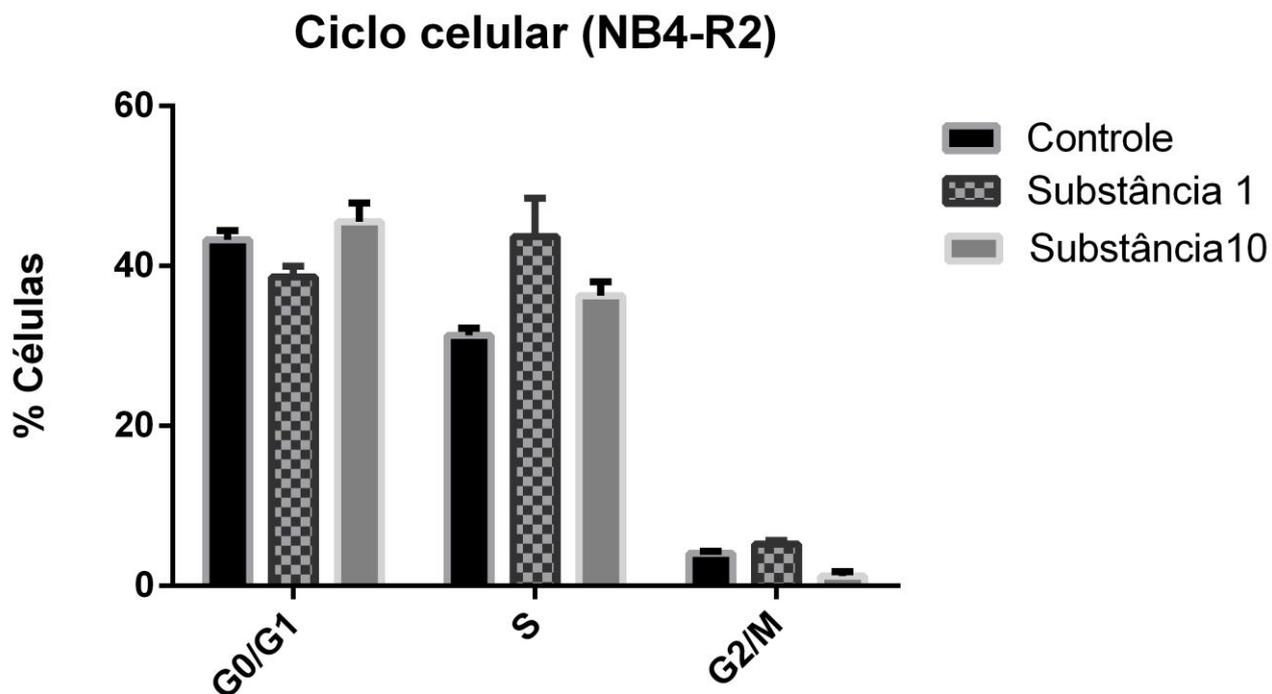


Figura 16-Efeito dos alcaloides no ciclo celular em células NB4-R2. Células NB4-R2 foram incubadas com os alcaloides semi-sintéticos (1 e 10) e as células sem nenhum fármaco utilizado como controle de tratamento, por 48 horas. As fases G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo software FlowJo x10.0.7.

A linhagem HL60 tratada com as substâncias 1, 2, 3 e 4 mostraram um perfil com predomínio na fase G0/G1, e aumento da quantidade de células em G2/M para substâncias 2 e 4 (Figura 17).

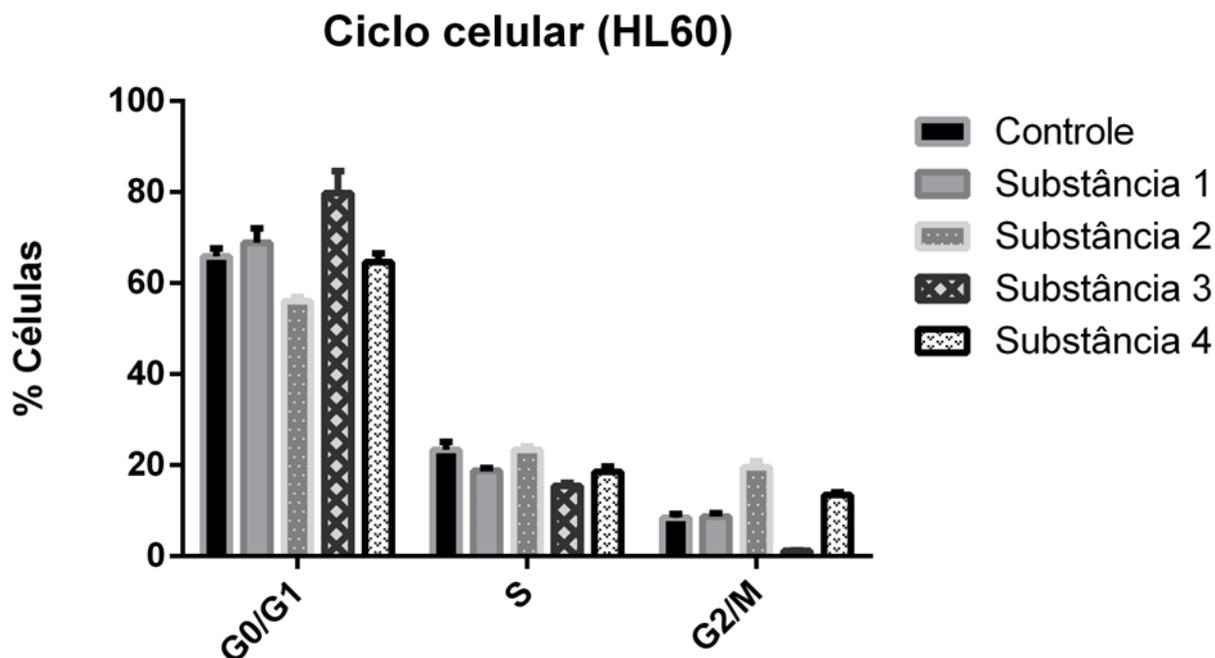


Figura 17-Efeito dos alcaloides no ciclo celular em células HL60. Células HL60 foram incubadas com os alcaloides semi-sintéticos (1,2,3 e 4) e as células sem nenhum fármaco utilizado como controle de tratamento por 48 horas. As fases G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo software FlowJo x10.0.7.

Um tumor cresce quando a taxa de divisão total (produção/mitose) de suas células excede sua taxa de mortalidade total. A capacidade de crescimento descontrolado dentro do tecido do hospedeiro é adquirida por meio do acúmulo de mutações condutoras que permitem que o tumor progrida por meio de vários pontos de controle do câncer. Por isso, escolher as substâncias que possuem índice de seletividade alto juntamente com potencial de indução de morte celular passa a ser um grande objetivo no desenvolvimento de novas substâncias quimioterápicas. A compreensão e aplicabilidade do conhecimento do ciclo celular são de grande valia, uma vez que os principais pontos de controle dessa progressão celular estão exatamente no ciclo mitótico (ANTTILA *et al.*, 2019).

Por isso este trabalho, após selecionar as substâncias mais potentes para morte celular segundo técnica de avaliação por MTT, também avaliou a interferência com crescimento celular utilizados por potenciais fármacos como os alcaloides.

O ciclo de divisão celular tem por finalidade a manutenção dos eventos mitóticos que incluem as seguintes ações sequenciais: condensação cromossômica, desmontagem da

lâmina nuclear e outros filamentos intermediários, quebra do envelope nuclear, reorganização dos microtúbulos em um aparelho do fuso mitótico e rearranjos no citoesqueleto. A progressão por meio de cada fase do ciclo celular é rigidamente controlada pelos principais reguladores do ciclo celular, incluindo ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDKs) e inibidores de CDK. A superexpressão da proteína ciclina e/ou seu mRNA é observada em carcinomas de mama, pulmão, colo do útero e carcinomas gastrointestinais, bem como linfoma, leucemia e sarcomas, demonstrando a importância da compreensão do ciclo no processo patogênico (JOHANSSON; PERSSON, 2012).

Duas indagações são frequentes ao se estudar efeitos de interrupção da divisão celular: A primeira é sobre qual melhor efeito para desenvolvimento de novos fármacos, efeito citotóxico ou efeito citostático? Então, a primeira indagação logo é sucedida pela segunda: e qual desses efeitos é mais efetivo no tratamento de neoplasias? Por definição, os fármacos citostáticos não matam as células cancerosas, mas em vez disso, impedem sua proliferação. Um verdadeiro agente citostático deve interromper o crescimento de tumores e pode prevenir o desenvolvimento de metástases sem afetar a redução do tumor. Enquanto o efeito citotóxico consiste em alterar estrutura ou função celular a ponto de causar a morte dessa célula e diminuição dos tumores (HOUGHTON, 1996). Por alguns anos apenas os efeitos citotóxicos eram desejados no contexto das neoplasias, no entanto, muitas vezes esses fármacos apresentavam muita agressividade ao organismo do paciente, e nesses mesmos casos, ao reduzirem as dosagens observou-se que na verdade o efeito poderia ser citostático e tolerável pelos pacientes. Portanto, a distinção entre fármacos citotóxicos e citostáticas não é clara na medicação real: compostos citotóxicos também podem induzir estase com baixas doses e em células resistentes à apoptose, e os efeitos citostáticos muitas vezes também resultam em morte celular em células que estejam em qualquer outra fase do ciclo celular que não a fase quiescente (ANTTILA *et al.*, 2019).

Por isso, ao estudarmos efeitos dos fármacos, importa que haja alguma interação com o ciclo, a exemplo os taxanos e alcaloides da Vinca, que são fármacos de ligação de microtúbulos e são exemplos de agentes quimioterápicos clinicamente eficientes que visam especificamente a mitose. A estabilização de microtúbulos induzida por esses compostos faz com que as células se acumulem na prometáfase como consequência da sinalização do ponto de verificação mitótico dos cinetócoros não ligados. O resultado

primário do tratamento com taxanos é a parada mitótica, que muitas vezes leva à morte celular. Outro fármaco que é utilizada no tratamento de LMA e interfere com o ciclo é o etoposídeo. Trata-se de um potente inibidor da enzima nuclear topoisomerase I, uma enzima que funciona principalmente na fase S do ciclo celular. O fármaco tem como alvo o ponto de verificação do ciclo celular, como a ciclina B1, e atua como inibidor da topoisomerase I. Esse cenário traz outra conjuntura à discussão: o fato de que o “momento celular” provavelmente seja mais importante que o efeito seja citostático ou citotóxico, principalmente para uso sinérgico de fármacos. Uma vez que fármacos, como etoposídeo, ao atuarem em células que se encontram na fase S são 100-1000 vezes mais sensíveis do que quando atuam em células na fase G1 ou G2 (JOHANSSON; PERSSON, 2012).

Usando uma abordagem experimental computacional e modelos matemáticos, pesquisadores tentaram discernir os efeitos citotóxicos dos citostáticos em células que estavam na fase S no momento do tratamento e nas células que estavam em G1 e G2-M e identificaram diferenças dependentes do ciclo celular. Eles puderam prever que a terapia citotóxica é superior quando a metástase é o modo predominante de progressão na neoplasia (RIXE; FOJO, 2007).

De uma maneira geral, trabalhos anteriores concluem que o fato de que ocorra uma parada celular em uma fase do ciclo diferente de G0 nunca fez parte do projeto da natureza e torna-se intolerável e leva a morte celular. Portanto, ao apresentar um percentual de parada no ciclo celular diferente de G0 com todas as substâncias para todas as linhagens no presente trabalho, deixamos a sugestão de que todos derivados de alcaloides marinhos aqui selecionados tem potencial terapêutico nessas linhagens de leucemias promielocíticas.

Na linhagem celular HL60, há predomínio das células em G0/G1 com um perfil aumentado de parada celular nas fases G2-M e S para substâncias 2 e 4, similarmente aos efeitos das camptotecinas (BORGNE *et al.*, 2006).

A linhagem NB4, por sua vez, apesar do predomínio celular em fase G1, mostrou diferença para aumento da quantidade de células na fase S e G2-M para substância 6; enquanto para substância 7 uma quantidade maior de células demonstrou um aumento da parada do ciclo em G2-M, do mesmo modo de agentes alquilantes como clorambucil (AL-SAWAF *et al.*, 2020).

