

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DO POTENCIAL DO BITIONOL COMO FÁRMACO CAPAZ DE
ELIMINAR CÉLULAS-TRONCO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HUMANA**

INGRID RAYSSA SOUZA BALIZA DIAS

Salvador – Bahia

2023

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**ESTUDO DO POTENCIAL DO BITIONOL COMO FÁRMACO CAPAZ DE
ELIMINAR CÉLULAS-TRONCO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HUMANA**

INGRID RAYSSA SOUZA BALIZA DIAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Salvador - Bahia

2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

D541e Dias, Ingrid Rayssa Souza Baliza

Estudo do potencial do bitionol como fármaco capaz de eliminar células-tronco de leucemia mieloide aguda humana. / Ingrid Rayssa Souza Baliza Dias. _ Salvador, 2023.

112 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. Bitionol. 2. Leucemia mieloide aguda. 3. Células-tronco leucêmicas. 4. NF-Kb. 5. Apoptose. I. Título.

CDU 616.155.392

“ESTUDO DO POTENCIAL DO BITIONOL COMO FÁRMACO CAPAZ DE ELIMINAR CÉLULAS-TRONCO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HUMANA”.

INGRID RAYSSA SOUZA BALIZA DIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 30 de outubro 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA
Data: 31/10/2023 10:10:39-0900
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Professor Associado
UFPI

Documento assinado digitalmente
gov.br GARDENIA CARMEN GADELHA MILITAO
Data: 31/10/2023 09:58:23-0900
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militao
Professora Associada
UFPE

Documento assinado digitalmente
gov.br JULIANA PERRONE BEZERRA DE MENEZES FULL
Data: 31/10/2023 17:38:39-0900
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes
Pesquisadora em Saúde Pública
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB.

FIOCRUZ/IGM.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A meu marido, Cássio, pela presença, apoio, compreensão e suporte.

A meu filho, Davi, por quem eu procuro ser uma pessoa melhor todos os dias.

Aos meus pais, pela dedicação e presença constante, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Igor e Iana, pelo apoio, força e incentivo.

A meus avós (*in memoriam*) e a todos os meus familiares pelo incentivo.

Aos meus amigos pelo suporte e apoio.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pereira Bezerra, pela oportunidade e apoio incondicional na elaboração deste trabalho.

A Dr. Ken e Dra. Lauren por me receberem no Leukemia Team na Queen's University of Belfast.

À equipe do câncer, e em especial a equipe RASIM pela convivência, suporte e companheirismo para a realização desse trabalho.

À equipe do LETI, pela convivência diária e empatia.

Aos colegas da pós-graduação pelo companheirismo durante toda a jornada.

À banca de qualificação pelos conselhos, orientação e correção que levou ao aperfeiçoamento do trabalho.

Aos professores por compartilharem seus conhecimentos.

As secretárias acadêmicas por sempre estarem dispostas a ajudar.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em saúde e medicina investigativa.

À biblioteca pelo suporte concedido.

Ao IGM/FIOCRUZ Bahia e plataformas, pela estrutura e suporte necessários para a execução deste trabalho e pela bolsa concedida.

Meu agradecimento ao CNPq e a FAPESB, órgãos financiadores deste projeto.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

O meu muito obrigada.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

DIAS, Ingrid Rayssa Souza Baliza. **Estudo do potencial do bitionol como fármaco capaz de eliminar células-tronco de leucemia mieloide aguda humana**. 2023. 112f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As leucemias estão entre os cânceres mais frequentes do mundo e a leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia letal da medula óssea causada por alterações genéticas nos progenitores das células sanguíneas. As células-tronco leucêmicas (CTLs) são responsáveis pelo desenvolvimento de LMA, resistência a medicamentos e recaídas. Adicionalmente, verificou-se que o NF- κ B é constitutivamente ativado em CTLs de LMA humanas, enquanto as células-tronco hematopoiéticas normais não expressam NF- κ B. O bitionol (BT), um inibidor de NF- κ B, é um medicamento anti-helmíntico aprovado pela FDA com potenciais propriedades antibacterianas, antivirais e antitumorais. **OBJETIVO:** Neste trabalho, focamos nas propriedades do BT em eliminar CTLs de LMA em modelo translacional *in vitro e in vivo*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para isso, BT foi testado em um painel de células cancerosas de tumores sólidos e hematológicos e não cancerosas para avaliar sua citotoxicidade. Também foi avaliado a capacidade de BT de eliminar CTLs utilizando anticorpos para CD13, CD33, CD34, CD38 e CD123. Ensaios para investigar o mecanismo de ação do composto foram realizados, incluindo ensaio de exclusão por azul de tripan, análise do padrão de morte celular, expressão de caspase-3 e PARP-1, despolarização mitocondrial, estresse oxidativo, indução de morte por ferroptose, avaliação do ciclo celular, capacidade de inibir a via NF- κ B, regulação de diversos genes e ensaio *in vivo* utilizando camundongos NSG. Além disso, foi avaliada a combinação do BT com o venetoclax (VTX) e sua citotoxicidade. **RESULTADOS:** Este composto pode inibir a viabilidade celular de células cancerígenas de tumores sólidos e hematológicos e suprimir células progenitoras/tronco CD34+ de LMA. BT induziu a externalização de fosfatidilserina, perda do potencial mitocondrial transmembranar, ativação de caspase-3 e clivagem de PARP-1, fragmentação de DNA, condensação nuclear e encolhimento celular em células de LMA tratadas com BT, indicando indução de apoptose. Além disso, este composto aumentou os níveis de superóxido mitocondrial e a citotoxicidade induzida por BT foi parcialmente prevenida pelo co-tratamento com o inibidor de ferroptose ferrostatina-1. BT reduziu significativamente a expressão de NF- κ B p65 (pS529) e NF- κ B p65 (pS536) e a translocação nuclear de NF- κ B p65 em células de LMA, indicando que esta molécula pode suprimir a sinalização de NF- κ B. BT também foi capaz de inibir o desenvolvimento de LMA em camundongos NSG em uma dosagem de 50 mg/kg com toxicidade sistêmica tolerada. Além disso, BT sinergizou com VTX em células de LMA, indicando o potencial do BT para aumentar os efeitos de VTX em pacientes com LMA. **CONCLUSÃO:** Juntos, esses dados indicam que o BT exibe importantes efeitos anti-LMA e é um potencial novo medicamento anti-LMA.

Palavras-chave: Bitionol. Leucemia mieloide aguda. Células-tronco leucêmicas. NF- κ B. Apoptose. Ferroptose e estresse oxidativo.

DIAS, Ingrid Rayssa Souza Baliza. **Study of the potential of bithionol as a drug capable of eliminating human acute myeloid leukemia stem cells**. 2023. 112f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leukemias are among the most common cancers in the world and acute myeloid leukemia (AML) is a lethal bone marrow neoplasm caused by genetic alterations in the progenitors of blood cells. Leukemic stem cells (LSCs) are responsible for the development of AML, drug resistance and relapse. Additionally, NF- κ B was found to be constitutively activated in human AML LSCs, whereas normal hematopoietic stem cells do not express NF- κ B. Bithionol (BT), an NF- κ B inhibitor, is an FDA-approved anthelmintic drug with potential antibacterial, antiviral, and antitumor properties. **OBJECTIVE:** In this work, we focus on the properties of BT in eliminating AML LSCs in in vitro and in vivo translational models. **MATERIAL AND METHODS:** For this, BT was tested on a panel of solid and hematological and non-cancerous cancer cells to assess its cytotoxicity. The ability of BT to eliminate LSCs using antibodies to CD13, CD33, CD34, CD38 and CD123 was also evaluated. Assays to investigate the mechanism of action of the compound were performed, including trypan blue exclusion assay, analysis of cell death pattern, caspase-3 and PARP-1 expression, mitochondrial depolarization, oxidative stress, induction of death by ferroptosis, evaluation of the cell cycle, ability to inhibit the NF- κ B pathway, regulation of several genes and in vivo assay using NSG mice. In addition, the combination of BT with venetoclax (VTX) and its cytotoxicity were evaluated. **RESULTS:** This compound can inhibit cell viability of solid and hematologic cancer cells and suppress AML CD34+ progenitor/stem cells. BT induced phosphatidylserine externalization, loss of mitochondrial transmembrane potential, caspase-3 activation and PARP-1 cleavage, DNA fragmentation, nuclear condensation, and cell shrinkage in BT-treated AML cells, indicating induction of apoptosis. Furthermore, this compound increased mitochondrial superoxide levels and BT-induced cytotoxicity was partially prevented by co-treatment with the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1. BT significantly reduced NF- κ B p65 (pS529) and NF- κ B p65 (pS536) expression and NF- κ B p65 nuclear translocation in AML cells, indicating that this molecule can suppress NF- κ B signaling. BT was also able to inhibit the development of AML in NSG mice at a dosage of 50 mg/kg with tolerated systemic toxicity. Furthermore, BT synergized with VTX in AML cells, indicating the potential of BT to enhance the effects of VTX in AML patients. **CONCLUSION:** Together, these data indicate that BT exhibits important anti-AML effects and is a potential new anti-AML drug.

Keywords: Bithionol. Acute myeloid leukemia. Leukemic stem cells. NF- κ B. Apoptosis. Ferroptosis and oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação da LMA segundo a OMS – 5ª edição (Khoury et al., 2022).	24
Figura 2	Hematopoiese	32
Figura 3	Via de sinalização NF- κ B	34
Figura 4	Estrutura química do BT	38
Figura 5	Efeito do BT sobre a viabilidade de células KG-1a determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam após 12h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) de incubação	58
Figura 6	Efeito do BT sobre a viabilidade de células-tronco leucêmicas em células KG-1a após 48h de tratamento determinada por citometria de fluxo	59
Figura 7	Efeito do BT sobre a morte de células KG-1a realizado por YO-PRO + IP após (A) 12h, (B) 24h, (C) 48h e (D) 72h de incubação	60
Figura 8	Dotplots representativos da marcação com YO-PRO + IP nos diferentes tempos testados	63
Figura 9	Efeito do BT sobre a morte das células (A) KG-1, (B) KG-1a, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 realizado por Anexina V + IP após 72h de incubação	64
Figura 10	Ativação de caspase-3 e clivagem de PARP-1 após o tratamento de células KG-1a com BT 10 μ g/mL. (A) Caspase-3 ativa e (B) PARP-1 clivada determinados por citometria de fluxo após 24 horas de incubação	65
Figura 11	Western blot de PARP clivado após o tratamento de células KG-1a, KG-1, Kasumi-1 e HL-60 com BT 10 μ g/mL após 72 h de tratamento	65
Figura 12	Efeito do BT na despolarização da membrana mitocondrial após 24h de tratamento determinada por citometria de fluxo	66
Figura 13	Efeito do BT na (A) sobrevivência de células WT-MEF e BAD-MEF pelo método alamar blue após 72h de incubação e sobre a (B) morte de células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF realizados por Anexina V/IP após 48h de incubação	67
Figura 14	Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP nas células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF após o tratamento com BT.	67