Já a linhagem NB4-R2, manteve o predomínio em fase G1, mas com acúmulo de células na fase S em relação ao controle de tratamento, principalmente para substância 1.

De uma maneira geral, os resultados sugerem uma interferência na divisão celular. Essa interrupção parece ser similar às substâncias com estrutura química parecida, os alcaloides da Vinca que são classificados como antimitóticos (BRANDÃO, HUGO N. JUCENI P. DAVID, 2010)

Para complementar informações encontradas nos resultados de ciclo celular e desvendar melhor o mecanismo de ação dessas substâncias análogas de 3-APA, foi realizada a análise dos transcritos dos genes relacionados à via de sinalização da apoptose. A regulação do ciclo celular é importante fator nas neoplasias, pois, o acúmulo de células clonais é um sinal clássico dessas patologias, seja por falha na indução da apoptose, seja por exacerbação dos mecanismos antiapoptóticos. Dessa maneira, alterações no controle das vias que levam à apoptose podem levar à manifestação da leucemia, porém essas modificações de regulação de ciclo e morte celular sozinhas não provocam aparecimento da leucemia nos modelos animais, o que sugere que a manifestação é multifatorial, corroborando o perfil heterogêneo dessas malignidades hematológicas (LIAO *et al.*, 2001).

6.4 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

6.4.1 Expressão de genes da apoptose

A fim de avaliar as vias de sinalização envolvidas na apoptose nas células leucêmicas tratadas com os compostos selecionados, foi feita análise de expressão gênica por teste de PCR quantitativo em tempo real. Nas **Figuras 18 a 20** estão representadas as expressões relativas de cada gene alvo em relação ao controle de tratamento (células sem tratamento (CV), consideradas como 1 - calibrador), utilizando como gene normalizador o *GAPDH*. Dessa maneira, foi utilizado o gene *GAPDH* como gene de controle endógeno. Enquanto os valores relativos de expressão encontrados foram comparados entre os genes normalizadores e os genes de interesse comparativamente entre linhagem submetida à substância de estudo e a mesma linhagem sem tratamento nenhum, ou seja, aplicou-se o método comparativo $2^{\Delta\Delta Ct}$ conforme descrito no item 5.8.3.

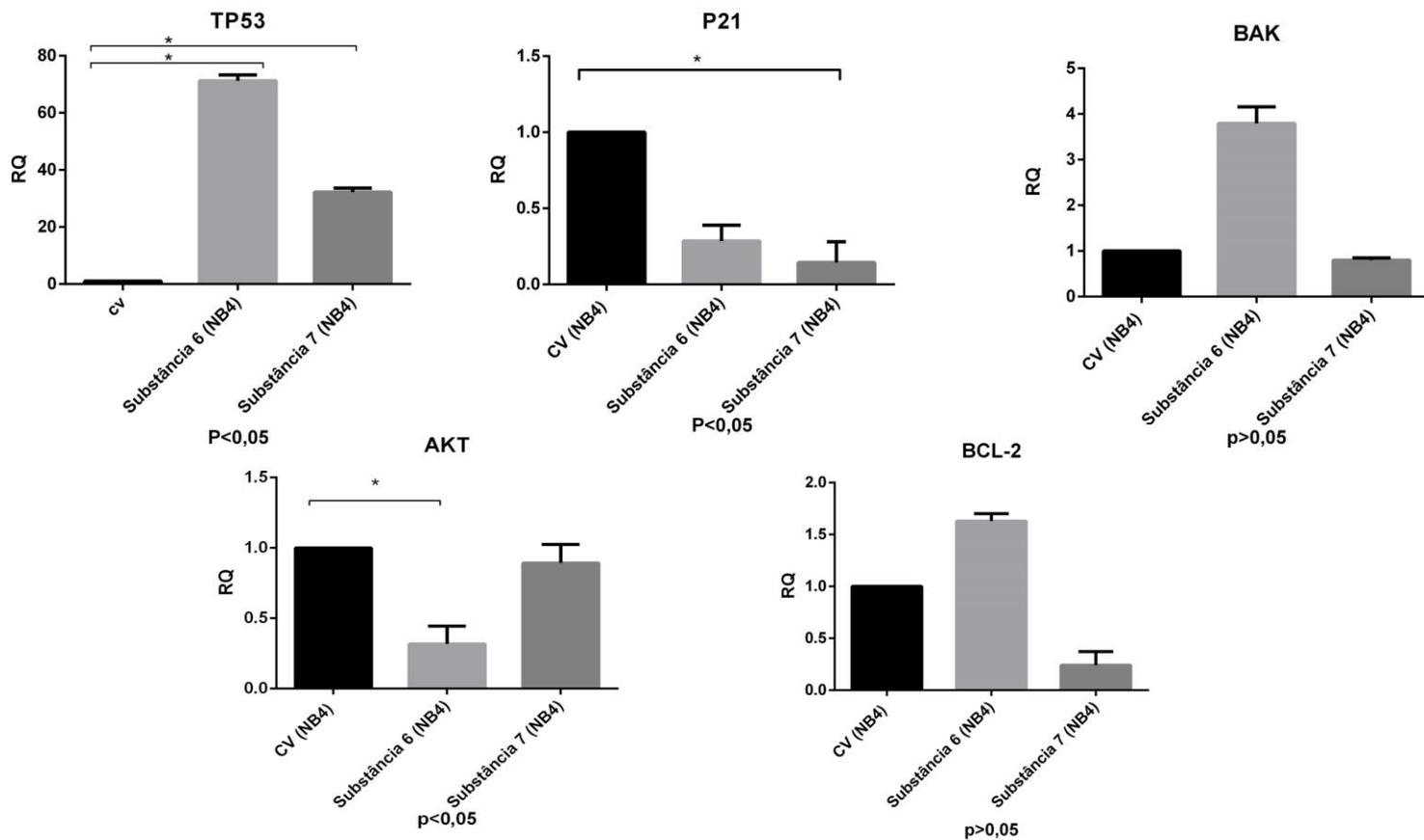


Figura 18-Efeito das substâncias 6 e 7 na expressão dos genes alvos na linhagem NB4. RQ: *relative quantification* (quantificação relativa). CV: *controle de células viáveis*. As células (1×10^6) foram incubadas com as substâncias 6 e 7 por 48 horas. Cada barra representa a Mediana \pm Desvio padrão (n=4) da quantificação relativa. Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento considerado como 1. Valor de *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle sem tratamento.

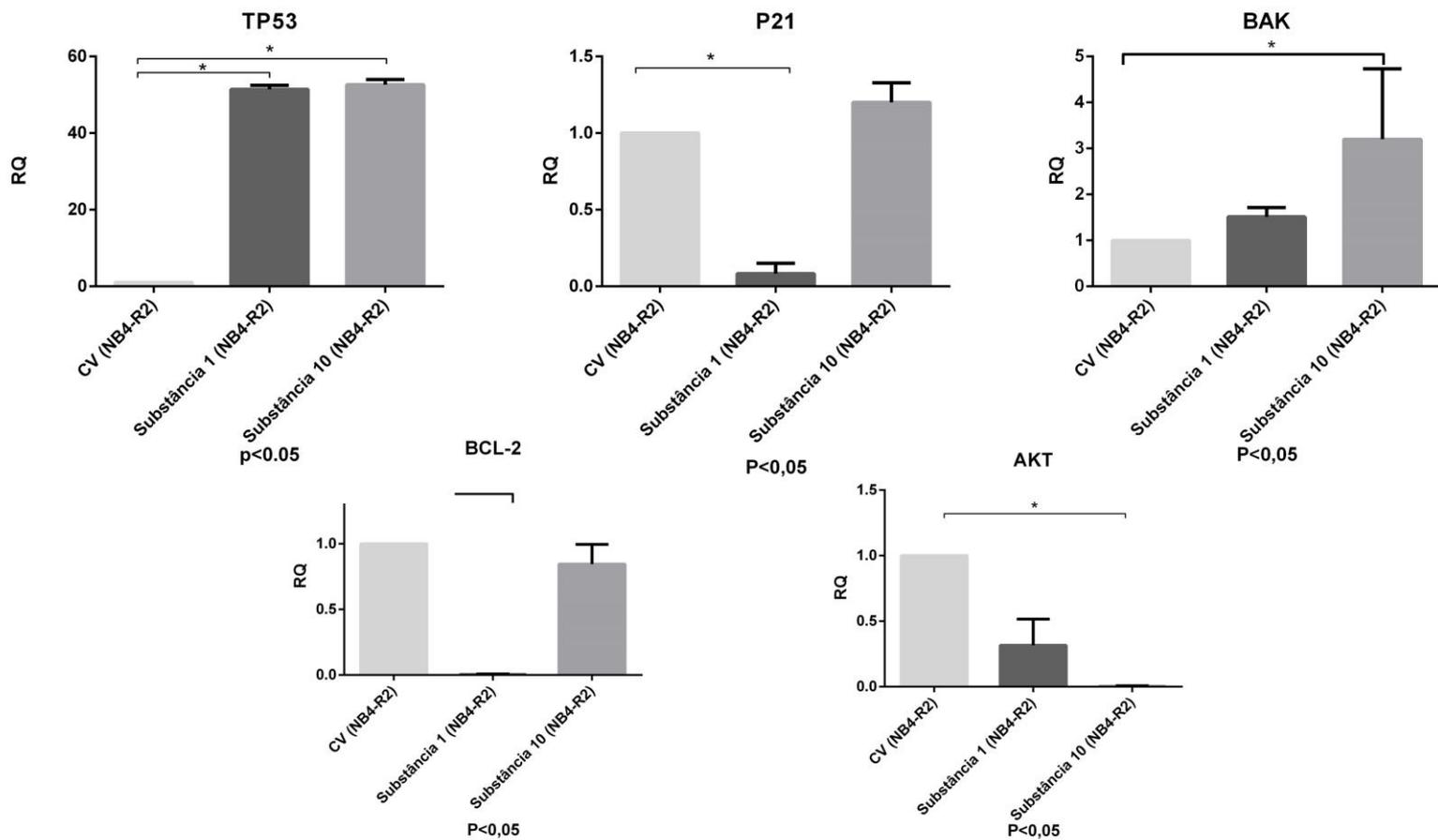


Figura 19-Efeito das substâncias 1 e 10 na expressão dos genes alvos na linhagem NB4-R2.

RQ: relative quantification (quantificação relativa). *CV*: controle de células viáveis.

As células (1×10^6) foram incubadas com as substâncias 1 e 10 por 48 horas. Cada barra representa a Mediana \pm Desvio padrão ($n=4$) da quantificação relativa. Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento considerado como 1. Valor de $*p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle sem tratamento.

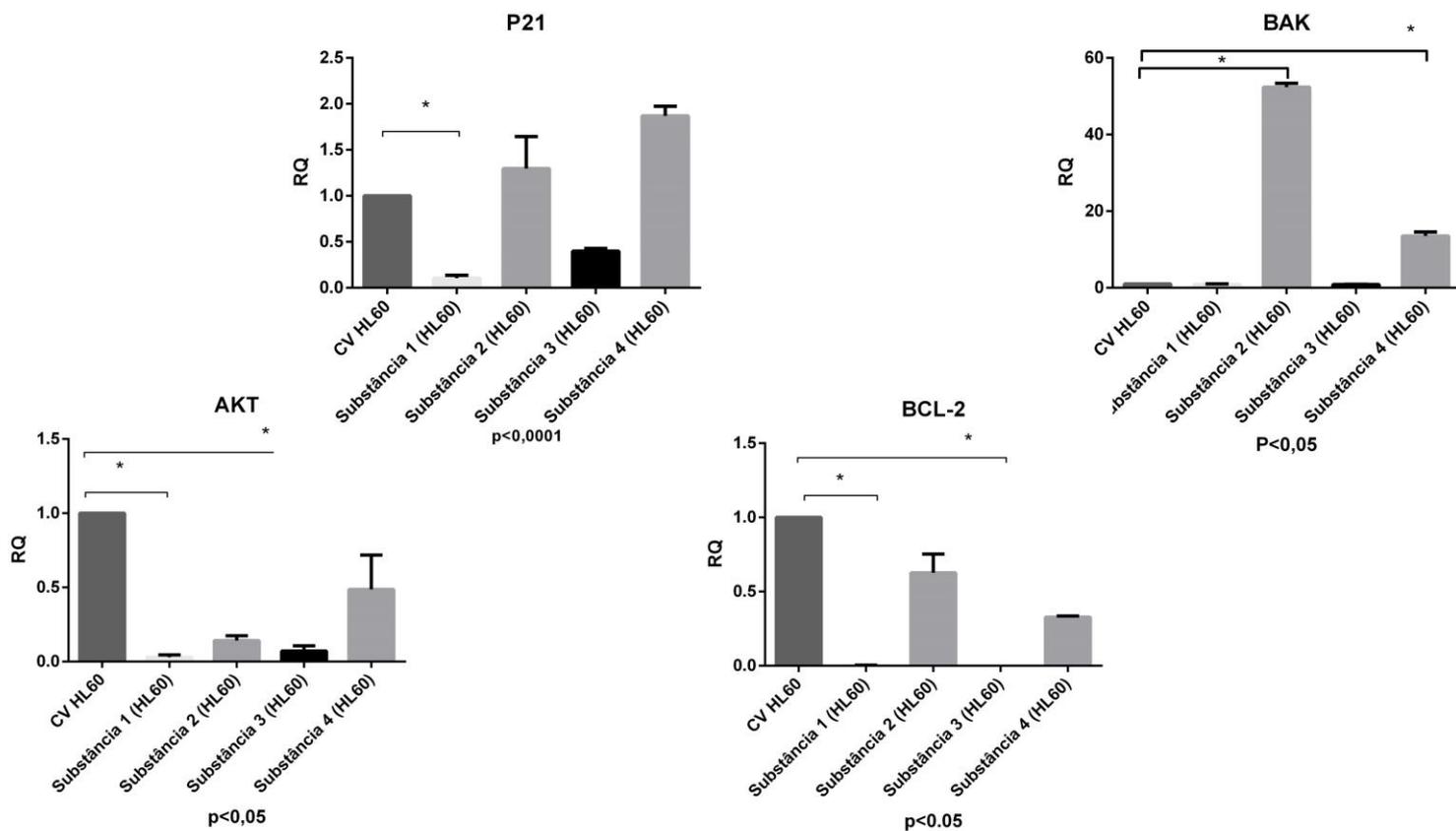


Figura 20-Efeito das substâncias 1,2,3 e 4 na expressão dos genes alvo na linhagem HL60. RQ: *relative quantification* (quantificação relativa). CV: *controle de células viáveis*. As células (1×10^6) foram incubadas com as substâncias 1, 2, 3 e 4 por 48 horas. Cada barra representa a Mediana \pm Desvio padrão (n=4) da quantificação relativa. Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento considerado como 1. Valor de *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle sem tratamento.

Avaliação da expressão gênica congrega esclarecimentos sobre os mecanismos de morte celular. Uma vez que houve perfil predominante de morte celular por apoptose, alguns genes foram selecionados para elucidar se houve desvio da via para pró-apoptose ou diminuição de mecanismos de antiapoptose.

A proteína p53 é um importante fator de transcrição celular envolvido na indução da apoptose e também na ativação da proteína p21 que resulta na parada da fase G1 do ciclo celular (SUGIMOTO *et al.*, 1991; DENG, 2016; DYSHLOVOY *et al.*, 2017). Já a ativação do gene *BAK* está diretamente relacionada a formação de poros mitocondriais atuando na pró-apoptose, cuja proteína também atua na ativação da proteína p21 que resulta na parada do ciclo celular. No entanto, estudos sugerem um papel antiapoptótico para p21, sendo a evidência indireta para esta visão foi fornecida por Kreis et al (2019),

que relataram que altos níveis de expressão desse gene em blastos leucêmicos obtidos de pacientes com LMA se correlacionaram com uma resposta pior à quimioterapia. Assim como relatado no item 2.4 do presente trabalho, esse gene pode ter um papel dual na morte celular, pois baixos danos ao DNA aumentam expressão de p21 que interrompe o ciclo celular para reparo, inibindo a apoptose. Mas danos graves ao DNA clivam p21, não permitindo reparo e favorecendo a morte celular. Uma vez que a indução da maturação das células leucêmicas demonstrou reduzir a suscetibilidade das células leucêmicas à morte celular induzida por fármacos, é possível que a regulação positiva de p21 represente um componente da resposta de diferenciação que antagoniza a apoptose.

Já a proteína Bcl-2 atua de maneira antiapoptótica assim como gene *AKT* (HOUSMAN *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2019). O protooncogene *Bcl-2* codifica a proteína BCL-2 que é inibidora da apoptose ao prevenir a liberação de proteínas mitocondriais que ativam vias das caspases (BANJARA *et al.*, 2020). AKT é um mediador geral do fator de crescimento celular, capaz de suprimir a pressão apoptótica de morte que vão desde escape de desequilíbrios no ciclo celular à danos ao DNA por alterar mecanismos de glicólise (LIU, JIAN *et al.*, 2020).

A linhagem celular NB4, apresentou perfis diferentes para as substâncias selecionadas. Para substâncias 6 e 7, houve aumento de expressão significativa do gene de *TP53*, e aumento aparente na expressão de *BAK* e *Bcl-2*, havendo também, diferença significativa na diminuição no gene *AKT*. Já para substância 7, houve diminuição aparente de *Bcl-2* e diminuição significativa do gene de p21. Há, portanto, aumento da apoptose para substâncias 6 e 7 por *TP53* e uma resposta de diminuição de antiapoptose para ambas substâncias 6 e 7 (**Tabela 3**).

Tabela 3-Balanco da expressão de genes pro e antiapoptose na linhagem celular NB4 para substâncias 6 e 7.

Linhagem NB4			
	Genes	Substância 6	Substância 7
Pró-apoptose	<i>TP53</i>	+*	+*
	<i>BAK</i>	+	~
Antiapoptose	<i>p21</i>	-	-*
	<i>Bcl-2</i>	+	-
	<i>AKT</i>	-*	-

(+): aumento na expressão comparado com o gene calibrador; (-): diminuição na expressão comparado com gene calibrador; (*): diferença significativa ($p < 0,05$); (~) sem alteração no padrão de expressão.

A expressão na linhagem NB4-R2 teve resposta de diminuição da antiapoptose para substância 1, pois houve diminuição de expressão significativa para os genes *p21* e *Bcl-2*, e aumento da indução da apoptose por *TP53*. Enquanto para substância 10, houve aumento da expressão para *TP53* e *BAK*, e diminuição para *AKT* aumentando expressão portando mecanismos apoptóticos e diminuindo expressão de antiapoptóticos (**Tabela 4**).

Tabela 4-Balanco da expressão de genes pro e antiapoptose na linhagem celular NB4-R2 para substâncias 1 e 10.

Linhagem NB4-R2			
	Genes	Substância 1	Substância 10
Pró-apoptose	<i>TP53</i>	+*	+*
	<i>BAK</i>	+	+*
Antiapoptose	<i>p21</i>	-*	+
	<i>Bcl-2</i>	-*	-
	<i>AKT</i>	-	-*

(+): aumento na expressão comparado com o gene calibrador; (-): diminuição na expressão comparado com gene calibrador; (*): diferença significativa ($p < 0,05$); (~) sem alteração no padrão de expressão.

A na linhagem HL60 é associada à ausência de expressão de p53. No entanto, outros oncogenes podem compartilhar funções fisiológicas semelhantes. Portanto não foi apresentada expressão de *TP53* para esta linhagem, mas se destacaram nessa linhagem as substâncias 1 e 3. Para substância 1 se destacou a diminuição da expressão de *p21*, *Bcl-2* e *AKT* com um perfil de diminuição da antiapoptose. A substância 3 manteve o perfil da diminuição da antiapoptose, pois houve diminuição na expressão de *Bcl-2* e *AKT*. Para as substâncias 2 e 4 houve aumento significativo na expressão do gene *BAK*. (**Tabela 5**).

Tabela 5-Balço da expresso de genes pro e antiapoptose na linhagem celular HL60 para substâncias 1,2,3 e 4.

Linhagem HL60					
	Gene	Substância	Substância	Substância	Substância
		1	2	3	4
Pró-apoptose	<i>BAK</i>	~	+*	~	+*
Antiapoptose	<i>p21</i>	-*	~	-	+
	<i>Bcl-2</i>	-*	-	-*	-
	<i>AKT</i>	-*	-	-*	-

(+): aumento na expresso comparado com o gene calibrador; (-): diminuio na expresso comparado com gene calibrador; (*): diferena significativa ($p < 0,05$); (~) sem alterao no padro de expresso.

O processo de regulao do ciclo e morte celular, possui vrios pontos de checagem e interao entre as vias (MURA *et al.*, 2019), mas o que define o perfil para sobrevivncia ou morte celular o balço dessas expresses dos genes pro e antiapopticos e suas proteinas (**Figura 21**).

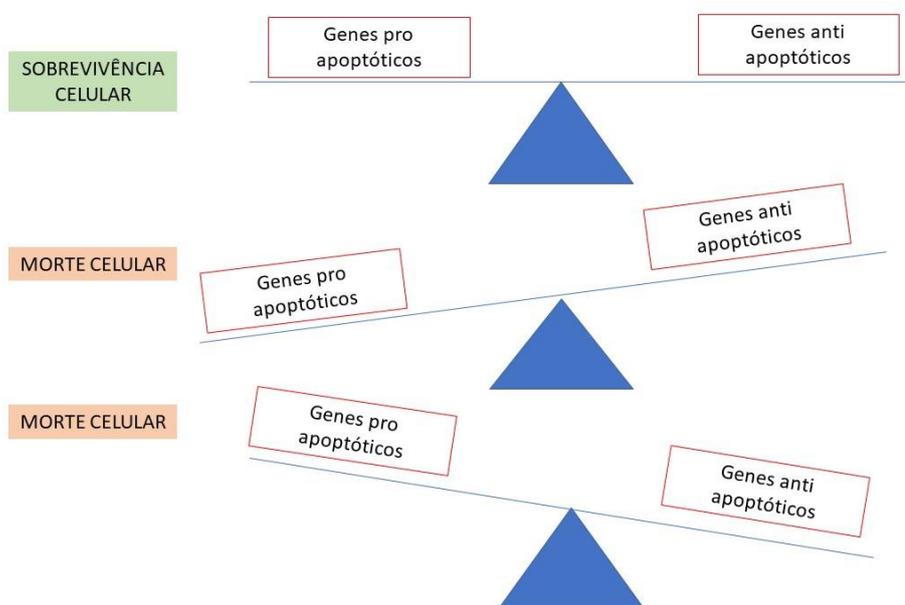


Figura 21-Esquema de representao do equilbrio de fatores pro e antiapopticos na sobrevivncia ou morte celular.

No presente estudo com as substâncias análogas 3-APA, não houve diminuição da pró-apoptose, ou aumento da antiapoptose para nenhuma substância selecionada, em nenhuma linhagem utilizada, fortalecendo o potencial citotóxico dessas substâncias.

Uma vez que as leucemias têm tendência de acumular células por falhas na apoptose (Testa, 2007), é provável que o diferencial dessas substâncias derivadas de alcaloides marinhos aqui apresentada neste trabalho, se destaquem por diminuir esse perfil da antiapoptose.

6.4.2 Expressão de genes de estresse oxidativo

Os agentes quimioterápicos podem induzir lesões no DNA, expondo a células a uma grande quantidade de agentes genotóxicos, como ROS (DAKIK et al., 2021). Desta forma, o aumento do estresse oxidativo nas células produz lipídios oxidados, proteínas e DNA danificados, o que conseqüentemente leva à morte celular. As ROS geradas pela família NOX de NADPH oxidases (NOX) emergiram como importantes substâncias reguladoras e de sinalização que modulam o crescimento de células vasculares, migração, organização do citoesqueleto e função de barreira. Vários estudos relataram que diferentes tipos celulares quando expostos aos tratamentos apresentaram um aumento da expressão e da atividade da NADPH oxidase aumentando conseqüentemente a produção de espécies reativas de oxigênio. Em linhagens celulares de LMA, a expressão de genes e/ou proteínas de NOX1, NOX2, NOX4 e p47phox foi relatada (HOLE et al., 2013a). A p47phox é uma subunidade reguladora citosólica de NOX, e sua fosforilação e translocação para a subunidade catalítica NOX2 em membranas é uma etapa necessária para a montagem e ativação de NOX (MARALDI et al., 2009).