- Figura 15** Efeito do BT nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) das células KG-1a após 1 e 24 h de incubação determinada por citometria de fluxo. A-B. Quantificação do ERO com o uso da coloração MitoSOXTM (RED) 68
- Figura 16** Efeito do inibidor seletivo da ferroptose ferrostatina-1 na morte celular induzida por bitionol em células KG-1a após 72h de tratamento determinada por citometria de fluxo 69
- Figura 17** Expressão de NF- κ B em células KG-1a após o tratamento com BT por 24h. Expressão de NF- κ B (A) pS529 e (B) pS536 determinada por citometria de fluxo. (C) Imagens de western blot 72
- Figura 18** Western blot de fosfo-IKK α/β (Ser176/180), IKK α , IKK β , NF- κ B p65, fosfo-NF- κ B p65 (Ser536), fosfo-I κ B α (Ser32) e I κ B α de células KG-1a, KG-1, Kasumi-1 e HL-60 após 72 h de tratamento com BT. 72
- Figura 19** Microscopia Confocal de células KG-1a marcadas com anticorpo anti-NF- κ B p65 PE (vermelho) e DAPI (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific) (azul) após 24 h de tratamento 73
- Figura 20** Análise de qPCR para vários genes em células KG-1a após 12 h de tratamento com BT 10 μ g/mL 74
- Figura 21** Efeito in vivo do BT sobre células KG-1a inoculadas em camundongos NSG. 75
- Figura 22** Fotomicrografias representativas de rins, pulmões e fígados de camundongos NSG transplantados com células de LMA (KG-1a) tratados com 50 mg/kg de BT 78
- Figura 23** Ensaio de combinação dos compostos realizado em células (A) KG-1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 após 72 h de incubação do BT (10 μ g/mL) com 48 compostos (2 nM) de diferentes classes farmacológicas 79
- Figura 24** Ensaio de combinação dos compostos realizado em células (A) KG-1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 após 72 h de incubação do BT (10 μ g/mL) com 14 compostos (2 nM) selecionados 81
- Figura 25** Gráfico do índice de combinação (IC) da combinação entre BT e VTX em células (A) KG-1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 após 72 h de 84

incubação

Figura 26 Efeito da combinação do BT com VTX sobre a morte das células (A) KG- 85 1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 realizado por Anexina V + IP após 72h de incubação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de risco da ELN 2022	26
Tabela 2	Medicamentos e/ou combinações recentemente aprovados pelo FDA para LMA	29
Tabela 3	Lista das linhagens celulares utilizadas	41
Tabela 4	Lista dos anticorpos utilizados no Western Blot	49
Tabela 5	Atividade citotóxica do BT em diferentes tipos histológicos	55
Tabela 6	Distribuição do conteúdo de DNA em células KG-1a tratadas com BT	70
Tabela 7	Efeito do BT no peso e sobrevivência dos camundongos NSG inoculados com células KG1a	76
Tabela 8	Efeito do BT no peso dos órgãos dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ANOVA	Do Inglês <i>analysis of variance</i> (Análise de variância)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATX	Autotoxina
BAD	Antagonista de morte celular Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
BT	Bitionol
CI₅₀	Concentração inibitória média de 50%
CO₂	Dióxido de Carbono
CSCs	<i>Cancer stem cells</i>
CTH	Células tronco hematopoiéticas
CTL	Controle
CTLs	Células-tronco leucêmicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DRM	Doença residual mínima
ELN	European Leukemia Network
E.P.M.	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT3-ITD	Tirosina quinase 3 Semelhante a fms/ duplicação em tandem interna
HMA	Agentes hipometilantes
GO	Gemtuzumab ozogamicina
IC	Índice de Combinação
IκB	Inibidor do fator nuclear kappa B

IKK	Complexo IKK
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de Propídio
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
mg	Miligramas
mL	Mililitro
N.d.	Não determinado
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NIK	Quinase indutora de NF- κ B
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano, do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	Reação em cadeia polimerase
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture</i>
UV	Ultravioleta
VTX	Venetoclax
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Leucemia	20
2.1.1	Leucemia Mieloide Aguda	23
2.2	Células-tronco Leucêmicas	30
2.3	NF-κB	33
2.4	Bitionol	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Obtenção do composto	40
4.2	Obtenção e tratamento das células	40
4.3	Avaliação da citotoxicidade	43
4.4	Avaliação da viabilidade celular	44
4.5	Ensaio de identificação de células-tronco leucêmicas e quantificação de sua viabilidade	44
4.6	Avaliação in vitro do padrão de morte celular apoptótica	45
4.7	Análise da atividade de caspase-3 e PARP-1	45
4.8	Análise do potencial transmembrânico mitocondrial	46
4.9	Quantificação das espécies reativas de oxigênio intracelular	47
4.10	Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA	47
4.11	Análise da expressão de NF-κB p65 (pS529 e pS536)	48
4.12	Western Blot	48
4.13	Microscopia confocal	50
4.14	Análise da expressão gênica por qPCR	50
4.15	Ensaio <i>in vivo</i>	51
4.15.1	Ensaio de xenotransplante com camundongos imunodeficientes	51
4.15.2	Avaliação toxicológica sistêmica	51
4.16	Combinação	52
4.16.1	Triagem dos compostos	52

4.16.2	Índice de combinação (IC)	53
4.16.3	Avaliação <i>in vitro</i> do padrão de morte celular apoptótica das combinações	53
4.17	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	BT apresenta citotoxicidade frente diversas linhagens celulares	55
5.2	BT é capaz de eliminar células-tronco leucêmicas de LMA	58
5.3	BT induz a morte celular apoptótica mediada por caspases em células KG-1a	60
5.4	BT induz estresse oxidativo em células KG-1a	68
5.5	BT causa fragmentação do DNA em células KG-1a	69
5.6	BT inibe a via NF-κB nas células KG-1a	71
5.7	BT afeta a regulação de diversos genes	73
5.8	BT inibi o desenvolvimento <i>in vivo</i> de células KG-1a	74
5.9	A combinação de BT com VTX inibe sinergicamente o crescimento de células KG-1a	78
6	DISCUSSÃO	86
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE	105

1 INTRODUÇÃO

A leucemia é um câncer que começa na medula óssea, atingindo os glóbulos brancos sanguíneos (leucócitos) resultando em grande quantidade de glóbulos brancos anormais (National Cancer Institute, 2014). Ela possui quatro principais classificações baseadas no tipo de glóbulo branco que ela afeta (mieloide ou linfoide) e na taxa de crescimento (aguda ou crônica): leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (American Cancer Society, 2020).

A LMA é uma doença da medula óssea, um distúrbio das células-tronco hematopoéticas devido a alterações genéticas nos precursores das células sanguíneas, resultando na superprodução de células-tronco mieloides clonais neoplásicas, juntamente com a hematopoiese normal prejudicada (Pelcovits; Niroula, 2013).

Entre as causas desse tipo de leucemia estão a quimioterapia anterior ou certas exposições químicas, mas a grande maioria se deve a alterações genéticas, por meio de anormalidades cromossômicas ou mutações genéticas isoladas, sem agentes causadores claros. Delinear essas anormalidades genéticas é importante para estratificar o risco nos pacientes e determinar o tratamento adequado (Grimwade; Ivey, 2016).

O tratamento tem como objetivo destruir as células leucêmicas para que a medula óssea volte a produzir células normais. O tratamento envolve quimioterapia, controle das complicações infecciosas e hemorrágicas e prevenção ou combate da doença no sistema nervoso central, sendo necessário fazer transplante de medula óssea em alguns casos (INCA, 2017).

As células-tronco leucêmicas (CTLs) são responsáveis pela iniciação, crescimento descontrolado, resistência a fármacos e recaída das leucemias (Gilliland *et al.*, 2004; Jordan, 2007). A alta taxa de recaída de pacientes com LMA sugere que as terapias atuais poupam as CTLs e mesmo um pequeno número de CTLs que sobrevive à quimioterapia inicial pode se expandir rapidamente após o término do ciclo de tratamento ou permanecer inativo e levar à recaída tempo depois do término da terapia (Damiani *et al.*, 2015; Stiehl *et al.*, 2015).

Muitas vias de sinalização celular importantes estão envolvidas nas propriedades de sobrevivência, proliferação e autorrenovação das CTLs, entre elas encontra-se a via NF- κ B

que é constitutivamente ativada nessas células, enquanto as células progenitoras CD34+ humanas normais não expressam essa via (Guzman *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2021). A inibição da via NF- κ B é relatada como um alvo para mediar a morte de CTLs de LMA. Recentemente, pesquisadores do NIH Chemical Genomics Center (EUA), identificaram 19 fármacos que inibiram a sinalização de NF- κ B, incluindo bitionol (BT) (Miller *et al.*, 2010).

Bitionol é um fármaco antiparasitário clinicamente aprovado e apresenta ação citotóxica contra o câncer de ovário (Ayyagari *et al.*, 2016). Neste trabalho pretendemos avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* do bitionol como fármaco capaz de eliminar CTLs de LMA, inibindo a via NF- κ B.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leucemia

A leucemia é uma doença que atinge as células do sangue (glóbulos brancos) cuja principal característica é o acúmulo de células malignas na medula óssea substituindo as células sanguíneas normais. A leucemia ocorre mais frequentemente em adultos com mais de 55 anos, mas também é o câncer mais comum em crianças menores de 15 anos (INCA, 2019).

Em 2020, a Globocan estimou 474.519 novos casos de leucemia e 311.594 mortes em todo o mundo, ocupando a posição de 15º lugar de incidência e 11º lugar de óbito entre todos os cânceres (Sung *et al.*, 2021). Já para o Brasil, o número esperado de novos casos de leucemia para cada ano do triênio 2023-2025 será de 11.540 casos, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres. Em relação à mortalidade por leucemia no Brasil, em 2020 ocorreram 6.738 óbitos, sendo 3.703 óbitos nos homens e 3.035 nas mulheres (INCA, 2022).

A leucemia é um câncer da medula óssea e do sangue, classificado em mais de 12 tipos, sendo os quatro principais com base no tipo de glóbulo branco que ela afeta (mieloide ou linfoide) e na taxa de crescimento (aguda ou crônica): leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC). A LLC é reconhecida atualmente como o mesmo câncer do linfoma linfocítico de pequenas células (LLPC), e esses cânceres são coletivamente referidos como LLC/LL. Entre os adultos com 20 anos de idade ou mais, os tipos mais comuns de leucemia são LLC (37%) e LMA (32%), enquanto em crianças e adolescentes, com idades entre 0 a 19 anos, LLA é mais comum, sendo responsável por 74% dos casos (American Cancer Society, 2020).

As leucemias crônicas não são imediatamente fatais e são classificadas por uma superprodução clonal de glóbulos brancos maduros (leucócitos). A LLC é uma doença monoclonal indolor associada ao acúmulo progressivo de linfócitos B maduros funcionalmente incompetentes. É a forma mais comum de leucemia em adultos nos países ocidentais. Sua incidência aumenta com a idade e a maioria de pacientes possuem mais de 50 anos no momento do diagnóstico. Ocorre duas vezes mais em homens do que em mulheres e é mais comum na população caucasiana. É uma das poucas leucemias que não apresenta

associação à exposição anterior a radiação ionizante, produtos químicos ou fármacos, e é a única leucemia em que nenhuma evidência sólida foi encontrada para correlacionar a explosões de bomba atômica. Aproximadamente 20% dos indivíduos com esse tipo de leucemia têm parentes com LLC ou outro câncer linfóide, embora nenhuma ligação genética tenha sido identificada (Desai; Pinilla-Ibarz, 2012; Greenberg, 2013).

A LMC é um câncer causado por células mielóides transformadas e sem restrição de crescimento responsável por aproximadamente 15% de todas as leucemias adultas. Os pacientes diagnosticados com esse tipo de leucemia possuem em média a idade de 64 anos, com uma leve predominância do sexo masculino. O cromossomo Filadélfia (Ph) é exclusivo da LMC, ele consiste em uma translocação recíproca entre o gene ABL encontrado no cromossomo 9 e o gene BCR do cromossomo 22, ocorrendo uma fusão que resulta no gene BCR-ABL que codifica a oncoproteína híbrida BCR-ABL com atividade aumentada de tirosina quinase. Esse aumento da atividade de tirosina quinase desencadeia a ativação de várias vias, dando origem à expansão clonal das células da LMC e supressão da apoptose, o que leva as células malignas se acumularem e produzirem as características da LMC (Greenberg, 2013; Mughal *et al.*, 2016).