As **Figuras 22, 23 e 24** abaixo, representam a expressão genica de *NOX1*, *NOX2*, *NOX4* e *p47phox* e estão representadas as expressões relativas de cada gene alvo em relação ao controle de tratamento (células sem tratamento (Controle), consideradas como 1 - calibrador), utilizando como gene normalizador o *GAPDH*.

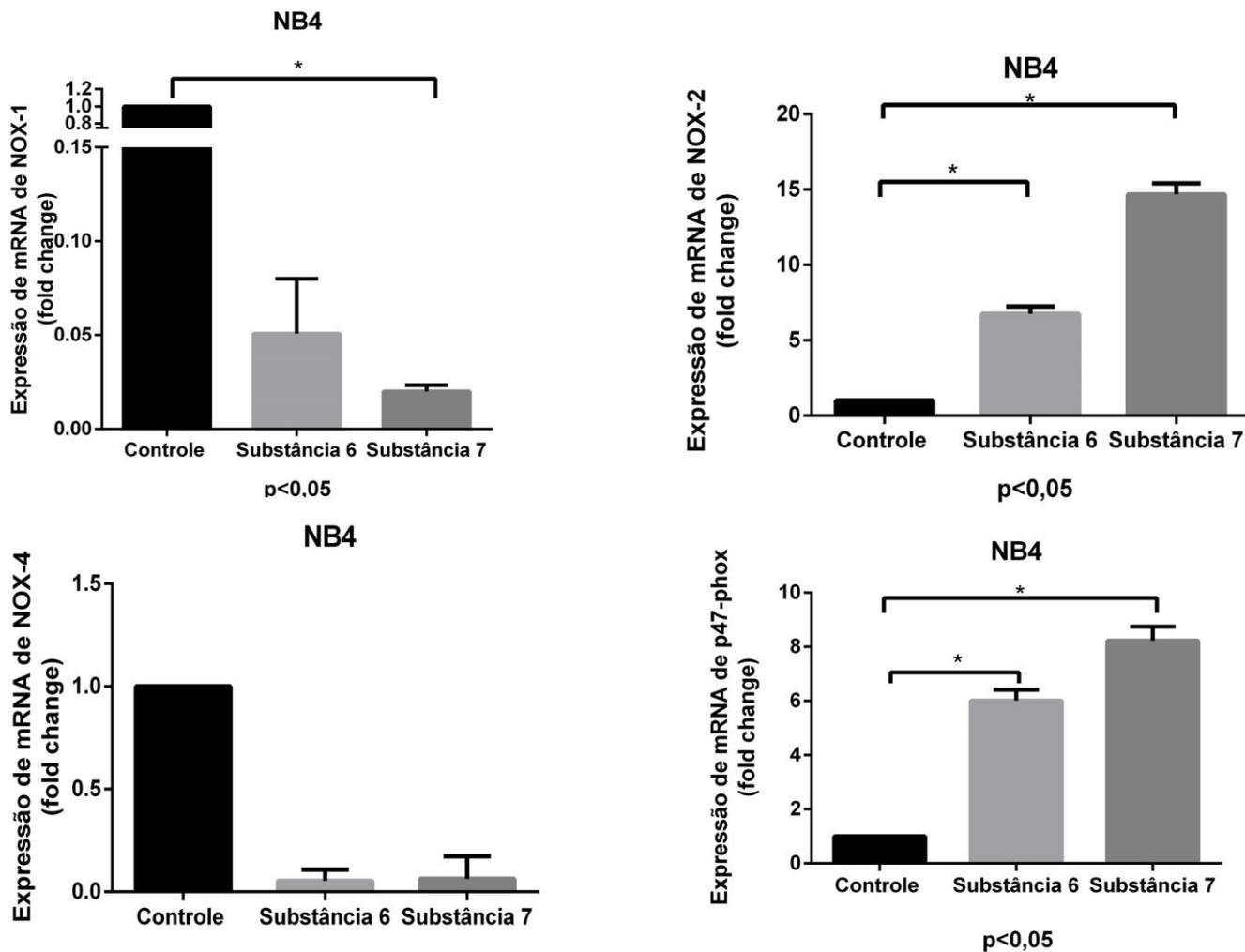


Figura 22-Efeito das substâncias 6 e 7 na expressão dos genes de estresse oxidativo na linhagem NB4. *Fold change: expressão relativa do gene.* As células (1×10^6) foram incubadas com as substâncias 6 e 7 por 48 horas. Cada barra representa a Mediana \pm Desvio padrão ($n=3$) da quantificação relativa. Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento (Controle) considerado como 1. Valor de $*p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle sem tratamento.

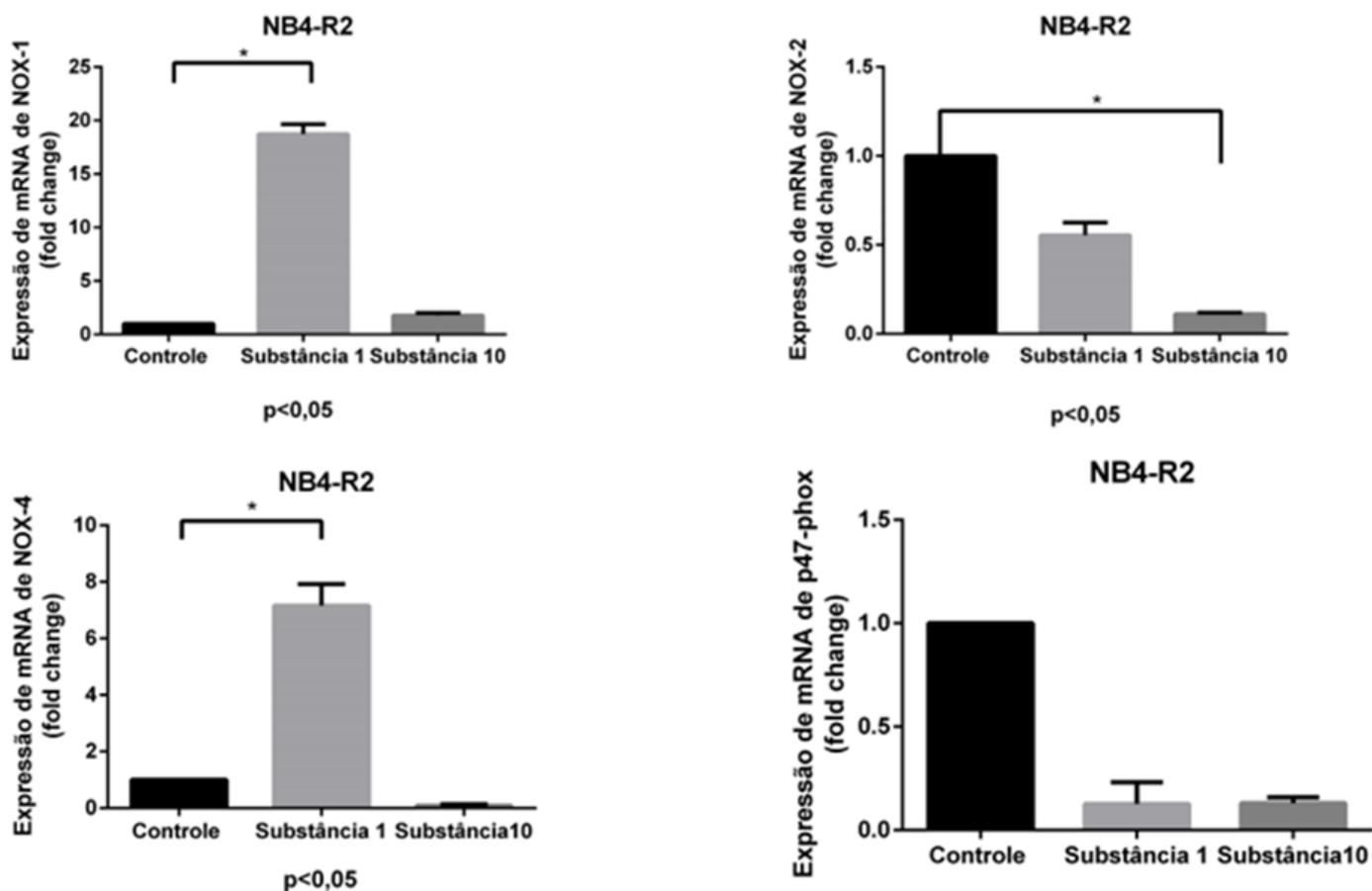


Figura 23-Efeito das substâncias 1 e 10 na expressão dos genes de estresse oxidativo na linhagem NB4-R2. *Fold change: expressão relativa do gene.* As células (1×10^6) foram incubadas com as substâncias 1 e 10 por 48 horas. Cada barra representa a Mediana \pm Desvio padrão ($n=3$) da quantificação relativa. Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento (Controle) considerado como 1. Valor de $*p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle sem tratamento.

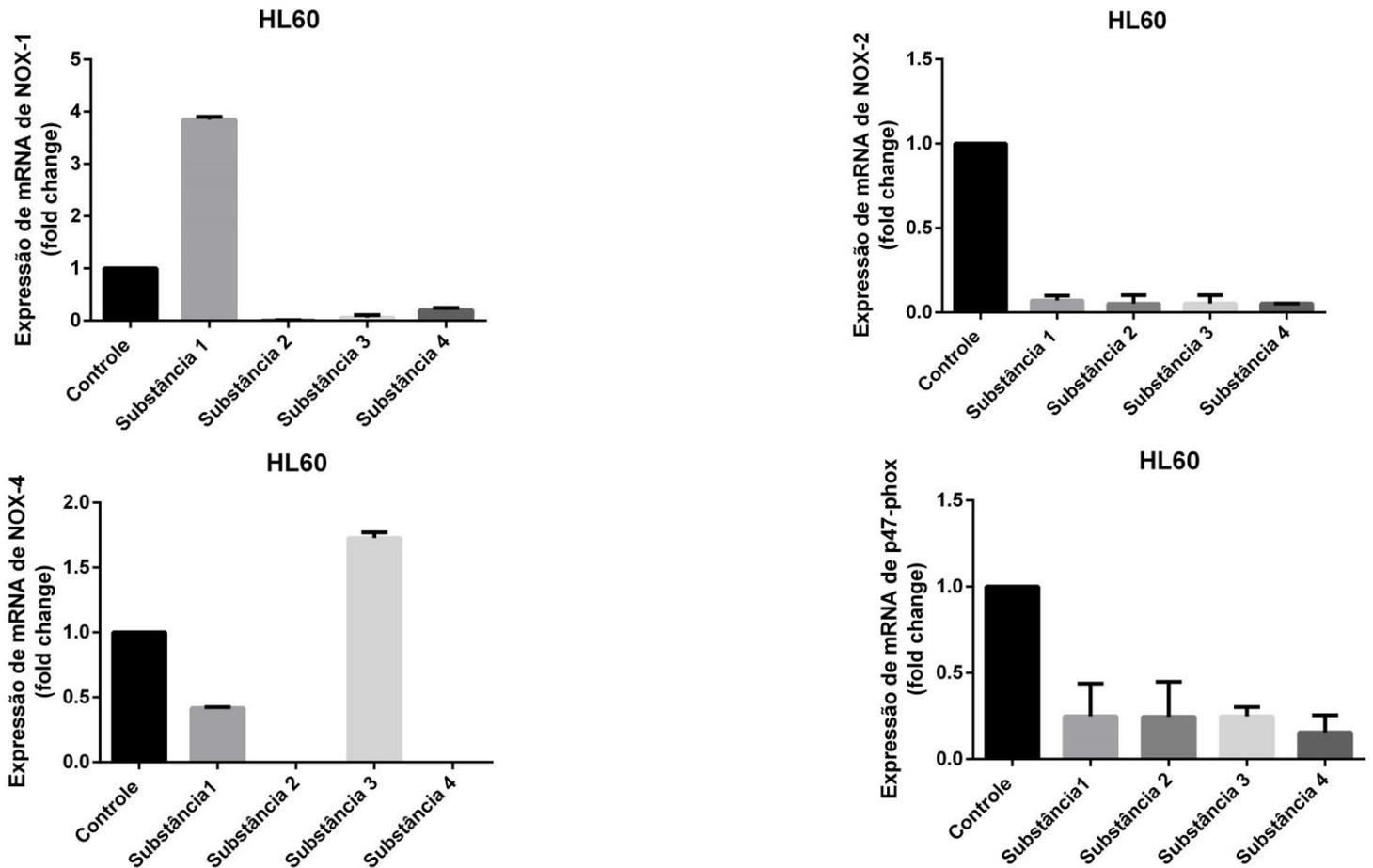


Figura 24-Efeito das substâncias 1,2,3 e 4 na expressão dos genes de estresse oxidativo na linhagem HL60. *Fold change: expressão relativa do gene.* As células (1×10^6) foram incubadas com as substâncias 1 e 10 por 48 horas. Cada barra representa a Mediana \pm Desvio padrão ($n=3$) da quantificação relativa. Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento (Controle) considerado como 1. Valor de $*p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle sem tratamento.

Foi demonstrado que dependendo dos níveis de ROS, podem existir influência na hematopoiese, ou na leucemogênese ou na MCP. Um baixo nível de ROS é frequentemente associado com a auto-renovação de células-tronco leucêmicas e diferenciação celular, enquanto um nível moderado foi associado à proliferação de blastos, já o alto nível, tolerado pela célula, pode oferecer mecanismo de resistência à apoptose com envolvimento em vias de sinalização de MAPK-ERK, Bcl-2 e p53 (DAKIK *et al.*, 2021; REDDY *et al.*, 2011; STANICKA *et al.*, 2015)

A expressão de *NOX1* é mais proeminente no cólon onde é induzido por fatores que representam vários efetores celulares que aumentam sua expressão gênica, estimulando

produção de ROS. A superexpressão de *NOX1* demonstrou promover a carcinogênese em algumas linhagens, como de fibroblastos. No entanto, tem sido sugerido que NADPH oxidase NOX1 desempenha um papel crucial apenas na iniciação da tumorigênese, pois sua expressão é limitada ao início da carcinogênese e fica desregulada em estágios avançados de cânceres, excluindo câncer de cólon no qual permanece elevada sua expressão. (MITSUSHITA; DAVID LAMBETH; KAMATA, 2004). Nos estudos de LMA, expressão de *NOX1*, bem como de *NOX4* encontram-se maiores do que em células saudáveis. O aumento dos níveis de ROS diminui a expressão de *NOX1*, por diminuir ativação de fatores como p^{38MAPK} , que estimulam produção de NOX1 (HOLE et al., 2013b; PARASCANDOLO; LAUKKANEN, 2019a).

Expressão de *NOX2* depende de uma unidade citosólica o p47-phox para ativação, esse complexo é característico em leucócitos, principalmente os que possuem atividade fagocítica. Mas no contexto das LMA, sua investigação vai além das funções normais e foi demonstraram que NOX2 está envolvida na diferenciação celular. A diminuição da sua expressão também diminuiu a viabilidade celular (IRWIN; RIVERA-DEL VALLE; CHANDRA, 2013; MASON *et al.*, 2021; REDDY *et al.*, 2011). Corroboram esses achados o fato dos componentes do complexo NOX2 serem expressos de forma ubíqua na LMA, mas apresentam expressão inferior nos subgrupos t(8;21) e t(15;17) (DAKIK *et al.*, 2021)

A diferença mais marcante entre NOX4 e outras isoformas é a alta concentração de ROS produzido pela enzima, mais especificamente H_2O_2 . Embora sua expressão não seja exacerbada, como relatado para *NOX2*, NOX4 parece permanecer constitutivamente ativada. Sua atuação nas LMAs tem sido relatada favorecendo a sobrevivência celular, inclusive inativação de NOX4 demonstrou reduzir níveis de ROS em linhagens de LMAs. Seu envolvimento com FLT3-IDT explica grande parte desses achados, uma vez que FLT3 mutado possui um fator de transcrição capaz de se ligar às regiões promotoras de *NOX4*, que por sua vez, contribui para inativação da proteína tirosina fosfatase do tipo J cuja influência é regular negativamente o FLT3. Portanto, NOX4 ao inativar essa proteína tirosina fosfatase do tipo J, favorece ativação de FLT3 e a transformação de células hematopoiéticas (AURELIUS *et al.*, 2012; IRWIN; RIVERA-DEL VALLE; CHANDRA, 2013; PARASCANDOLO; LAUKKANEN, 2019b; STANICKA *et al.*, 2015).

Células de linhagens de LPA demonstraram p47phox como importante fonte de ROS após tratamento com ATO cuja expressão aumentou em até 400 vezes. Da mesma forma, *PI3K-AKT* pode ser ativado por níveis elevados de ROS e ativar p47phox. Portanto, *p47phox* parece ser expresso como mecanismo de sobrevivência celular diante do aumento de ROS. Sabe-se que células da LPA, de maneira geral assim com a maioria das células tumorais, possui nível elevado de NOX, e peculiarmente, a inibição de NOX nessas linhagens diminuiu a sensibilidade das células ao tratamento com ATO, demonstrando importante associação do mecanismo do estresse oxidativo para atuação dessa terapia alvo. (CHOU *et al.*, 2004; IRWIN; RIVERA-DEL VALLE; CHANDRA, 2013; VIVAS-MEJÍA *et al.*, 2009; WANG, JIE *et al.*, 2008; WANG, TING-YU *et al.*, 2007)

Como observado, há uma variação na expressão de NOX de acordo com tipo celular e resposta celular para sobrevivência, diferenciação ou MCP. A expressão significativa de *NOX2* concomitantemente com *p47phox* na linhagem NB4, é coerente com a coativação relatada dos genes. No entanto, o aumento da expressão de *NOX2* e *p47phox* parece demonstrar mecanismo de tentativa de reparo celular após exposição às substâncias selecionadas de 3-APA neste trabalho. Mas sabendo o desfecho de morte celular avaliado previamente, é como se os efeitos citotóxicos já não pudessem ser revertidos.

Em relação a linhagem NB4-R2, houve aumento significativo da expressão de *NOX1* e *NOX4*. A expressão de *NOX1* foi relatada inativando gene *AKT* (PALETTA-SILVA; ROCCO-MACHADO; MEYER-FERNANDES, 2013) e esse dado corrobora com nossos achados prévios de expressão gênica com tendência de diminuir a antiapoptose nas linhagens.

Já a expressão de *NOX4* tem sua atividade dependente do contexto, a sua deleção, por exemplo, foi relatada favorecendo a sobrevida em modelos murinos de LMA (DEMIRCAN *et al.*, 2022). Assim poderíamos formular uma hipótese de que o aumento da expressão de *NOX1* e *NOX4* continuariam tentando aumentar nível ROS intracelularmente a fim de conduzir as células da linhagem NB4-R2 à apoptose triada nos testes de citometria.

A falta de diferença significativa na expressão de *NOX1*, *NOX2*, *NOX4* e *p47phox* na linhagem HL60, orienta nossa hipótese de que afetar apoptose para morte celular foi mais eficiente que estimular via de produção ROS.

A ativação mais que a expressão dessas proteínas NOX é a fonte primária de regulação no estresse oxidativo (IRWIN; RIVERA-DEL VALLE; CHANDRA, 2013). No entanto, compreender os mecanismos que a célula evoca a nível de expressão gênica pode indicar o status do nível de estresse das células e mapear as principais vias pelas quais ela tenta sobreviver.

Uma vez demonstrado que as linhagens celulares morreram com predomínio pela via apoptótica e principalmente por diminuição da antiapoptose (capítulos 6.2 e 6.3.1), isso suporta a suposição de que as substâncias selecionadas neste trabalho podem interagir a nível celular inibindo alguma etapa nas vias de MCP. Isso se correlacionaria com a tentativa de a célula induzir reparo e sobrevivência por vias alternativas que levassem ao aumento de expressão de *NOX*, mas não sendo via estresse oxidativo o principal mecanismo de morte para essas linhagens.

A fim de tentar elucidar por qual via esse conjunto de alterações celulares, como ciclo, morte, apoptose e estresse oxidativo, poderiam estar correlacionadas, a busca por similaridade química se mostrou de importante ferramenta.

6.5 Avaliação de alvos moleculares por similaridade química das substâncias selecionadas

Encontrar compostos para um alvo conhecido é a abordagem convencional em programa de química medicinal. No entanto, a descoberta de moléculas bioativas pode ocorrer por triagens biológicas e, em muitos casos, compostos promissores podem ser identificados e seu mecanismo de ação pode e deve ser explorado em sequência. Com a quantidade de dados de atividades biológicas cada vez mais disponíveis, a busca de alvos para estes compostos pode ser auxiliada por métodos computacionais. Por exemplo, a técnica chamada *target fishing* é uma abordagem que visa prever alvos biológicos de moléculas baseado em sua estrutura química, um método de determinação *in silico* de alvos moleculares (PERAGOVICS *et al.*, 2013).

Estratégias computacionais de *target fishing* são empregadas para identificar os alvos moleculares mais prováveis de uma substância em estudo. Este processo permite a identificação do modo de ação de fármacos conhecidos, reposicionamento de fármacos ou a predição dos efeitos adversos de um composto. A grande quantidade de informações disponíveis sobre a bioatividade de milhares de moléculas permite o desenvolvimento

desses tipos de estratégias. Nos últimos anos, temos testemunhado o surgimento de muitos métodos para *target fishing*. Alguns desses métodos baseiam-se no princípio da similaridade molecular, ou seja, moléculas similares podem se ligar aos mesmos alvos e apresentarem bioatividades semelhantes. (CERETO- MASSAGUÉ et al., 2015a).

Utilizando como busca no banco de dados ChEMBL, as linhagens celulares NB4 e HL60 tiveram associação com o banco de dados e foram selecionados os compostos com IC₅₀ e GI₅₀ definidos.

A similaridade estrutural foi calculada entre todas as substâncias de interesse (substâncias 1,2,3,4,6,7 e 10) e os compostos provenientes da pesquisa no ChEMBL.

A busca inicial retornou 36 resultados com pelo menos 75% de similaridade química entre as substâncias estudadas e substâncias já com alvo descritas no banco de dados.

A partir dessa triagem, esses compostos foram investigados e a quantidade de alvos para cada composto similar foi compilado no **Tabela 6** abaixo.