As leucemias agudas estão relacionadas a células progenitoras. A LLA é um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas caracterizadas por diferenciação e proliferação prejudicadas de células linfóides imaturas na medula óssea, sangue periférico e locais extramedulares. Embora seja considerada uma leucemia pediátrica, pois ocorre em pacientes com idade entre 0 a 19 anos, ela também ocorre em adultos por volta dos 50 anos (Paul *et al.*, 2016). O tratamento na infância apresenta melhor resultado, com taxas de sobrevida global de 5 anos que se aproximam a 90%, já a população adulta está associada a uma sobrevida mais baixa, em que 30 a 40% dos pacientes alcançarão remissão a longo prazo (Rowe, 2010; Hunger *et al.*, 2012; Jabbour *et al.*, 2015).

A LMA é caracterizada pelo crescimento descontrolado e exagerado de células indiferenciadas, chamadas blastos, com características mielóides. Não existe uma causa óbvia para a maioria dos casos desta forma, porém, em alguns pacientes, pode estar relacionada à exposição a alguns produtos químicos ou radiação ionizante, e até mesmo à presença de algumas anormalidades genéticas. É a forma mais comum de leucemia aguda em adultos, com mediana de idade ao diagnóstico de 68 anos (Hamerschlak, 2008; Shimony *et al.*, 2023).

Os fatores de risco para leucemia ainda não estão bem estabelecidos, mas existe a suspeita de associação entre determinados fatores de risco com uma maior chance de desenvolver alguns tipos específicos da doença. O risco da maioria dos tipos de leucemia aumenta entre os indivíduos expostos à radiação ionizante (raios-X e gama) de alto nível, mais comumente devido ao tratamento do câncer. Certos tipos de quimioterapia também aumentam o risco de alguns tipos de leucemia, como LMA e LLA. Além disso, o risco aumenta em pessoas com certas anormalidades genéticas, como síndrome de Down e outras doenças hereditárias (LMA); síndrome mielodisplásica e outras desordens sanguíneas (LMA) e histórico familiar (LMA e LLC). O risco também aumenta em trabalhadores expostos a alguns produtos químicos, como o benzeno, por exemplo, durante o refino de petróleo (LMA, LMC e LLA). A exposição ocupacional ao formaldeído em indústrias (química, têxtil, entre outras), produção de borracha, exposição a agrotóxicos e solventes, além de infecção por vírus das hepatites B e C e excesso de peso corporal, também aumentam o risco de desenvolver alguns tipos de leucemias. O tabagismo é um fator de risco para LMA em adultos, e há evidências acumuladas de que o tabagismo dos pais antes e depois do parto pode aumentar o risco de leucemia aguda em crianças (American Cancer Society, 2020; INCA, 2021).

Em alguns subtipos agudos podem surgir alguns sintomas, como fadiga, falta de ar, palidez, dor de cabeça, perda de peso, diminuição da imunidade, infecções repetidas, febre ou suores noturnos, sangramento ou hematomas com facilidade, dores nos ossos ou nas articulações e inchaço nos gânglios linfáticos ou abdômen (provocado pelo inchaço do baço ou fígado). A leucemia crônica geralmente progride lentamente com poucos sintomas durante os estágios iniciais (American Cancer Society, 2020; INCA, 2021)

Para o diagnóstico, o paciente deve realizar exames de sangue, como o hemograma, que apresentará resultado alterado (aumento ou diminuição do número de leucócitos), associado ou não à diminuição das hemácias e plaquetas. Também podem ser feitas análises laboratoriais, como exames de bioquímica e da coagulação. A confirmação diagnóstica é feita com o exame da medula óssea, mielograma, onde ocorre análise citológica, citogenética, molecular e imunofenotípica (INCA, 2021).

O tratamento da maioria das leucemias agudas é feito com quimioterapia algumas vezes associada a medicamentos direcionados, controle das complicações infecciosas e

hemorrágicas e para alguns casos, transplante da medula óssea. No tratamento da LMC são utilizados vários medicamentos direcionados, inibidores da tirosina quinase, os quais têm a capacidade de inibir a multiplicação das células cancerosas, sem afetar as células normais. Alguns desses medicamentos também são usados para tratar um tipo de LLA que envolve um defeito genético semelhante. Os novos tratamentos experimentais que tem por objetivo o aumento do sistema imunológico do corpo, como a terapia com células CAR T, têm se mostrado muito promissores, mesmo contra algumas leucemias difíceis de tratar (American Cancer Society, 2020; INCA 2021).

A sobrevida varia de acordo com a idade e o subtipo de leucemia. A atual taxa de sobrevida relativa de 5 anos para adultos com 20 anos ou mais é de 25% para LMA, 37% para LLA, 69% para LMC, e 85% para LLC, já para pacientes com idades entre 0-19 anos, é de 67% para LMA e 89% para LLA, enquanto é inferior a 10% em pacientes com LMA com mais de 60 anos. Os avanços no tratamento resultaram em grandes melhorias na sobrevida para a maioria dos tipos de leucemia, porém para a LMA o prognóstico ainda é baixo (American Cancer Society, 2020; Shimony *et al.*, 2023).

2.1.1 Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) representa um distúrbio clonal heterogêneo e maligno do sistema hematopoiético, caracterizado por proliferação descontrolada, falta de diferenciação de células blásticas imaturas anormais, além de produção prejudicada de células sanguíneas normais (Saif *et al.*, 2018).

A classificação da LMA foi atualizada em 2022 pela OMS na 5ª edição revisada, a partir de parâmetros clínicos, moleculares/genéticos e patológicos, além da ênfase no julgamento clínico-patológico. A classificação é dividida em duas principais famílias: LMA com anormalidades genéticas definidas e LMA definida por diferenciação (Figura 1). Na LMA com anormalidades genéticas definidas, encontram-se: LMA com fusão PML::RARA, LMA com fusão RUNX1::RUNX1T1, LMA com fusão CBFβ::MYH11, LMA com fusão DEK::NUP214, LMA com fusão RBM15::MRTFA, LMA com fusão BCR::ABL1, LMA com rearranjo KMT2A, LMA com rearranjo MECOM, LMA com rearranjo NUP98, LMA com mutação NPM1, LMA com mutação CEBPA, LMA relacionada à mielodisplasia e LMA

com outras alterações genéticas definidas. Enquanto a LMA definida por diferenciação é subdividida em: Leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima, Leucemia mieloide aguda sem maturação, Leucemia mieloide aguda com maturação, Leucemia basofílica aguda, Leucemia mielomonocítica aguda, Leucemia monocítica aguda, Leucemia eritroide aguda e Leucemia megacarioblástica aguda (Khoury *et al.*, 2022).

LMA com anormalidades genéticas definidas	LMA definida por diferenciação
<ul style="list-style-type: none"> •LPA com fusão PML::RARA •LMA com fusão RUNX1::RUNX1T1 •LMA com fusão CBFβ::MYH11 •LMA com fusão DEK::NUP214 •LMA com fusão RBM15::MRTFA •LMA com fusão BCR::ABL1 •LMA com rearranjo KMT2A •LMA com rearranjo MECOM •LMA com rearranjo NUP98 •LMA com mutação NPM1 •LMA com mutação CEBPA •LMA relacionada à mielodisplasia •LMA com outras alterações genéticas definidas 	<ul style="list-style-type: none"> •Leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima •Leucemia mieloide aguda sem maturação •Leucemia mieloide aguda com maturação •Leucemia basofílica aguda •Leucemia mielomonocítica aguda •Leucemia monocítica aguda •Leucemia eritroide aguda •Leucemia megacarioblástica aguda

Figura 1 - Classificação da LMA segundo a OMS

Fonte: Khoury *et al.*, 2022.

Um novo sistema de classificação para a LMA, também publicado em 2022, foi feito pela Classificação de Consenso Internacional (CCI) de neoplasias mielóides e leucemias agudas. A classificação é baseada em uma ordem hierárquica: LMA com anormalidades genéticas recorrentes, LMA com mutação em TP53, LMA com mutações genéticas relacionadas à mielodisplasia, LMA com anormalidades citogenéticas relacionadas à mielodisplasia e LMA não especificada. Esses dois novos sistemas de classificação desafiam a comunicação entre profissionais de saúde, especialmente patologistas, clínicos e pacientes. No entanto, continuará a ser responsabilidade do clínico integrar todos os dados para chegar a uma decisão terapêutica (Shimony *et al.*, 2023).

Curiosamente, algumas vias de sinalização podem diferir entre diferentes subgrupos genéticos de LMA (Schumich *et al.*, 2019). Recentemente, o estudo sobre o papel da disfunção epigenética na patogênese da LMA tem aumentado, o que contribui com o entendimento e tratamento dessa doença. Embora de natureza heterogênea, as mutações em genes que codificam reguladores epigenéticos, os quais afetam o metabolismo celular, são

uma ocorrência comum na LMA. Entretanto, existe uma necessidade de mais estudos com a finalidade de melhorar nosso conhecimento sobre as mutações mais raras e as características dos pacientes com certas mutações co-ocorrentes (Saif *et al.*, 2018).

Alguns estudos mostram que a identificação desses genes, como a tirosina quinase do tipo Fms3 (FLT3) e nucleofosmina 1 (NPM1), juntamente com o diagnóstico clássico do cariótipo melhorou o prognóstico da estratificação de risco (Cortes *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2012; Saygin e Carraway, 2017). Além disso, as mutações que afetam o metabolismo celular, como isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2), desmetilase específica de lisina 1 (LSD1) e o fator nuclear kappa-light-chain-enhancer de células B ativadas (NF-κB) são alvos para novos medicamentos terapêuticos (Hassane *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013; Fiskus *et al.*, 2014; Okoye-Okafor *et al.*, 2015). Pacientes com mutações em DNMT3A (DNA (citosina-5)-metiltransferase 3A) e NPM1 demonstraram melhores resultados em resposta à quimioterapia de indução com alta dose (Patel *et al.*, 2012). Assim, as mutações genéticas nas células de LMA permite que o paciente tenha um melhor ou pior prognóstico. A Rede Europeia de Leucemia (*European LeukemiaNet - ELN*) atualizou a classificação de risco de 2017, como podemos observar na tabela 1. Essa nova classificação integra o conhecimento de novas descobertas moleculares e resultados de ensaios recentes, além da avaliação da resposta ao tratamento, como a negatividade da doença residual mínima (DRM). No entanto, essa classificação está baseada em pacientes tratados intensivamente, de modo que ajustes futuros podem ser necessários para pacientes que são tratados com terapias menos intensivas, incluindo regimes à base de venetoclax (Shimony *et al.*, 2023).

Tabela 1 - Classificação de risco da ELN 2022

Categoria de risco	Anormalidade genética
Favorável	t (8;21) (q22; q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1α</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16; 16)(p13.1; q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> <i>NPM1</i> mutante sem <i>FLT3-ITD</i> bZIP mutante in-frame <i>CEBPA</i>
Intermediário	<i>FLT-ITD</i> (independentemente da razão alélica ou mutação <i>NPM1</i>) t(9;11)(p21.3; q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> Anormalidades citogenéticas e/ou moleculares não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3)/rearranjo <i>KMT2A</i> (excluindo <i>KMT2A-PTD</i>) t(9;22)(q34.1; q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> (8; 16)(p11; p13)/ <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EV11)</i> t(3q26.2; v)/rearranjo <i>MECOM (EV11)</i> -5 ou del(5q); -7; -17/abn (17p) Cariótipo complexo (mudança na definição); cariótipo monossômico <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> ou <i>ZRSR2</i> mutante <i>TP53</i> mutante (frequência do alelo variante $\geq 10\%$)

Fonte: Shimony *et al.*, 2023.

Maiores quantidades de aglomerados de diferenciação de células T CD3+ e CD8+ foram identificados no sangue periférico de pacientes com LMA, bem como uma maior expressão de marcadores de ativação, como CD25 e CD69, concorrente com uma maior expressão de marcadores de memória, concluindo assim que na LMA, o sistema imunológico está em um estado preparado e ativado (Le Dieu, *et al.*, 2009).