Tabela 6. Relação de compostos e alvos encontrados por similaridade química com as substâncias selecionadas

ID COMPOSTO	Substância 1	Substância2	Substância3	Substância 4	Substância 6	Substância 7	Substância 10	Quantidade de alvos preditos
CHEMBL1972144	0,827	0,827	0,821	0,827	0,851	0,851	0,820	18
CHEMBL1977816	0,778	0,778	0,784	0,778	0,785	0,785	0,760	28
CHEMBL1994350	0,773	0,773	0,768	0,773	0,780	0,780	0,755	8
CHEMBL1974161	0,768	0,768	0,763	0,768				17
CHEMBL28072	0,760	0,760	0,755	0,760	0,792	0,792	0,765	18
CHEMBL2413763	0,759	0,759	0,755	0,759	0,788	0,788		16
CHEMBL1974649	0,759	0,759	0,754	0,759	0,779	0,779	0,752	8
CHEMBL1999074	0,756	0,756	0,751	0,756				17
CHEMBL225697	0,755	0,755	0,750	0,755	0,822	0,822	0,748	7
CHEMBL389183	0,755	0,755	0,750	0,755	0,822	0,822	0,748	6
CHEMBL2002004	0,754	0,754	0,750	0,754			0,791	9
CHEMBL173615					0,782	0,782	0,791	12
CHEMBL1965393					0,782	0,782		5
CHEMBL1984326					0,760	0,760	0,781	7
CHEMBL1992180					0,760	0,760	0,758	7
CHEMBL1985761					0,759	0,759		9
CHEMBL2375380					0,759	0,759		17
CHEMBL1977527							0,796	11
CHEMBL1869193					0,776	0,776	0,797	7
CHEMBL2001569					0,752	0,752	0,762	4
CHEMBL1905701					0,778	0,778		7
CHEMBL1995628					0,753	0,753		25
CHEMBL2006525					0,786	0,786		8
CHEMBL4170755					0,784	0,784		23

CHEMBL1964952					0,781	0,781		11
CHEMBL1968858					0,752	0,752		4
CHEMBL1443628					0,735	0,735	0,793	5
CHEMBL1733921					0,750	0,750		8
CHEMBL284742							0,758	6
CHEMBL1973338					0,755	0,755	0,690	19
CHEMBL1984075							0,753	6
CHEMBL1775131					0,750	0,750	0,685	6
CHEMBL2003274							0,760	18
CHEMBL4870868							0,755	18
CHEMBL1983507					0,755	0,755		3
CHEMBL259393							0,750	17
CHEMBL554573 (NB4)	0,712	0,712	0,708	0,712	0,741	0,741	0,728	8

As substâncias selecionadas foram triadas quanto a sua similaridade química, representada por numeral de 0 a 1, sendo, quanto mais próximo de 1, mais próximo de 100%. Seguindo o critério de seleção de 75% de similaridade química entre as substâncias selecionadas e outros compostos descritos previamente e compilados no banco ChEMBL, foram apresentados todas identificações dos compostos encontrados (ID COMPOSTO) e a relação de similaridade química no quadro (de 0 a 1). Predominantemente, há mais resultados para linhagem HL60, exceto última linha na qual está resultado para linhagem NB4, embora abaixo do critério de 75% de similaridade, retornou os mesmos alvos de maior correlação que HL60.

Na busca, as substâncias selecionadas na linhagem HL60 (1,2,3 e 4) apresentaram resultado de 82% a 85% de similaridade com inibidores de Protooncogene tirosina quinase 1 (ROS1).

A inibição desse receptor foi relatada aumentando eficácia do tratamento em LPA, inclusive aumentando eficácia da terapia alvo com ATO(LI, 2018).

O ROS1 é ativador de vias que levam a proliferação e sobrevivência celular, são elas a via JAK/STAT, a via RAS/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. O ROS1 como provável alvo para as substâncias avaliadas nesse trabalho se correlacionaria com resultados encontrados de diminuição da antiapoptose observados na expressão gênica relacionada à apoptose. (JOSHI *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2020)

Ainda para linhagem HL60, as substâncias selecionadas apresentaram cerca de 78% de similaridade com inibidor da Poli(ADP-ribose)polimerase 1 (PARP1) amplamente conhecido como responsável pelo reparo das cadeias de DNA quando ocorre dano celular. A PARP-1 atua como um sensor de danos ao DNA. Ele reconhece os danos ao DNA e facilita o reparo do DNA, recrutando a maquinaria de reparo do DNA para os locais danificados. Se no entanto, outros sinais de danos celulares irreparáveis são gerados e a célula tem sinalização para MCP ativada, PARP1 é clivada pela caspase-3 e em vez de reparo a célula é conduzida à apoptose (WANG, YIJIE; LUO; WANG, 2019). Dessa maneira, a inibição de PARP1 favorece ocorrência de apoptose, e se correlaciona ao perfil de morte predominante avaliado neste trabalho para os 3-APA. Esse achado é corroborado por outros estudos descritos de que inibidor específico de PARP1 niparibe é eficiente no tratamento da LPA, e olaparibe eficiente na morte celular na linhagem HL60 (AURELIUS *et al.*, 2012; GIANANTI *et al.*, 2021).

Em uma busca rápida nos bancos de dados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ao buscar por informações sobre a linhagem HL60, obtivemos 2023 resultados, já ao pesquisar sobre linhagem NB4, obtivemos 283 resultados. Essa diferença na quantidade de estudos certamente impacta ao fazer a busca por similaridade no ChEMBL, no entanto, ainda são muito importantes no contexto desse trabalho para prever alvo das substâncias nessas linhagens.

Para linhagem NB4, a similaridade foi de 61% para a proteína ROS1 também. Enquanto NB4-R2 não retornou estudos de similaridade.

Inibidores tirosinoquinases carregam consigo a oportunidade de terem vários alvos (como discutido no capítulo 2.5). De mesma maneira, a expressão de *NOX* parece afetar e ser afetada por diversas vias de sinalização, um exemplo é como o aumento induzido de ROS por Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pode estar relacionado às atividades de NOX2 e NOX4 em linhagens leucêmicas (HAKIM, 2010).

Intrigantemente, a expressão aumentada de *NOX1* e *NOX4* nas linhagens NB4 pareceu ser inversamente ativada em relação à expressão de *NOX2* e *p47phox* em NB4-R2. Esse achado aumenta a perspectiva de que substâncias que tem como alvo tirosinoquinases podem afetar diversos pontos do metabolismo e sinalização intracelular.

7. CONCLUSÕES

- A melhor atividade citotóxica (*in vitro*), de menor IC₅₀ e melhor índice de seletividade, das substâncias análogas ao alcaloide 3-alkilpiridínico frente a linhagens leucêmicas foram:
 - as substâncias 6 e 7 para linhagem de Leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α (NB4);
 - as substâncias 1 e 10 para linhagem de Leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α e resistente ao ATRA (NB4-R2) e;
 - As substâncias 1, 2, 3 e 4 para linhagem de Leucemia promielocítica aguda (HL-60 (ATCC® CCL-240™)).

- Houve um predomínio de morte celular por apoptose nas linhagens;

- Não há uma fase típica da interrupção do ciclo celular, mas todas mostraram efeitos citotóxicos;

- O desenho químico das substâncias parece apresentar seletividade de acordo com cada linhagem:
 - Hidroxilas terminais para linhagem de Leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α (NB4);
 - Grupo aldeído e anel tetraidropirano para linhagem de leucemia promielocítica aguda com PML-RAR α e resistente ao ATRA (NB4-R2);
 - Anel tetraidropirano para linhagem de Leucemia promielocítica aguda (HL-60 (ATCC® CCL-240™));

- O mecanismo para morte demonstra ser por meio da diminuição da antiapoptose e modificação no padrão de expressão de *NOX1*, *NOX2*, *NOX4* e *p47phox*;

- Há uma probabilidade de as substâncias selecionadas terem vários alvos celulares, dentre eles ROS1 e PARP1 que culminam em causar apoptose nas células.

Para sumarizar o efeito de cada molécula nos testes realizados neste trabalho, os dados foram compilados no **Quadro 2** abaixo.

Quadro 2- Resultados encontrados compilados por molécula e linhagem estudada

Teste	NB4		NB4-R2			HL60		
	6	7	1	10	1	2	3	4
Substâncias selecionadas								
Avaliação apoptose/necrose	54% apoptose 40% viáveis	64% apoptose 31% viáveis	43% apoptose 54% viáveis	34% apoptose 64% viáveis	27% apoptose 66% viáveis	29% apoptose 64% viáveis	27% apoptose 67% viáveis	30% apoptose 64% viáveis
Ciclo celular	G1 , S/G2M	G1 , G2M	G1 , S	G1 , S	G1	S/G2M	G1	S/G2M
Expressão genes da apoptose	+ <i>TP53</i> - <i>AKT</i>	+ <i>TP53</i> - <i>P21</i>	+ <i>TP53</i> - <i>P21</i> - <i>Bcl-2</i>	+ <i>TP53</i> + <i>BAK</i> - <i>AKT</i>	- <i>P21</i> - <i>AKT</i> - <i>Bcl-2</i>	+ <i>BAK</i>	- <i>AKT</i> - <i>Bcl-2</i>	+ <i>BAK</i>
Expressão genes do estresse oxidativo	+ <i>NOX 2</i> + <i>P47.phox</i>	+ <i>NOX 2</i> <i>P47.phox</i> - <i>NOX 1</i>	+ <i>NOX 1</i> + <i>NOX 4</i>	- <i>NOX 2</i>	- <i>sd</i>	- <i>sd</i>	- <i>sd</i>	- <i>sd</i>
Similaridade química	ROS1 e vias JAK/STAT, a via RAS/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR de sobrevivência celular; PARP1 diretamente relacionada à apoptose							

Dados finais do trabalho compilados por substância e por linhagem celular. Apoptose: percentual de células com morte por apoptose; Viáveis: percentual de células viáveis no ensaio; Ciclo celular em negrito demonstra predominância das células; (+): aumento da expressão; (-): diminuição da expressão; -sd: sem diferença significativa.

As substâncias 6 e 7 pareceram ser mais agressivas pelo percentual de apoptose, e interrupção predominantemente em G1 onde atua a p53, cuja expressão demonstrou bastante aumentada. A expressão de NOX 2 e P47-phox aumentado podem indicar indução à diferenciação para tentativa de sobrevivência celular por diferenciação. Efeito correlacionado dos prováveis alvos, em que mesmo tentando aumentar diferenciação para sobrevivência, as vias já estão modificadas para diminuir a sobrevivência celular e entrar em apoptose.

As substâncias 1 e 10 na linhagem NB4-R2 levaram à morte celular predominantemente por apoptose, e interrupção predominantemente em G1 onde atua a p53, cuja expressão demonstrou bastante aumentada. Os NOX 1 e 4 estão relacionados a aumentar os ROS para induzir à morte celular, resultados que se correlacionam à ubiquidade tirosinoquinase das moléculas preditas por similaridade química.

As substâncias 1 a 4 na linhagem HL60 aparentaram ter menos ação agressiva, por ter menor percentual de morte e maior de células viáveis, embora a morte fosse também predominantemente por apoptose. O aumento da expressão de BAK parece se correlacionar com a parada do ciclo celular em S/G2M. Isso pode se correlacionar com a falta de diferença significativa nos genes de estresse oxidativo, como se a hipótese aqui fosse de um direcionamento à morte menos enérgica e mais certa como ativar apoptose com atuação direta à mitocôndria, por exemplo. Situação também facilitada pelos prováveis alvos ubíquos previstos na similaridade química.

Conclui-se portanto que este trabalho conseguiu avaliar o potencial mecanismo de ação citotóxica das substâncias sintéticas, análogas ao alcaloide 3-alkilpiridínico nas células de linhagens leucêmicas humanas do tipo promielocítica aguda

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SAWAF, Othman *et al.* Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, v. 21, n. 9, p. 1188–1200, 2020.

ANKARCRONA, Maria *et al.* *Glutamate-Induced Neuronal Death: A Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Function.* *Neuron*. 1995.

ANTTILA, Jani V. *et al.* Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLoS Computational Biology*, v. 15, n. 11, p. 1–18, 2019.

AUBREY, Brandon J; STRASSER, Andreas; KELLY, Gemma L. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, p. 1–16, 2016.

AURELIUS, Johan *et al.* Monocytic AML cells inactivate antileukemic lymphocytes: Role of NADPH oxidase/gp91phox expression and the PARP-1/PAR pathway of apoptosis. *Blood*, v. 119, n. 24, p. 5832–5837, 14 jun. 2012.

BAGHERI-NESAMI, Masoumeh *et al.* Sleep quality and associated risk factors in leukemia patients undergoing chemotherapy in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 17, p. 107–111, 2016.

BALLOT, C. *et al.* ‘Essential role of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by the marine alkaloid Lamellarin D’, *Mol Cancer Ther*, 8(12), pp. 3307–3317. 2009.

BANJARA, Suresh *et al.* The Bcl-2 family: Ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms. *Biomolecules*, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2020.

BARBOSA, Maria Cristina S. *et al.* Synthesis and evaluation of the mutagenicity of 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues with anticancer potential. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 825, p. 31–39, 2018.

BART TUMMERS ; DOUGLAS R GREEN. Caspase-8; regulating life and death. *Immunol Rev.*, v. 277, n. 1, p. 76–89, 2017.

BATTAGLIA, Anna Martina *et al.* Ferroptosis and Cancer: Mitochondria Meet the “Iron Maiden” Cell Death. *Cells*, v. 9, n. 6, p. 1–26, 2020.

BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, v. 33, n. 4, p. 451–458, ago. 1976.

BLAGOSKLONNY, M. V. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia*, v. 14, n. 8, p. 1502–1508, 2000.

BORGNE, A. *et al.* Analysis of cyclin B1 and CDK activity during apoptosis induced by camptothecin treatment. *Oncogene*, v. 25, n. 56, p. 7361–7372, 2006.

BRANDÃO;, HUGO N.JUCENI P. DAVID*, Ricardo D. Couto e Jorge A. P. Nascimento. QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS DERIVADOS DE PLANTAS Hugo. *Quim. Nova*, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

C. DA SILVA, Grazielle. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 1, p. 77–84, 2006.

CARMICHAEL, J *et al.* Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer research*, v. 47, n. 4, p. 936–42, 15 fev. 1987.

CERETO-MASSAGUÉ, A. *et al.* Tools for in silico target fishing. *Methods*, v. 71, p. 98–103, 2015a.

CHEN, Chunhai *et al.* Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells. *Scientific Reports*, v. 4, n. 1, p. 5103, 29 maio 2014.

CHOU, Wen-Chien *et al.* Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. 2004.

DAKIK, Hassan *et al.* Characterization of NADPH oxidase expression and activity in acute myeloid leukemia cell lines: A correlation with the differentiation status. *Antioxidants*, v. 10, n. 3, 1 mar. 2021.

Dassonneville, L. *et al.* (2000) ‘Inhibition of topoisomerase II by the marine alkaloid ascididemin and induction of apoptosis in leukemia cells’, *Biochemical Pharmacology*, 60(4), pp. 527–537.

DE ALMEIDA, Tâmara Dauare; EVANGELISTA, Fernanda Cristina Gontijo; SABINO, Adriano de Paula. Acute Promyelocytic Leukemia (APL): A Review of the Classic and Emerging Target Therapies towards Molecular Heterogeneity. *Future Pharmacology*, v. 3, n. 1, p. 162–179, 1 fev. 2023.

DEMIRCAN, Muhammed Burak *et al.* Context-specific effects of NOX4 inactivation in acute myeloid leukemia (AML). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 148, n. 8, p. 1983–1990, 1 ago. 2022.

DENG, J. (2016) ‘How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers?’, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Elsevier, 7(1), pp. 18–26. 2016.

DEVITA, Vincent T.; CHU, Edward. *A history of cancer chemotherapy*. *Cancer Research*. 1 nov. 2008

DINARDO, Courtney D *et al.* Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 Inhibitor Ivosidenib in Combination With Azacitidine for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*, v. 39, p. 57–65, 2020.

DINARDO, Courtney D. *et al.* Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, v. 133, n. 1, p. 7–17, 3 jan. 2019.

DIXON, Scott J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 2012.

DOHNER, K.; DOHNER, H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, v. 93, n. 7, p. 976–982, 2008.

DYSHLOVOY, S. A. *et al.* (2017) ‘The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells’, *BMC Cancer*. *BMC Cancer*, 17(1), p. 93.

ERICHSEN, SANTIAGO, Elza *et al.* *Medicina laboratorial para o clínico*. 1. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2009. Acesso em: 11 set. 2015.

EVANGELISTA, Fernanda Cristina Gontijo *et al.* Synthetic 3-alkylpyridine alkaloid analogues as a new scaffold against leukemic cell lines: cytotoxic evaluation and mode of action. *Medicinal Chemistry Research*, v. 28, n. 9, p. 1567–1578, 2019.

EYTAN M, STEIN; *et al.* *Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib*. *Blood*. 2019.

F. LORENZI, Therezinha. *Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica* -. 4ª ed. GUANABARA KOOGAN, 2006.

FAILACE, Renato. *Hemograma - Manual de Interpretação*. 5ª ed. Porto Alegre. 2009.

FANG, Hong *et al.* Acute promyelocytic leukemia: Immunophenotype and differential diagnosis by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, v. 102, n. 4, p. 283–291, 18 jul. 2022.

FINK, Susan L.; COOKSON, Brad T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 2005.

FISCHER, Stefan *et al.* Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 162, n. 5, p. 1932–1939, 2000.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.

GBADAMOSI, Mohammed; MESHINCHI, Soheil; LAMBA, Jatinder K. Gemtuzumab ozogamicin for treatment of newly diagnosed CD33-positive acute myeloid leukemia. *Future Oncology*, v. 14, n. 30, p. 3199–3213, 2018.

GIANSANTI, Manuela *et al.* Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors for Arsenic Trioxide-Resistant Acute Promyelocytic Leukemia: Synergistic In Vitro Antitumor Effects with Hypomethylating Agents or High-Dose Vitamin C. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 377, n. 3, p. 385–397, 1 jun. 2021.

GONÇALVES, Alessandra Mirtes Marques Neves *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel 3-alkylpyridine marine alkaloid analogs with promising anticancer activity. *Marine Drugs*, v. 12, n. 8, p. 4361–4378, 2014a.

GREEN, Douglas R.; LLAMBI, Fabien. Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 12, p. 1–24, 2015.

GUPTA, Shruti *et al.* *Conventional Chemotherapy Nephrotoxicity. Advances in Chronic Kidney Disease*. W.B. Saunders. 1 set. 2021

GUPTA, Sumit *et al.* Treatment-related mortality in children with acute myeloid leukaemia in Central America: incidence, timing and predictors. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, v. 48, n. 9, p. 1363–9, jun. 2012.

HABLI, Z. *et al.* ‘Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms’, *Molecules*, 22(2), p. 250. 2017.

HAKIM. VEGF-induced ROS generation from NAD(P)H oxidases protects human leukemic cells from apoptosis. *International Journal of Oncology*, v. 36, n. 6, 21 abr. 2010.

HILÁRIO, Flaviane F. *et al.* *Synthesis and Evaluation of Antimalarial Activity of Oxygenated 3-alkylpyridine Marine Alkaloid Analogues. Chemical Biology and Drug Design*. set. 2011

HOLE, Paul S *et al.* Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood*, v. 122, p. 3322–3330, 2013a.

HOUSMAN, Genevieve *et al.* *Drug resistance in cancer: An overview. Cancers*. MDPI AG. , 5 set. 2014

HU, Jiong. Arsenic in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: current status and future research direction. *Frontiers of Medicine*, v. 5, n. 1, p. 45–52, 17 mar. 2011.

HUANG, Xianbo *et al.* Bypassing drug resistance by triggering necroptosis: Recent advances in mechanisms and its therapeutic exploitation in leukemia. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 37, n. 1, p. 1–15, 2018.

ILANGOVAN, A. *et al.* Synthesis, characterization and antimicrobial activity of 4-amino-1-alkyl pyridinium salts. *Medicinal Chemistry Research*, v. 6, n. 21, p. 694–702, jun. 2012.

INCA. *Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, RJ: Edição COORDENAÇÃO DE ENSINO Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Setor de Edição e Informação Técnico-Científica, 2017.

INCA - MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Leucemia Aguda - INCA*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344>. Acesso em: 11 set. 2015.

IRWIN, Mary E.; RIVERA-DEL VALLE, Nilsa; CHANDRA, Joya. *Redox control of leukemia: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants and Redox Signaling*. 10 abr. 2013

KERR, J. F. RWYLLIE. A. H. ; CURRIE, A. R.. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*, v. 26, p. 239–257, 1972.

Ferlay, J; *et al.* *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11*. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

JACKSON, Alan M *et al.* *Thrombotic Microangiopathy and Renal Failure Associated with Antineoplastic Chemotherapy*.1984. Disponível em: <<https://annals.org/>>.

JIANG, Mingxia *et al.* ALA/LA ameliorates glucose toxicity on HK-2 cells by attenuating oxidative stress and apoptosis through the ROS/p38/TGF- β 1 pathway. *Lipids in Health and Disease*, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.

JIMENEZ, Joaquin J. *et al.* Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. *Oncotarget*, v. 11, n. 11, p. 992, 3 mar. 2020.

JOHANSSON, Martin; PERSSON, Jenny. Cancer Therapy: Targeting Cell Cycle Regulators. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 7, p. 723–731, 2012.

JORDAN, Mary Ann ; WILSON, Leslie. MICROTUBULES AS A TARGET FOR ANTICANCER DRUGS. *NATURE REVIEWS | CANCER*, v. 4, p. 253–265, abr. 2004.

JOSHI, Sunil K *et al.* Discovery & Characterization of Therapeutically Targetable Ntrk Point Mutations in Leukemia. *Blood*, v. 134, n. Supplement_1, p. 1256–1256, 13 nov. 2019.

KENNEDY, Vanessa E.; SMITH, Catherine C. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Frontiers in Oncology*, v. 10, n. December, p. 1–20, 2020.

KHOURY, Joseph D. *et al.* *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia*. [S.l.]: Springer Nature. , 1 jul. 2022

KLIONSKY, Daniel J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.

KORNBLAU, Steven M. *et al.* Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*, v. 108, n. 7, p. 2358–2365, 2006.

KORSOS, Victoria; MILLER, Wilson H. *How retinoic acid and arsenic transformed acute promyelocytic leukemia therapy. Journal of Molecular Endocrinology*. [S.l.]: BioScientifica Ltd. 1 nov. 2022

KREIS, Nina Naomi; LOUWEN, Frank; YUAN, Juping. The multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in cell differentiation, migration and cancer therapy. *Cancers*, v. 11, n. 9, 1 set. 2019a.

- KROEMER, Guido; MARÍÑO, Guillermo; LEVINE, Beth. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, v. 40, n. 2, p. 280–293, 2010.
- KUCUKYURT, Selin; ESKAZAN, Ahmet Emre. *New drugs approved for acute myeloid leukaemia in 2018. British Journal of Clinical Pharmacology*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. 1 dez. 2019
- LABBE, Katherine. The Inflammasomes. *The Inflammasomes*. 2011. p. 17–36.
- LABELLA, Dominic *et al.* The role of adjuvant chemotherapy in the management of acute promyelocytic leukemia differentiation syndrome. *Frontiers in Oncology*, v. 12, 3 ago. 2022.
- LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. *Cell Death and Disease*, v. 6, n. 3, p. e1675-11, 2015.
- LI, Jun. Downregulation of ROS1 enhances the therapeutic efficacy of arsenic trioxide in acute myeloid leukemia cell lines. *Oncology Letters*, v. 15, n. 6, p. 9392–9396, 1 jun. 2018.
- LIAO, Ching *et al.* Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 12, p. 6853–6858, 2001.
- LIU, Hongtao. *Emerging agents and regimens for AML. Journal of Hematology and Oncology*.: BioMed Central Ltd. 1 dez. 2021
- LIU, Jian *et al.* Berberine Induces Autophagic Cell Death in Acute Lymphoblastic Leukemia by Inactivating AKT/mTORC1 Signaling. *Drug design, development and therapy*, v. 14, p. 1813–1823, 2020.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LOPES, Flávia C.M. *et al.* Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 9, 22 maio 2009.
- MA, Jun *et al.* Inhibition of Bcl-2 Synergistically Enhances the Antileukemic Activity of Midostaurin and Gilteritinib in Preclinical Models of FLT3-mutated Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, v. 25, n. 22, p. 6815–6826, 2019.
- MARALDI, Tullia *et al.* NAD(P)H oxidase isoform Nox2 plays a prosurvival role in human leukaemia cells. *Free Radical Research*, v. 43, n. 11, p. 1111–1121, 2009.
- MASGRAS, Ionica *et al.* The chaperone TRAP1 as a modulator of the mitochondrial adaptations in cancer cells. *Frontiers in Oncology*, v. 7, n. MAR, p. 1–10, 2017.
- MASON, Clinton C. *et al.* Identification of genetic targets in acute myeloid leukaemia for designing targeted therapy. *British Journal of Haematology*, v. 192, n. 1, p. 137–145, 1 jan. 2021.

MEHDIPOUR, Parinaz; SANTORO, Fabio; MINUCCI, Saverio. Epigenetic alterations in acute myeloid leukemias. *FEBS Journal*, v. 282, n. 9, p. 1786–1800, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia*. Elaboração, distribuição e informações: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DASILVA; (INCA). *Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, RJ. 2019. v. 7.