O tratamento da LMA tem duas etapas. A primeira etapa, conhecida como etapa de indução, tem como objetivo alcançar a remissão completa para reduzir a carga de leucemia, de preferência sem doença residual mínima (DRM), e a segunda etapa, a de pós remissão, é necessária para uma chance razoável de um desfecho favorável a longo prazo e, possivelmente, de cura, prevenindo a recaída. A escolha da terapia de indução e pós-remissão é baseada em múltiplos parâmetros, incluindo comorbidades do paciente, histórico médico anterior, como doença mieloide prévia e/ou exposição à quimioterapia citotóxica, perfil de risco citogenético e molecular de LMA, status de DRM pós-terapia, bem como a disponibilidade de doadores e os objetivos de atendimento dos pacientes (Shimony *et al.*, 2023).

Até pouco tempo atrás, a genética ou o subtipo de LMA não eram levados em consideração na escolha do tratamento. Os pacientes eram tratados com uma combinação padrão conhecida por “7 + 3”: uma antraciclina (geralmente daunorrubicina ou idarubicina) administrada por 3 dias e citarabina, em infusão contínua, administrada por 7 dias consecutivos. Com a aprovação de vários novos agentes nos últimos 5 anos, o tratamento de linha de frente foi melhorado. Entre os novos agentes aprovados para o tratamento, está a midostaurina, utilizada em pacientes com mutações FLT3, gemtuzumab ozogamicina (GO), um anticorpo monoclonal contra CD-33 (uma proteína expressa em células de leucemia mieloide), utilizadas em pacientes com cariótipo de risco intermediário ou favorável e CPX-351 (formulação lipossomal de daunorrubicina e citarabina) para pacientes com LMA secundária (Stubbins *et al.*, 2022; Shimony *et al.*, 2023).

Venetoclax, um inibidor seletivo da proteína pró-apoptótica BCL2, foi aprovado em combinação com agentes hipometilantes (HMA) ou citarabina em dose baixa (*low dose cytarabine* – LDAC) para o tratamento de pacientes não aptos para indução com quimioterapia intensiva e para pacientes com idade ≥ 75 anos com LMA recém-diagnosticada. Os inibidores de IDH1 e IDH2, ivosidenib e enasidenib, foram aprovados como monoterapia para pacientes com LMA recidivante e refratária (R/R) com IDH mutada. Ivosidenib foi aprovado na linha de frente para pacientes inaptos, seja como monoterapia ou combinado com azacitidina. Olutasidenib também foi aprovado para pacientes LMA R/R com IDH1 mutado. Glasdegib, um inibidor da via hedgehog, foi aprovado para a terapia não intensiva em

pacientes com LMA recém-diagnosticados e gilteritinibe, inibidor de FLT3, aprovado como monoterapia para pacientes LMA R/R com mutações em FLT3 (Shimony *et al.*, 2023).

Na terapia de pós remissão, pacientes com escore de risco favorável devem receber 3-4 ciclos de quimioterapia com doses altas ou intermediárias de citarabina, enquanto para os pacientes com risco intermediário ou adverso são recomendados o tratamento com AlloSCT (transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas). Contudo, deve-se levar em conta que existem muitos riscos relacionados ao AlloSCT. O risco de mortalidade não relacionada a recidiva (MNR) é elevado, enquanto o risco de recidiva da doença é reduzido. Além disso, há aumento da morbidade, como doença crônica do enxerto versus hospedeiro, malignidades secundárias ou infecção por imunossupressão crônica. Para justificar o AlloSCT como terapêutica pós-remissão, a diminuição absoluta do risco de recidiva da doença tem de ser superior ao risco de MNR. Todos os pacientes com perfis de risco adversos e a maioria dos pacientes com risco intermediário atendem a esse critério. Os pacientes com perfis de risco favoráveis conseguem permanecer livres de recaídas apenas com quimioterapia, de modo que os riscos do AlloSCT não sejam justificados, portanto, nesse grupo, a terapia de indução é seguida de terapia de consolidação definitiva com citarabina em altas doses (HIDAC) (Pelcovits & Niroula, 2013; Shimony *et al.*, 2023).

A terapia de manutenção pós-transplante pode contribuir para a sobrevida prolongada. Para pacientes com LMA de risco intermediário ou adverso que não podem prosseguir com alloSCT, a terapia de manutenção com CC-486 ("azacitidina oral") pode ser administrada (Shimony *et al.*, 2023). A tabela 2 resume os medicamentos mais recentes aprovados pela FDA no tratamento de linha de frente da LMA.

Tabela 2 - Medicamentos e/ou combinações recentemente aprovados pelo FDA para LMA

	Mecanismo	Indicação	Regime
<i>Enasidenib</i>	Inibidor de IDH2	R/R: LMA com IDH2 mutado	Monoterapia
<i>Midostaurina</i>	Inibidor de FLT3	ND: LMA com FLT3 mutado	Combinação com "7 + 3" e consolidação com HIDAC
<i>Ivosidenib</i>	Inibidor de IDH1	R/R: LMA com IDH1 mutado ND: LMA com IDH1 mutado, idade ≥ 75 anos/comorbidades, não apto para quimioterapia intensiva	R/R: Monoterapia ND: Combinação com azacitidina ou monoterapia
<i>CPX351</i>	Daunorrubicina lipossomal e citarabina	ND: t-LMA ou LMA-CRM	Monoterapia para indução e consolidação
<i>GO – gemtuzumab + ozogamicina</i>	Conjugado de drogas com anticorpos direcionados para CD33	ND: LMA positiva R/R: adultos positivos	CD33 CD33 ND: combinação com quimioterapia intensiva R/R: Monoterapia
<i>Venetoclax</i>	Inibidor de BCL2	ND: Idade ≥ 75 anos/comorbidades, não apto para quimioterapia intensiva	Combinação + azacitidina, decitabina ou LDAC
<i>Glasdegib</i>	Inibidor da via hedgehog	ND: idade ≥ 75 anos/comorbidades, não apto para quimioterapia intensiva	Em combinação com LDAC
<i>Gilteritinibe</i>	Inibidor de FLT3	R/R: LMA com FLT3 mutado	Monoterapia
<i>CC486</i>	Inibidor oral de DNMT	ND: idade ≥ 55 anos como terapia de indução pós-intensiva em pacientes que alcançaram remissão	Monoterapia
<i>Olutasidenib</i>	Inibidor de IDH1	R/R: LMA com IDH1 mutado	Monoterapia

Abreviaturas: "7+3", daunorrubicina e citarabina; DNMT, DNA metiltransferase; LMA, leucemia mieloide aguda; LMA-CRM, leucemia mieloide aguda com alterações mielodisplásicas; FLT3, tirosina quinase 3 relacionada ao fms; GO, gemtuzumabe ozogamicina; HIDAC, citarabina em altas doses; LDAC, citarabina em dose baixa; ND, recém-diagnosticado; R/R, recidivante ou refratário; t-LMA, LMA relacionada à terapia.

Fonte: Shimony *et al.*, 2023.

Em relação a imunoterapia, novas opções têm sido estudadas, testadas e utilizadas. Os inibidores de checkpoint (CPI), como moduladores positivos da resposta imune, mostraram um bom resultado para o tratamento de tumores sólidos. Já nos estudos em pacientes com LMA, demonstraram uma eficácia clínica modesta como um agente único e parece ser mais ativo em combinação com outros agentes, e agentes hipometilantes (HMA) ou combinação de CPIs (Saygin; Carraway, 2017; Alfayez; Borthakur, 2018). Algumas terapias imunes estão em estudo para o tratamento de LMA, como magrolimabe, um anticorpo monoclonal anti-CD-47 e MBG453 (sabatolimab), um anticorpo humanizado que tem como alvo TIM3 (Liu *et al.*, 2015; Santini, 2021). Outras terapias imunes em desenvolvimento incluem anticorpos biespecíficos e células de receptor de antígeno quimérico (CART) dirigidas contra uma infinidade de antígenos diferentes, incluindo CD123, CD33 e CD70. Flotetuzumab, que é uma molécula biespecífica baseada em anticorpos DART para CD3 ϵ em células T e CD123 em blastos de LMA, porém, o desenvolvimento do flotetuzumab foi descontinuado com o foco em um DART de segunda geração chamado MGD024, que é de meia-vida mais longa para facilidade de administração e espera-se que esteja associada a menos eventos do SNC (Guy; Uy, 2018; Mardiana; Gill, 2020; Shimony *et al.*, 2023). Mesmo com o avanço no estudo de moléculas para o tratamento da LMA, a causa mais comum de morte é a recidiva ou doença refratária, provavelmente causada por células-tronco leucêmicas.

2.2 Células-tronco Leucêmicas

As células-tronco cancerígenas (do inglês *cancer stem cells* – CSCs) tornaram-se alvo de muitos estudos, pois acredita-se que elas são responsáveis pelo crescimento contínuo e pela expansão das populações de tumores em massa (JORDAN *et al.*, 2006). Na patogênese da LMA, as células-tronco leucêmicas (CTLs) representam um reservatório de células que impulsionam a iniciação, o desenvolvimento, a resistência a fármacos e a recaída da doença (Bonnet & Dick 1997; Gilliland *et al.*, 2004; Jordan; Guzman, 2004).

As CTLs de LMA foram definidas como as células capazes de regenerar populações de células de LMA humanas após transplantes em camundongos imunodeficientes NOD/SCID irradiados com uma dose subletal (Lapidot *et al.*, 1994; Sarry *et al.*, 2011; Siveen *et al.*, 2017). Elas também foram caracterizadas por sua capacidade de autorrenovação,

potencial de repovoamento ilimitado e permanência prolongada na fase G₀/G₁ do ciclo celular em estado quiescente (Lapidot *et al.*, 1994). Essa autorrenovação ilimitada é uma propriedade importante das CTLs que é distinta da proliferação de células tumorais (Hope *et al.*, 2004).

As células-tronco hematopoiéticas (CTHs) dão início a hematopoiese, processo de formação das células do sangue. Elas residem na medula óssea, são multipotentes, são em grande parte quiescentes e mantêm a capacidade de autorrenovação. Os principais moduladores da hematopoiese incluem inflamação, microambiente de CTH, dinâmica mitocondrial, espécies reativas de oxigênio, epigenética, entre outros fatores. Uma vez ativadas, as CTHs diferenciam-se em células progenitoras multipotentes (MPPs), que são desprovidas de autorrenovação e apresentam uma atividade de diferenciação mais robusta. De maneira geral, as MPPs se diferenciam em progenitores mielóides comuns (CMPs), e progenitores linfóides comuns (CLPs). CMPs dão origem aos megacariócitos, eritrócitos, monócitos e granulócitos, enquanto os CLPs dão origem as células dendríticas, *natural killer* (NK), linfócitos B e T (figura 2). As MPPs possuem 3 subtipos: MPP2, MPP3 e MPP4 e são tendenciosas para se comprometerem com linhagens específicas de acordo com as sinalizações moleculares. As células MPP2 formam progenitores de granulócitos/macrófagos (GMP) e progenitores megacariócitos-eritróides (MEP). As células MPP3 alimentam predominantemente a produção de GMP. As células MPP4 se diferenciam em progenitores de linhagens linfóides, via CMPs ou CLPs (também conhecidos como MPP4). A transformação carcinogênica no estágio de CTH gera CTLs, enquanto a de células em estágio de desenvolvimento mais maduro gera células leucêmicas (Nemkov *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2020).

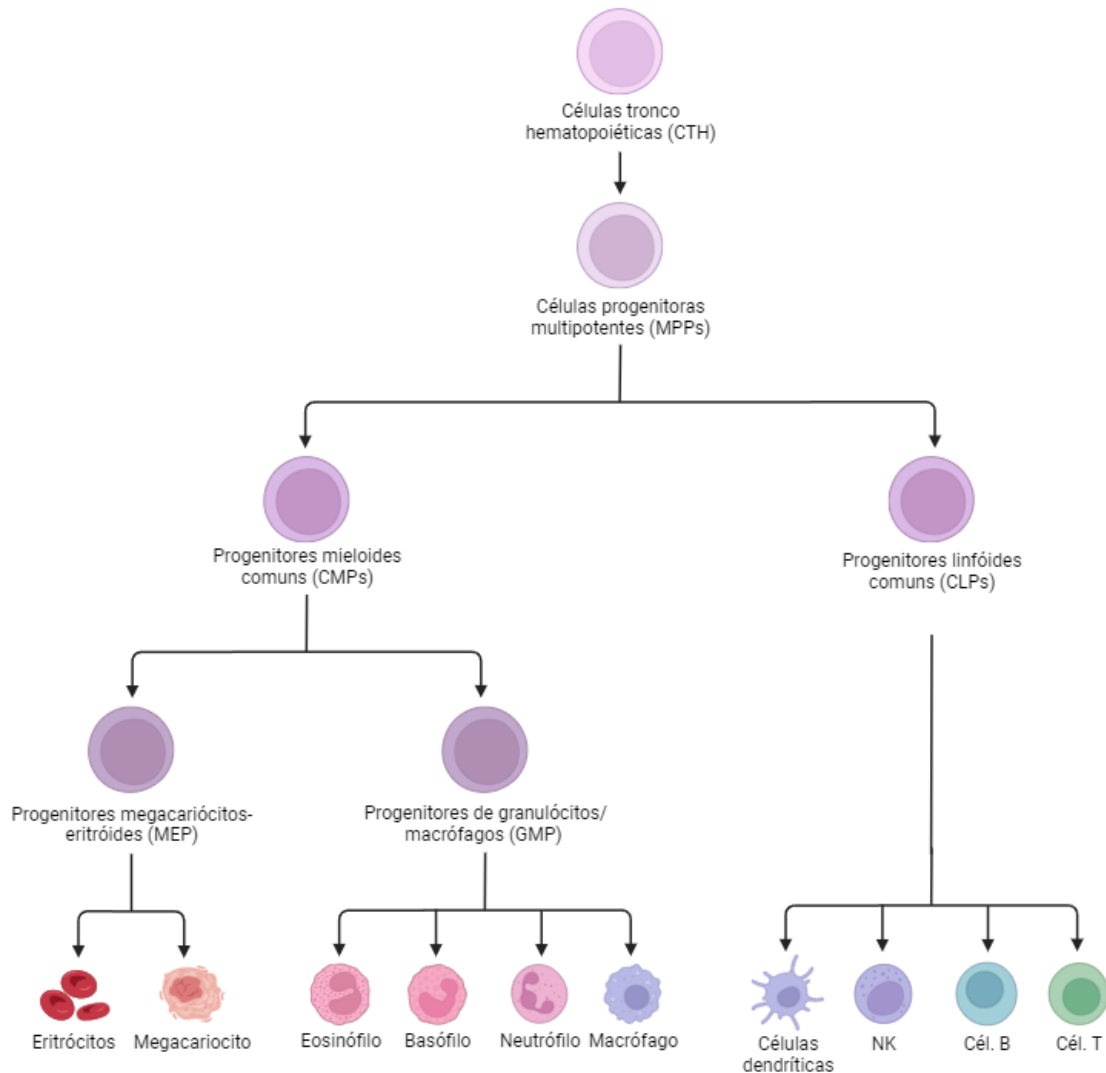


Figura 2 - Hematopoiese.

Fonte: Elaborado pela autora no BioRender.

As CTLs exibem o fenótipo da superfície celular CD34⁺/CD38⁻, que é semelhante à população de progenitores hematopoiéticos humanos normais (Clarke *et al.*, 2006; Horton; Huntly, 2012). De forma semelhante à hematopoiese normal, as CTLs dão origem a células-filhas que têm a capacidade de autorrenovação e a blastos leucêmicos diferenciados, que representam estágios interrompidos ou aberrantes do desenvolvimento mielóide. Um aspecto importante da LMA é que a população de tumores é heterogênea e as CTLs são biologicamente distintas dos blastos altamente diferenciados (Hope *et al.*, 2004; Jordan; Guzman, 2004). Outros estudos sobre o imunofenótipo de CTLs mostraram que elas

expressam alguns marcadores específicos, como CD4, CD7, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD25, CD32, CD33, CD34, CD44, CD45RA, CD47, CD65s, CD90, CD96, CD99, CD123, CLL-1, IL-1RAP e TIM-3 (Schwonzen *et al.*, 2006; Zhou; Chng, 2014; Sugita; Guzman, 2020).

A organização hierárquica da LMA sugere que a recaída pode estar relacionada à terapêutica atual que visa apenas os progenitores leucêmicos de proliferação rápida, e não as CTLs mais quimiorresistentes, as quais formam o reservatório para recaída e resistência subsequentes (Ishikawa *et al.*, 2007; Damiani *et al.*, 2015). Mesmo um pequeno número de CTLs que sobrevive à quimioterapia de indução inicial pode levar a uma drástica redução na sobrevida global, pois, após o término do tratamento, essas CTLs podem se expandir rapidamente. Outro cenário possível, é o dessas células permanecerem inativas ou com o crescimento lento e levarem à recaída anos depois, com um período mais longo de sobrevivência do que no cenário anterior (Stiehl *et al.*, 2015).

A frequência das CTLs no diagnóstico oferece um novo fator prognóstico na LMA, e uma grande população de CD34+/CD38- reflete uma porcentagem maior de células resistentes à quimioterapia que levará ao crescimento da DRM, afetando o resultado clínico (Van Rhenen *et al.*, 2005). O monitoramento da DRM é uma importante ferramenta não apenas para avaliar a resposta precoce à terapia, mas para a tomada de decisões melhores sobre as estratégias pós-remissão. Os métodos mais utilizados para estabelecer a DRM incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a citometria de fluxo multiparamétrica, porém, podem ser ainda mais refinados incluindo parâmetros de pré-tratamento, como marcadores citogenéticos e moleculares (Grimwade *et al.*, 2009).

2.3 NF- κ B

A LMA possui algumas vias de sinalização celular importantes para as suas propriedades de sobrevivência, proliferação e autorrenovação. Essas vias são anormalmente ativadas ou suprimidas nas CTLs e podem ser utilizadas como alvos moleculares para eliminar essas células, a partir de sua ativação ou inibição. Isso inclui as vias NF- κ B, Wnt/ β -Catenina, Hedgehog, Notch, EGFR, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR, TGF/SMAD e PPAR (Rodrigues *et al.*, 2021).

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição dimérico que estimula a expressão de seus genes-alvo em resposta a estímulos, como antígenos virais e bacterianos, radiação UV e citocinas como IL-2 e TNF- α (Chen *et al.*, 2002). Ele desempenha papéis versáteis e cruciais em uma infinidade de funções celulares normais, incluindo respostas imunes e inflamatórias, crescimento, sobrevivência e desenvolvimento celular. Este fator de transcrição pró-inflamatório consiste em proteínas da família *rel*, que estão relacionadas por meio de um domínio de ligação/dimerização de DNA altamente conservado, denominado domínio de homologia Rel (RH). Atualmente, cinco membros da família NF- κ B de mamíferos foram identificados e estudados, estes são: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB e c-Rel (Zhou *et al.*, 2015).

No estado ativo, o complexo NF- κ B é translocado para o núcleo e é capaz de ativar seus genes-alvo, enquanto no estado inativo, o complexo NF- κ B é mantido no citoplasma por seu inibidor (I κ B α). A sinalização de NF- κ B ocorre através da via canônica (clássica) ou não canônica (alternativa), iniciadas por NF- κ B1 (p50/p105) e NF- κ B2 (p52/100), respectivamente (figura 3) (Zhou *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2021).

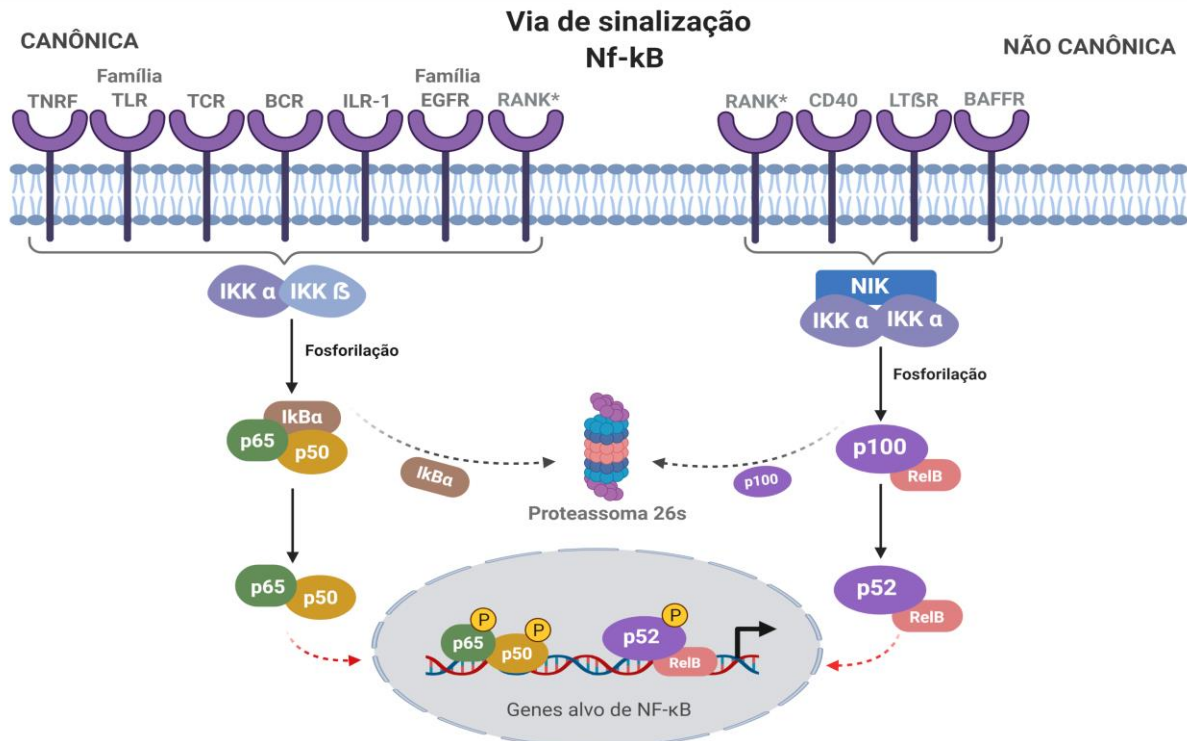


Figura 3 - Via de sinalização NF- κ B.
Fonte: Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2021.

Na via canônica, a ligação de um ligante a um receptor de superfície celular ativa o complexo NF- κ B. Os receptores de citocinas pró-inflamatórias incluem: membros do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (TNFR), receptor de interleucina (IL) -1 (IL-1R), membros da família do receptor tipo toll (TLR) (TLR3, TLR4, TLR7), receptores de antígenos, tais como receptor de células T (TCR) e receptor de células B (BCR) e fatores de crescimento, como membros da família EGFR. A ativação desses receptores culminará na ativação do complexo IKK (IKK α e IKK β), que irá fosforilar o inibidor I κ B α resultando em sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma 26S e permitindo a translocação nuclear transitória do heterodímero p65/p50, levando a ativação dos genes alvos (Hoesel; Schmid, 2013; Zhou *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2021).

A via não canônica, é ativada por um conjunto específico de receptores, como um subconjunto de membros da superfamília TNFR, incluindo fator de ativação de células B pertencente ao receptor da família TNF (BAFFR), CD40, receptor de linfotóxina β (LT β R), ativador de receptor para fator nuclear κ B (RANK), TNFR2, Fn14, entre outros. Esses sinais ativam a quinase indutora de NF- κ B (NIK), que ativa IKK α . IKK α induz a proteólise parcial de p100, o qual será fosforilado, ubiquitinado e processado pelo proteassoma em p52. O heterodímero p52/RelB é translocado para o núcleo da célula e pode então ativar a transcrição de genes alvo (Hoesel; Schmid, 2013; Rodrigues *et al.*, 2021).

O NF- κ B é considerado o principal regulador da resposta inflamatória e muitos estudos demonstraram que a via de sinalização do NF- κ B desempenha um papel importante nas células tumorais em relação a resistência aos fármacos durante a quimioterapia. Muitos desses quimioterápicos e radioterápicos induzem a expressão do NF- κ B *in vitro* e *in vivo* (Siveen *et al.*, 2014). Surpreendentemente, os agentes quimioterápicos de LMA comumente utilizados (por exemplo, citarabina) não inibem o NF- κ B, ao contrário, levam a uma maior regulação positiva da atividade do NF- κ B (Tergaonkar *et al.*, 2002). A ativação desse fator de transcrição tem sido descrita como responsável pela resistência à apoptose, proliferação celular e invasão tumoral (Rodrigues *et al.*, 2021).

A ativação constitutiva de NF- κ B é observada em CTLs de LMA humanas, enquanto as células progenitoras CD34+ humanas normais não expressam NF- κ B (Guzman *et al.*, 2001). Direcionar essa expressão aberrante pode induzir estímulo apoptótico e/ou sensibilizar CTLs a uma variedade de outros agentes e, assim, pode ser usado para atingir CTLs sem

toxicidade significativa para células-tronco hematopoiéticas (CTH) normais (Zhou *et al.*, 2015).

O inibidor de proteassoma MG-132 (um inibidor conhecido de NF- κ B) induziu apoptose em células de LMA CD34+/CD38- a partir da inibição de NF- κ B, mas teve pouco ou nenhum efeito sobre CTH normais (Guzman *et al.*, 2001). Já a combinação de MG-132 e idarubicina (MG-132/IDR) pode erradicar as CTLs efetivamente através de um mecanismo que envolve inibição concomitante do NF- κ B, mediação dos sinais de sobrevivência e indução do estresse oxidativo, sem afetar as CTH normais, porém o MG-132 sozinho não foi suficiente para induzir apoptose significativa. Também foi observado que células tratadas com MG-132/IDR regularam positivamente vários genes mediadores da apoptose que são regulados pela via de p53, indicando que a ativação de um mecanismo dependente de p53 é provavelmente um componente do processo geral de apoptose (Guzman *et al.*, 2002). O tratamento com concentrações graduais de bortezomibe e MG-132 diminuiu a viabilidade de células TF-1a de LMA humana. O tratamento dessas células com MG-132, também reduziu significativamente o número de colônias em um ensaio de replicação em série usando metilcelulose básica sem citocinas adicionais (Zhou *et al.*, 2018).

Partenolídeo (PTL), uma pequena molécula de ocorrência natural, mostrou induzir a morte celular por apoptose a partir da inibição de NF- κ B, ativação de p53 e aumento de ROS em células de cultura primária de LMA e CTLs de LMA xenoenxertadas em camundongo NOD/SCID, mas não em CTH normais (Guzman *et al.*, 2005). Posteriormente, foi desenvolvida uma família de análogos de PTL projetados para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade, dentre eles, o DMAPT (dimetilaminopartenolídeo), que apresentou propriedades de morte celular semelhantes ao PTL. Também foi realizado estudos farmacológicos por ensaios funcionais e múltiplos biomarcadores utilizando modelos de xenoenxerto de camundongo NOD/SCID e cães com leucemias agudas espontâneas, e o DMAPT demonstrou bioatividade *in vivo* (Guzman *et al.*, 2007). O encapsulamento do PTL em nanopartículas e o uso de um sistema de vetor multiestágio (MSV-PTL) foi capaz de liberar o composto na medula óssea do camundongo xenoenxertado com células de LMA derivadas de paciente, levando a morte dessas células através da inibição de NF- κ B (Zong *et al.*, 2016). Micheliolide (MCL), um sesquiterpeno natural que foi descoberto nas plantas *Michelia compressa* e *Michelia champaca*, foi sintetizado a partir do PTL e é

substancialmente mais estável que o PTL *in vivo*. MCL exerce seus efeitos citotóxicos em CTLs de amostras primárias de LMA, sem afetar significativamente as células mononucleares normais e HSCs, através da inibição da expressão e atividade NF- κ B, e gerando espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs) (Ji *et al.*, 2016).

As proantocianidinas do tipo A (A-PACs), obtidas a partir de extratos de cranberry (*Vaccinium spp.*), foram capazes de eliminar as CTLs, sem afetar as CTH normais, efeito também observado *in vivo* usando xenoenxertos derivados do paciente (PDX). O mecanismo da morte celular foi impulsionado pela ativação do NF- κ B, ao contrário do que foi relatado em muitos estudos. Houve um aumento na regulação transcricional dos genes alvo dessa via de sinalização, como NFKBIA, NFKB1, NFKB2 e RELA/B. Esses dados indicam que outros distúrbios em NF- κ B, como hiperativação, também podem causar morte celular na LMA (Bystrom *et al.*, 2019).

2.4 Bitionol

Bitionol (BT), um composto difenólico (figura 4), mostrou ser relevante para infecções neurológicas, sendo utilizado para tratar infecções cerebrais helmínticas, como o paragonimus que atinge o sistema nervoso central (SNC) (Oh, 1967). Antes do advento do praziquantel, foi usado extensivamente como agente anti-helmíntico contra paragonimiasis pulmonares (Yokogawa, 1984). Recebeu aprovação da FDA como um medicamento de segunda linha administrado oralmente para o tratamento de infecção helmíntica e foi dosado com segurança em humanos (Bacq *et al.*, 1991). Além disso, demonstrou ter propriedades fungicidas contra *Cryptococcus neoformans* (Park *et al.*, 2016).

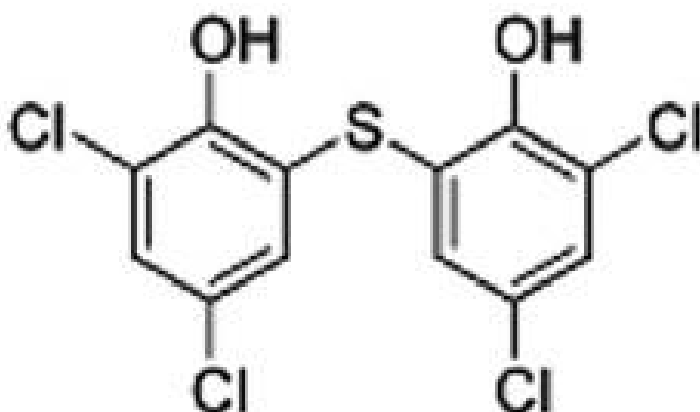


Figura 4 - Estrutura química do BT

BT também demonstrou inibir o crescimento de tumor sólido em vários modelos de câncer pré-clínicos, reduzindo a migração e invasão de células cancerígenas de mama, melanoma e ovário estimulados por autotaxina (ATX), uma enzima prometastática (Saunders *et al.*, 2008). Além disso, BT inibiu o crescimento das células cancerígenas do colo do útero, ME180 e HeLa, durante o rastreamento *in vitro* e induziu a atividade de caspase 3/7 (Miller *et al.*, 2010). Recentemente, mostrou causar citotoxicidade concentração-dependente contra as linhagens de células cancerígenas do ovário testadas, incluindo as variantes A2780 e IGROV-1 resistentes à cisplatina (Ayyagari; Brard, 2014).

Como descrito acima, a inibição da via NF- κ B é relatada como um alvo para mediar a morte de CTLs de LMA. Pesquisadores do NIH Chemical Genomics Center (EUA) triaram aproximadamente 2.800 medicamentos clinicamente aprovados e compostos bioativos da NIH Chemical Genomics Center Pharmaceutical Collection (NPC) em um ensaio de gene repórter de β -lactamase mediado por NF- κ B para identificar pequenas moléculas inibidoras da sinalização de NF- κ B. Cada composto foi testado em quinze concentrações diferentes em um formato quantitativo de triagem de alto rendimento. Eles identificaram 19 fármacos que inibiram a sinalização de NF- κ B com potências menores que 20 nM, dentre eles o bitionol (Miller *et al.*, 2010). Com base nessas observações significativas, buscamos uma melhor compreensão do efeito do BT nas linhagens de LMA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do bitionol como fármaco capaz de eliminar células-tronco leucêmicas de leucemia mieloide aguda em modelo translacional *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do bitionol em diferentes linhagens celulares;
- ✓ Avaliar a capacidade do bitionol em eliminar células-tronco leucêmicas de leucemia mieloide aguda;
- ✓ Avaliar o padrão de morte celular induzido por bitionol;
- ✓ Analisar a expressão de caspase-3 ativa e PARP-1 clivada em células de leucemia mieloide aguda após o tratamento com o bitionol;
- ✓ Analisar as alterações sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células de leucemia mieloide aguda após o tratamento com bitionol;
- ✓ Avaliar a capacidade do bitionol em induzir estresse oxidativo em células de leucemia mieloide aguda;
- ✓ Analisar as alterações sobre o ciclo celular de células de leucemia mieloide aguda após o tratamento com bitionol;
- ✓ Avaliar a capacidade do bitionol em inibir NF- κ B de leucemia mieloide aguda;
- ✓ Analisar as alterações morfológicas em células de leucemia mieloide aguda após o tratamento com bitionol;
- ✓ Verificar o efeito do bitionol sobre a expressão gênica de células de leucemia mieloide aguda;
- ✓ Determinar o efeito contra células-tronco leucêmicas *in vivo* do bitionol em modelo translacional de xenoenxerto com células de leucemia mieloide aguda;
- ✓ Avaliar o efeito da combinação do bitionol em com diversos fármacos utilizados no tratamento de neoplasias mielóides.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do composto

BT (Sigma-Aldrich) foi obtido comercialmente. BT foi dissolvido em DMSO estéril (Synth, Diadema, SP, Brasil) em uma solução estoque de 5 mg/mL e armazenado a -20 °C. BT foi diluído com PBS em diferentes concentrações para todos os experimentos.

4.2 Obtenção e tratamento das células

Foram utilizadas 11 linhagens celulares de câncer hematológico, 17 linhagens celulares de câncer sólido, 05 células não cancerosas, sendo uma mutante e seu controle parental. A tabela 3 contém a lista com as linhagens utilizadas. As linhagens foram obtidas da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.), da *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSMZ (Braunschweig, Alemanha) e BCRJ (Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 ou D-MEM/F-12, suplementado com 10-20% de soro bovino fetal e 10 µg/mL de gentamicina ou 100 µg/mL de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Leicestershire, Reino Unido). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, acompanhadas diariamente e subcultivadas a cada 3-4 dias para manter o crescimento exponencial. As células foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) ou foram autenticadas usando o perfil de repetições curtas em tandem (STR) realizado pelos fornecedores, e todas as células estavam isentas de qualquer contaminação.

Tabela 3 - Lista das linhagens celulares utilizadas

Linhagens	Tipo histológico	Origem
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	ATCC
4T1	Carcinoma de mama (triplo negativo) murino	ATCC
MDA-MB-231	Carcinoma de mama humana	BCRJ
HCT116	Carcinoma de cólon humano	ATCC
DU 145	Câncer de próstata humano	BCRJ
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	ATCC
B16-F10	Melanoma murino	ATCC
A-375	Melanoma humano	BCRJ
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano	ATCC
CAL27	Carcinoma oral de células escamosas humano	ATCC
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosas humano	ATCC
SCC-9	Carcinoma oral de células escamosas humano	ATCC
SCC25	Carcinoma oral de células escamosas humano	ATCC
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário	BCRJ
PANC-1	Carcinoma pancreático	BCRJ
A549	Carcinoma pulmonar	BCRJ
U-87 MG	Glioblastoma humano	BCRJ
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humana	ATCC
NB4	Leucemia promielocítica aguda humana	ATCC
KG-1	Leucemia mielóide aguda humana	DSMZ
KG-1a	Leucemia mielóide aguda humana	ATCC
MOLM-13	Leucemia mielóide aguda humana	DSMZ
PL-21	Leucemia mielóide aguda humana	DSMZ

THP-1	Leucemia monocítica aguda	ATCC
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana	ATCC
Kasumi-1	Leucemia mieloblástica aguda humana	DSMZ
MV4-11	Leucemia mielomonocítica bifenotípica B humana	DSMZ
Jurkat	Leucemia linfóide de células T humana	ATCC
Células não cancerosas		
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano	ATCC
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico	Cultura
BJ	Fibroblasto de prepúcio humano	ATCC
WT-MEF	Fibroblasto embrionário murino	ATCC
BAD-MEF	Fibroblasto embrionário murino, gene BAD knockout	ATCC

ATCC - *American Type Culture Collection* (EUA), DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (Alemanha) e BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro (Brasil). A cultura celular primária de PBMCs foi obtida a partir de sangue periférico de doadores saudáveis por um protocolo de densidade Ficoll padrão.

Fonte: Autora

PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos) foram obtidas de cultura primária coletados de voluntários saudáveis entre 20-45 anos de idade, não fumantes, que não tinham tomado quaisquer medicamento durante pelo menos 15 dias anteriores à amostragem. O comitê de ética em pesquisa do Instituto Gonçalo Moniz (IGM-FIOCRUZ/BA, Salvador, Bahia, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº 031019/2013). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação do estudo. A coleta do sangue foi realizada em frascos heparinizados por profissionais capacitados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (IGM, Fiocruz, Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 10 mL. As PBMC foram isoladas por protocolo padrão, utilizando o gradiente com Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). O precipitado de PBMC foram lavados duas

vezes com solução salina e ressuspendido na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 ou D-MEM/F-12 com 20% de soro bovino e 10 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. Foi utilizado no início da cultura 10 $\mu\text{g/mL}$ de concanavalina A (ConA- Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) para desencadear a divisão celular em linfócitos T. A viabilidade celular foi examinada utilizando ensaio de exclusão de azul de tripam, na qual mais de 90% das células estavam viáveis no início da cultura.

4.3 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade do BT foi realizada por Alamar blue ou ensaio luminescente CellTiter-Glo. No ensaio do alamar blue (resazurina), um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox, de acordo com Ahmed *et al.* (1994), as células viáveis reduzem a resazurina, de cor azul e não fluorescente, a resorufina, de cor rosa e fluorescente, através de enzimas mitocondriais. Para todos os experimentos, as células foram inseridas em placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas e $0,3 \times 10^6$ células/mL para células em suspensão em 100 μL de meio). Após 24h, os compostos testes nas concentrações de 0,19 a 25 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionados em cada poço em duplicatas e incubados por 72 horas. Doxorrubicina (pureza $\geq 95,0\%$, cloridrato de doxorrubicina, Laboratório IMA SAIC) foi usada como controle positivo. Foi adicionado 20 μL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) em cada poço 04 horas (para células tumorais) ou 24 horas (para PBMC) antes do término do período de incubação. Após o período de incubação, as placas foram mensuradas nas absorvâncias de 570 nm e 600 nm utilizando o leitor SpectraMax 190. A partir da leitura de três experimentos independentes em duplicatas foram obtidos os valores de CI_{50} para as células tumorais e não tumorais.

Para as linhagens MOLM-13, PL-21, MV4-11, Kasumi-1 e KG-1, a citotoxicidade do BT foi avaliada usando o ensaio luminescente CellTiter-Glo (Promega, Southampton, Reino Unido). Após o período de 72 horas de incubação, uma alíquota de 20 μL de células tratadas foi acrescida a 20 μL do reagente CellTiter-Glo. A placa foi incubada por 20 min à temperatura ambiente no escuro para estabilizar o sinal luminescente. A luminescência foi

medida usando um leitor de microplacas Synergy HTX Multi-Mode (Biotek, Winooski, VT, EUA).

4.4 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, foi realizado o ensaio de exclusão por azul de tripam. As células não viáveis não conseguem expulsar o corante devido aos danos na membrana e por isso são coradas de azul, enquanto as viáveis conseguem expulsá-lo e não são coradas. Após o tratamento das células KG-1a com BT (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, uma alíquota de 90 μL das células tratadas foi acrescida a 10 μL do corante azul de tripam. A contagem foi realizada levando em consideração a exclusão do corante por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico (Olympus CX41). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em duplicatas.

4.5 Ensaio de identificação de células-tronco leucêmicas e quantificação de sua viabilidade

O ensaio de identificação e quantificação de CTLs foi realizado por análise multiparamétrica em citômetro de fluxo como descrito anteriormente (Guzman *et al.*, 2001). Resumidamente, as células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 48 horas com BT (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após o tratamento, as células foram marcadas para moléculas de superfície com anticorpos anti-CD13 PE-CF594, anti-CD33 BV510, anti-CD34 PE, anti-CD38 BV421 e anti-CD123 BV605 (BD Biosciences). Para a marcação, as células foram diluídas em 2 mL de tampão de incubação (BSA 0,5% em PBS), centrifugadas e ressuspendidas em 100 μL da mistura de anticorpos (master mix), preparado em PBS com 0,5% de BSA (PBS/BSA) e incubadas durante 40 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado o YO-PRO-1 (Sigma-Aldrich Co.) em 200 μL de salina para separar células viáveis de inviáveis. As células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As análises foram feitas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três

experimentos independentes realizados em duplicatas. Trinta mil eventos foram analisados em cada amostra e os detritos celulares foram omitidos dos resultados.

4.6 Avaliação in vitro do padrão de morte celular apoptótica

As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 12, 24, 48 e/ou 72 horas com BT (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), além dos controles positivo (DOX 1 μM) e negativo (DMSO 0,2%). Após o tratamento, as células KG-1a foram centrifugadas, lavadas com salina e adicionado ao pellet celular 100 μL de tampão de ligação além de 3 μL de anexina V-FITC (BD Biosciences) e 3 μL de iodeto de propídeo (IP, BD Biosciences). As células foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min e então adquiridas por citômetro de fluxo. Também foi utilizado o YO-PRO-1 (Sigma-Aldrich Co.) e IP como método de detecção de morte celular apoptótica por citometria de fluxo. Para ensaio funcional, foi utilizado um inibidor de ferroptose, ferrostatina-1 1 μM .

As células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As análises foram feitas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.7 Análise da atividade de caspase-3 e PARP-1

As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 24 horas com BT (10 $\mu\text{g/mL}$). Após o tratamento, as células KG-1a foram ressuspensas em 1 ml de PBS 1X com formaldeído na concentração final de 4% e fixadas durante 10 minutos a temperatura ambiente, e depois colocadas no gelo por 1 minuto. As células foram centrifugadas e lavadas com PBS gelado. Após essa etapa, foram diluídas em 1mL de metanol 90% gelado e incubadas 30 minutos no gelo para permeabilização. Para a marcação, as células foram diluídas em 2 mL de tampão de incubação (BSA 0,5% em PBS), centrifugadas e ressuspensas em 100 μL da mistura de anticorpos (Master mix: tampão + Anti-Cleaved

PARP (Asp214) + Anti-Active caspase-3), preparado em PBS com 0,5% de BSA (PBS/BSA), 10 μ L de PE (PARP) e 2 μ L de FITC (caspase) e incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente. As células foram diluídas novamente em 2 mL de tampão de incubação, centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de Anexina V-FITC e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As análises foram feitas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.8 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial

Quando o estado de variação de potencial transmembrânico mitocondrial está inalterado, a mitocôndria consegue sequestrar o corante fluorescente rodamina 123 para o seu interior. As células com polarização inalterada emitem alta fluorescência verde devido a uma maior concentração de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto, mitocôndrias com alterações do potencial transmembrânico emitem menos fluorescência (Wong, 2009). As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 24 horas com BT (10 μ g/mL), além do controle negativo (DMSO 0,2%). Após o tratamento, as células KG-1a foram centrifugadas e diluídas com a solução de rodamina 123 (1 μ g/mL em PBS, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), na ausência de luz e a 37 °C, e incubadas por 15 minutos. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensado em solução salina e reincubado por 30 min e, então, adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As análises foram feitas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.9 Quantificação das espécies reativas de oxigênio intracelular

A presença de ERO mitocondrial foi avaliada utilizando o indicador de superóxido MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). MitoSOX™ é um indicador de superóxido que tem como alvo específico as mitocôndrias de células vivas. Esse método baseia-se no princípio de que quando o MitoSOX™ é oxidado por superóxido, o óxido emite fluorescência vermelha após a ligação ao ácido nucleico possibilitando medir diretamente os peróxidos gerados pelas mitocôndrias das células vivas. Dessa maneira, a fluorescência vermelha se acumula nas mitocôndrias por isso o MitoSOX™ pode ser utilizado como um biomarcador confiável para determinar a toxicidade oxidativa mitocondrial no desenvolvimento de novos medicamentos (Ahn et al., 2022). As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 1 e 24 horas com BT (10 $\mu\text{g/mL}$), além do controle negativo (DMSO 0,2%). Os níveis de ERO mitocondriais foram detectados medindo a fluorescência de MitoSOX™ Red de acordo com as instruções do fabricante. As células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As análises foram feitas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.10 Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o IP (iodeto de propídio) como agente fluorógeno. O iodeto de propídeo tem capacidade de se ligar no DNA celular emitindo alta fluorescência, e com isso permite quantificar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular por citometria de fluxo. As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 12, 24, 48 e 72 horas com BT (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), além dos controles positivo (DOX 1 μM) e negativo (DMSO 0,2%). Após o tratamento, as células KG-1a foram centrifugadas e diluídas com a solução de permeabilização (200 μL) contendo 0,1 % de triton X-100 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), 0,1% de citrato de sódio, 2 $\mu\text{g/mL}$ iodeto de propídeo (Sigma-

Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) e 100 µg/mL RNase (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) em PBS, na ausência de luz e a 37°C. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As análises foram feitas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.11 Análise da expressão de NF-κB p65 (pS529 e pS536)

As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 24 horas com BT (10 µg/mL), além do controle negativo (DMSO 0,2%). Após o tratamento, as células KG-1a foram ressuspensas em 1 mL de formaldeído a 4% por 10 min a 37°C. Os tubos foram então colocados no gelo por 1 min. As células foram permeabilizadas durante 30 min em gelo, utilizando metanol gelado. Em seguida as células foram marcadas com os anticorpos anti-NF-κB p65 (pS529) Alexa Fluor® 488 (#558421, BD Phosflow™) ou anti-NF-κB p65 (pS536) FITC (#MA5-37157, Thermo Fisher Scientific) e incubadas durante 1 hora, diluídas em tampão de incubação, centrifugadas, ressuspensas em 200 µL de PBS/BSA e adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As análises foram feitas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.12 Quantificação de proteínas por Western Blot

As células KG-1, KG-1a, Kasumi-1 e HL-60 ($0,2 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 72 horas com BT nas respectivas concentrações de cada célula. Após o tratamento, as células foram lisadas para extração das proteínas com 60 µL de tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA). A concentração da proteína foi determinada usando o *BCA Protein Assay Kit* (Merck, Poole, Reino Unido). Cada amostra foi submetida a eletroforese

através do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 4–12% (Life Technologies, Renfrewshire, Reino Unido), transferida para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham; Reino Unido) e sondada com anticorpos descritos na tabela 4. GAPDH foi usado como controle de carga (Merck, Poole, Reino Unido). Os níveis de expressão da proteína foram avaliados usando o kit de detecção de Western blotting - Pierce ECL (Thermo Scientific; Leicestershire, Reino Unido). As membranas foram digitalizadas usando G:box de bancada (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Tabela 4 - Lista dos anticorpos utilizados no Western Blot.

Epitopo	Clone	Fabricante
Phospho-IKK α/β (Ser176/180)	16A6	Cell Signaling Technology
IKK α	3G12	Cell Signaling Technology
IKK β	D30C6	Cell Signaling Technology
NF- κ B p65	D14E12	Cell Signaling Technology
Phospho-NF- κ B p65 (Ser536)	93H1	Cell Signaling Technology
Phospho-I κ B α (Ser32)	14D4	Cell Signaling Technology
I κ B α	L35A5	Cell Signaling Technology
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	-	Cell Signaling Technology
Anti-mouse IgG, HRP-linked	-	Cell Signaling Technology

Fonte: Autora

4.13 Microscopia confocal

As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 24 horas com BT (10 $\mu\text{g/mL}$), além do controle negativo (DMSO 0,2%). Após o tratamento, as células KG-1a foram lavadas duas vezes com solução salina, colocadas como uma pequena gota (5 μL) em uma lâmina, fixadas em metanol a -20°C , permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%), lavadas, tratadas com RNase (10 $\mu\text{g/mL}$), lavadas novamente e incubadas com o anticorpo anti-NF- κB p65 PE (#653003, BioLegend, San Diego, CA, EUA). A placa foi protegida da luz com papel alumínio e armazenada em geladeira dentro de uma câmara úmida *overnight*. No dia seguinte foram lavadas com PBS e realizada a montagem da lâmina, utilizando 5 μL de Fluoromount-G com DAPI (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific). A fluorescência foi observada usando a objetiva de 60x em um microscópio confocal Zeiss.

4.14 Análise da expressão gênica por qPCR

As células KG-1a ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram tratadas por 12 horas com BT (10 $\mu\text{g/mL}$). Após o tratamento, o RNA total foi isolado das células KG1-a usando microcolunas de sílica - Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi analisado quanto à quantidade e pureza usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A transcrição reversa do RNA foi realizada usando um Superscript VILO™ Kit (Invitrogen Corporation; Waltham, MA, EUA). Para o estudo de expressão gênica por qPCR foi utilizada a placa de 96 poços TaqMan® array human cancer drug targets, Fast (ID RPRWENH, Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). As reações foram conduzidas em um sistema ABI ViiA7 (Applied Biosystems™). As condições do ciclo compreenderam 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C , 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C . A quantificação relativa (QR) da expressão de mRNA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) usando o software Gene Expression Suite™ (Applied Biosystems™) e as células tratadas com o controle negativo (0,2% DMSO) foram utilizadas como calibrador. As reações foram normalizadas através da média geométrica de QR dos genes de referência GAPDH, HPRT1 e GUSB. Todos os experimentos foram realizados em condições livres de

Dnase/Rnase. Os genes foram considerados regulados positivamente quando $QR \geq 2$, o que significa que a expressão gênica nas células tratadas com BT foi pelo menos duas vezes maior que nas células tratadas com o controle negativo. Da mesma forma, os genes foram considerados como regulados negativamente se $QR \leq 0,5$, o que significa que a expressão gênica em células tratadas com BT foi metade ou menos da metade do que em células tratadas com o controle negativo.

4.15 Ensaio *in vivo*

4.15.1 Ensaio de xenotransplante com camundongos imunodeficientes

Os testes para avaliação da atividade contra CTLs de LMA *in vivo* (modelo xenográfico) foram realizados utilizando camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdcg Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) oriundos do biotério da Fiocruz-Bahia (CEUA 016/2018). Os animais foram tratados com bursifano (25 mg/kg) um dia antes do transplante das células. Células KG-1a (10^6 células por camundongo) foram injetadas através da veia da cauda em um volume final de 0,1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). O tratamento com o BT (50 mg/kg) e o controle negativo (DMSO 5%) foi iniciado cinco semanas após o transplante e foi realizado por via intraperitoneal diariamente por duas semanas. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e o sangue, baço e medula óssea foram colhidas e analisadas quanto à presença de células humanas a partir da marcação com anticorpo anti-CD45-PE humano e anti-CD45-FITC de camundongo (Becton Dickinson) e analisadas em citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios serão realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cem mil eventos foram analisados em cada amostra e os detritos celulares foram omitidos dos resultados.

4.15.2 Avaliação toxicológica sistêmica

Para avaliar os efeitos toxicológicos, os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. Ao longo do período experimental, foram realizadas avaliações diárias

comportamentais a fim de qualificar possíveis efeitos tóxicos relacionados ao tratamento. O fígado, rins, pulmões e coração foram removidos, pesados e examinados quanto a sinais de lesões graves, alterações de cor e/ou hemorragia. Após análise macroscópica, os órgãos foram fixados em tampão de formalina a 4% e incluídos em parafina. A análise histopatológica dos órgãos foi realizada por um patologista através da microscopia óptica. As secções de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina para análise da arquitetura tecidual e alterações morfológicas. Os fígados e os rins foram analisados por uma coloração especial (PAS - ácido periódico-Schiff) para avaliar o acúmulo de glicogênio nos hepatócitos e membrana basal glomerular.

4.16 Combinação

4.16.1 Triagem dos compostos

Todos os tratamentos combinados da triagem dos compostos foram realizados usando a tecnologia de manuseio de líquidos Echo (Labcyte). O ensaio de triagem de compostos foi realizado em placas de fundo óptico preto de 384 poços (Nunc, Science Warehouse Limited). As células KG-1, KG-1a, Kasumi-1 e HL-60 foram semeadas a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células por poço. Foi testado a combinação do bitionol (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com 48 compostos (2 nM) que abrangem uma gama de diferentes classes de fármacos, a maioria das quais já é utilizada no tratamento de malignidades mielóides. Os compostos foram diluídos com DMSO (Merck, Poole, Reino Unido) e adicionados às células para gerar a concentração do composto desejada. Células tratadas com DMSO a 0,1% foram usadas como controle de veículo. Após a combinação dos compostos com o BT, as células foram incubadas por 72h e a toxicidade celular foi avaliada usando o CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega, Southampton, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. A unidade de fluorescência relativa (RFU) (Ex: 485 nm, Em: 520 nm) foi medida usando um leitor Synergy HTX Multi-Mode Micro-Plate (Biotek, VT, EUA). A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio luminescente CellTiter-Glo (Promega, Southampton, Reino Unido). Após o período de 72h de incubação, o meio de cultura celular de cada poço foi adicionado a um volume igual de reagente CellTiter-Glo. A placa foi centrifugada por 2 min para induzir a lise celular, seguida

por 20 min de incubação à temperatura ambiente e no escuro para estabilizar o sinal luminescente. A luminescência foi medida usando um leitor de microplacas Synergy HTX Multi-Mode (Biotek, Winooski, VT, EUA).

Uma segunda triagem foi realizada usando os 14 compostos que, quando combinados com o BT, apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular. Entre eles, o Venetoclax (VTX) foi o que apresentou melhor redução e foi utilizado nos experimentos seguintes.

4.16.2 Índice de combinação (IC)

As células KG-1, KG-1a, Kasumi-1 e HL-60 foram plaqueadas a uma densidade de $0,3 \times 10^6$ células por poço e tratadas com VTX (2, 10 e 50 nM), BT (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e suas combinações. As células foram então incubadas por 72 h, e após esse período, a viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio luminescente CellTiter-Glo como descrito anteriormente.

Para avaliar potenciais efeitos sinérgicos ou aditivos, usamos o software CompuSyn (versão 1.0; ComboSyn, Paramus, NJ, EUA). Isobogramas e gráficos de índice de combinação foram criados e os valores do índice de combinação foram calculados pelo método de Chou e Talalay. Valores $\text{CI} < 1$ indicam sinergia, valores $\text{CI} = 1$ indicam um efeito aditivo e $\text{CI} > 1$ indica um efeito antagônico.

4.16.3 Avaliação in vitro do padrão de morte celular apoptótica das combinações

A partir do CI, as concentrações de VTX (2 nM) e BT (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram escolhidas. Após 72 horas de tratamento, as células KG-1, KG-1a, Kasumi-1 e HL-60 foram centrifugadas, lavadas com salina e adicionado ao pellet celular 300 μL de tampão de ligação além de 4 μL de anexina V-FITC (BD Biosciences, Berkshire, Reino Unido) e 4 μL de iodeto de propídeo (IP, BD Biosciences, Berkshire, Reino Unido). As células foram incubadas em temperatura ambiente e no escuro por 20 min e após esse período, 330 μL de tampão de ligação 1x foram adicionados a cada amostra. A fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo.

4.17 Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. A distribuição dos dados (se gaussiana ou não) foi determinada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. A significância das diferenças nos resultados obtidos (controle negativo vs. tratamento), levando-se em conta todos os grupos de um dado experimento, foi estimada pelo teste de ANOVA, para dados com distribuição gaussiana, ou Kruskal- Wallis, para dados com distribuição não-gaussiana. A probabilidade das diferenças entre os resultados observados em diferentes grupos serem devido ao acaso foi avaliada por Student Newman-Keuls ou Bonferroni ou Tukey, para dados com distribuição gaussiana, ou teste de Dunn, quando não houve distribuição gaussiana dos dados. O cálculo da CI_{50} foi realizado a partir de uma curva sigmoide de concentração-resposta com base nos dados do ensaio de citotoxicidade. Os dados foram compilados e analisados utilizando o programa Prisma (GraphPad Software, Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 BT apresenta citotoxicidade frente diversas linhagens celulares

A citotoxicidade do BT foi avaliada em um painel com 28 linhagens de células tumorais (MCF-7, 4T1, MDA-MB-231, HCT116, DU 145, HepG2, B16-F10, A-375, HSC-3, CAL27, SCC-4, SCC-9, SCC25, OVCAR-3, PANC-1, A549, U-87 MG, HL-60, NB4, KG-1, KG-1a, MOLM-13, PL-21, THP-1, K-562, Kasumi-1, MV4-11 e Jurkat) e 03 de células não tumorais (MRC-5, PBMC e BJ), após 72 horas de incubação utilizando o ensaio de alamar blue para análise quantitativa da viabilidade e proliferação celular. Os resultados encontram-se na tabela 5. O BT apresentou valores de CI_{50} variando de 5,69 a 20,1 $\mu\text{g/mL}$ para HL-60 e DU 145, respectivamente. O valor de CI_{50} do BT para as células não tumorais foram de 17,11, 21,29 e 18,41 $\mu\text{g/mL}$ para as células MRC5, PBMC e BJ, respectivamente.

A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo e apresentou valores de CI_{50} variando entre 0,002 e 2,85 $\mu\text{g/mL}$ para MV4-11 e K-562, respectivamente. Já para as células não tumorais, os valores de CI_{50} foram de 10,72, 0,49 e 1,58 $\mu\text{g/mL}$ para as células MRC5, PBMC e BJ, respectivamente.

A linhagem celular KG-1a é descrita na literatura como uma linhagem que contém uma maior porcentagem de CTLs, por isso ela foi escolhida para seguir os próximos ensaios *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar o mecanismo de ação e o potencial antileucêmico do BT. As concentrações testadas foram escolhidas com base nos valores de CI_{50} .

Tabela 5 - Atividade citotóxica do BT em diferentes tipos histológicos

Linhagens	Tipo histológico	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
		BT	DOX
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	12,50	0,66
		9,31 - 16,78	0,43 - 1,04
4T1	Carcinoma de mama (triplo negativo) murino	16,79	0,83
		11,