MITSUSHITA, Junji; DAVID LAMBETH, J; KAMATA, Tohru. *The Superoxide-Generating Oxidase Nox1 Is Functionally Required for Ras Oncogene Transformation*. *CANCER RESEARCH*.

MOOSAVI, Mohammad Amin; DJAVAHERI-MERGNY, Mojgan. Autophagy: New insights into mechanisms of action and resistance of treatment in acute promyelocytic leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 14, 2019a.

MS / INCA / COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA / DIVISÃO DE VIGILÂNCIA E ANÁLISE DE SITUAÇÃO, 2021. *Estimativa 2023 – Incidência de Câncer no Brasil*. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>>. Acesso em: 7 jan. 2023.

MURA, Marzena *et al.* Mathematical modelling reveals unexpected inheritance and variability patterns of cell cycle parameters in mammalian cells. *PLoS Computational Biology*, v. 15, n. 6, p. 1–26, 2019.

NITISS, John L. *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy*. *Nature Reviews Cancer*. maio 2009

NOGUERA, N. I. *et al.* Acute promyelocytic Leukemia: Update on the mechanisms of leukemogenesis, resistance and on innovative treatment strategies. *Cancers*, v. 11, n. 10, p. 1–21, 2019.

OTÁVIO, Paulo *et al.* *Síntese e avaliação da atividade citotóxica in vitro de análogos de alcalóides 3-alquilpiridínicos contendo o grupo tiossemicarbazona* *Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of 3-alkylpyridine alkaloids analogs linked to a thiosemicarbazone group*. 2015.

OYEKUNLE, Anthony *et al.* Molecular diagnostics, targeted therapy, and the indication for allogeneic stem cell transplantation in acute lymphoblastic leukemia. *Advances in hematology*, v. 2011, p. 154745, jan. 2011.

Palanisamy, S. K., Rajendran, N. M. and Marino, A. (2017) ‘Natural Products Diversity of Marine Ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and Successful Drugs in Clinical Development’, *Natural Products and Bioprospecting*. Springer Berlin Heidelberg, 7(1), pp. 1–111.

PALETTA-SILVA, Rafael; ROCCO-MACHADO, Nathália; MEYER-FERNANDES, José Roberto. *NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity*. *International Journal of Molecular Sciences*. fev. 2013

PARASCANDOLO, Alessia; LAUKKANEN, Mikko O. *Carcinogenesis and reactive oxygen species signaling: Interaction of the NADPH oxidase NOX1-5 and superoxide dismutase 1-3 signal transduction pathways. Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc. , 20 jan. 2019a

PARASCANDOLO, Alessia; LAUKKANEN, Mikko O. *Carcinogenesis and reactive oxygen species signaling: Interaction of the NADPH oxidase NOX1-5 and superoxide dismutase 1-3 signal transduction pathways. Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc. , 20 jan. 2019b

PARK, J G *et al.* Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer research*, v. 47, n. 22, p. 5875–9, 15 nov. 1987.

PERCIVAL, Mary-elizabeth *et al.* Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. *Blood*, v. 31, n. 4, p. 185–192, 2018.

PERAGOVICS, A. *et al.* Virtual Affinity Fingerprints for Target Fishing: A New Application of Drug Profile Matching. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 1, p.103-113, 2013.

PEREIRA, Juliana R.C.S. *et al.* Cytotoxicity evaluation of marine alkaloid analogues of viscosaline and theonelladin C. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 145–148, 2012.

PRADA-ARISMENDY, Jeanette; ARROYAVE, Johanna C.; RÖTHLISBERGER, Sarah. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, v. 31, n. 1, p. 63–76, 2017.

RABELLINO, Andrea; SCAGLIONI, Pier Paolo. *PML degradation: Multiple ways to eliminate PML. Frontiers in Oncology*. 2013

RAJESH, R. P. and Annappan, M. (2015) ‘Anticancer effects of brominated indole alkaloid eudistomin H from marine ascidian eudistoma viride against cervical cancer cells (HeLa)’, *Anticancer Research*, 35(1), pp. 283–294. doi: 35/1/283 .

REDDY, M. M. *et al.* NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. *Leukemia*, v. 25, n. 2, p. 281–289, 2011.

RIXE, Olivier; FOJO, Tito. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? *Clinical Cancer Research*, v. 13, n. 24, p. 7280–7287, 2007.

ROBOZ, Gail J *et al.* *Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia*. . [S.l: s.n.], 2020.

ROOS, Wynand P.; THOMAS, Adam D.; KAINA, Bernd. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, v. 16, n. 1, p. 20–33, 2016.

ROSENKRANZ, Vera; WINK, Michael. *Induction of Apoptosis by Alkaloids, Non-Protein Amino Acids, and Cardiac Glycosides in Human Promyelotic HL-60 Cells*. *Z. Naturforsch.* 2007. Disponível em: <<http://www.znaturforsch.com>>.

- RUBNITZ, Jeffrey E.; GIBSON, Brenda; SMITH, Franklin O. Acute Myeloid Leukemia. NCCN Guidelines. *NCCN Guidelines for Patients®: Acute Myeloid Leukemia, 2020*, v. 1, n. 1, p. 21–51, 2020.
- SANZ, Miguel A. *et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*, v. 133, n. 15, p. 1630–1643, 11 abr. 2019.
- SHARMA, Rajesh; JANI, Chinmay. Mapping incidence and mortality of leukemia and its subtypes in 21 world regions in last three decades and projections to 2030. *Annals of Hematology*, v. 101, n. 7, p. 1523–1534, 1 jul. 2022.
- SHI, Yueyue *et al.* Protective Effects of *Smilax glabra* Roxb. Against Lead-Induced Renal Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Weaning Rats and HEK-293 Cells. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, n. September, p. 1–15, 2020.
- SINGH, Ruman; Anthony Letai; Kristopher Sarosiek. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Definitions*, v. 20, n. 3, p. 175–193, 2019.
- STAHL, Maximilian; TALLMAN, Martin S. *Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia*. *British Journal of Haematology*. Blackwell Publishing Ltd. , 1 out. 2019a
- STAHL, Maximilian; TALLMAN, Martin S. Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, v. 187, n. 2, p. 157–162, 1 out. 2019b. Acesso em: 9 out. 2021.
- STANICKA, Joanna *et al.* NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide induces DNA damage in mutant FLT3-expressing leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 15, p. 9348–9361, 10 abr. 2015.
- SUGIMOTO, B. K. *et al.* ‘Frequent Mutations in the p53 Gene in Human Myeloid Leukemia Cell Lines’, pp. 2378–2383. 1991.
- SUGUMARAN, Manickam; ROBINSON, William E. Bioactive dehydrotyrosyl and dehydrodopyl compounds of marine origin. *Marine Drugs*, v. 8, n. 12, p. 2906–2935, 2010.
- SUZUKI, Yuki *et al.* (-)-Neocaryachine, an antiproliferative pavine alkaloid from *Cryptocarya laevigata*, induces DNA double-strand breaks. *Journal of Natural Products*, v. 80, n. 1, p. 220–224, 2017.
- TANG, Daolin *et al.* The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, v. 29, n. 5, p. 347–364, 2019.
- THOMAS, Xavier. *Acute Promyelocytic Leukemia: A History over 60 Years—From the Most Malignant to the most Curable Form of Acute Leukemia*. Springer Healthcare, 2019. v. 7.

TIAN, Fang *et al.* 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Sonodynamic Therapy Inhibits RIPK1/RIPK3-Dependent Necroptosis in THP-1-Derived Foam Cells. *Scientific Reports*, v. 6, n. January, p. 1–13, 2016.

TOMAŠIČ, T. *et al.* (2015) ‘Analogues of the marine alkaloids oroidin, clathrocin, and hymenidin induce apoptosis in human HepG2 and THP-1 cancer cells’, *Med. Chem. Commun.*, 6(1), pp. 105–110.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *FDA approves olutasidenib for relapsed or refractory acute myeloid leukemia with a susceptible IDH1 mutation*. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-olutasidenib-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-susceptible-idh1-mutation?utm_medium=email&utm_source=govdelivery>. Acesso em: 7 jan. 2023.

VADAKEKOLATHU, Jayakumar *et al.* Immune landscapes predict chemotherapy resistance and immunotherapy response in acute myeloid leukemia. *sci. transl. med.*, v. 12, n. 1301, 2020.

VIVAS-MEJÍA, Pablo E. *et al.* Downregulation of the c-MYC target gene, peroxiredoxin III, contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *International Journal of Cancer*, v. 125, n. 2, p. 264–275, 15 jul. 2009.

WANG, Jie *et al.* NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are responsible for the high susceptibility to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia Research*, v. 32, n. 3, p. 429–436, mar. 2008.

WANG, Ting-Yu *et al.* Acute myelomonocytic leukemia occurred after multiple myeloma treated: a case report. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition*, v. 38, n. 2, p. 347–9, mar. 2007.

WANG, Xiao Dong *et al.* Induction of apoptosis in human leukemia cells through an intrinsic pathway by cathachunine, a unique alkaloid isolated from *Catharanthus roseus*. *Phytomedicine*, v. 23, n. 6, p. 641–653, 1 jun. 2016.

WANG, X.-D. *et al.* (2016) ‘Induction of apoptosis in human leukemia cells through an intrinsic pathway by cathachunine, a unique alkaloid isolated from *Catharanthus roseus*’, *Phytomedicine*, 23(6), pp. 641–653. doi: 10.1016/j.phymed.2016.03.003.

WANG, Yan Yang; LIU, Xin Lan; ZHAO, Ren. Induction of pyroptosis and its implications in cancer management. *Frontiers in Oncology*, v. 9, n. SEP, p. 1–10, 2019.

WANG, Yijie; LUO, Weibo; WANG, Yingfei. *PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response*. *DNA Repair*. Elsevier B.V. 1 set. 2019

WATTS, Justin M.; TALLMAN, Martin S. *Acute promyelocytic leukemia: What is the new standard of care?* *Blood Reviews*. Churchill Livingstone. , 2014

WEINLICH, Ricardo *et al.* Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 18, n. 2, p. 127–136, 2017.

WU, Ying; DONG, Guoqiang; SHENG, Chunquan. Targeting necroptosis in anticancer therapy: mechanisms and modulators. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 10, n. 9, p. 1601–1618, 2020.

XIA, Xiaojing *et al.* The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”? *Cell Death and Disease*, v. 10, n. 9, 2019.

YAO, Hongxia *et al.* Spectrum of gene mutations identified by targeted next-generation sequencing in Chinese leukemia patients. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, v. 8, n. 9, 1 set. 2020.

ZHANG, Yingying *et al.* RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nature Communications*, v. 8, n. May 2016, p. 1–14, 2017.

ZYSK, G. *et al.* Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 122, n. 1, p. 61–66, 2000.

9. ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação *in vitro* de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfoides e mielodisplasia”

SUBPROJETO: Avaliação *in vitro* de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras humanas e linhagens celulares

Prezado (a) Senhor (a),

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo de interesse para o tratamento de cânceres. Se você quiser participar desse estudo como indivíduo controle, solicitamos que autorize a coleta de apenas 10 mL de seu sangue para realizarmos exames laboratoriais que incluirão dosagens de proteínas, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. O (a) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. Desde já agradeço sua colaboração.

Prof. Adriano de Paula Sabino (Coordenador do projeto, Professor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG)

Nome: _____

Documento de identificação: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 22 de abril de 2015, a emenda ao projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na LeucemiaLinfocítica Crônica(LLC)" com as alterações:

- o Inclusão de pacientes com Síndrome Mielodisplásica e Leucemias Mielóides e Linfóides;
- o Substituir o título corrente por: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mielóides, linfóides e mielodisplasia";
- o Substituir: "estudar in vitro o efeito de diferentes quimioterápicos" por estudar in vitro o efeito de biomoléculas, uma vez que quimioterápicos são usados para comparação de efeito de novas biomoléculas pelo grupo de estudo;
- o Alteração do tempo de execução do projeto, com extensão do prazo para 2020.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Teima Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG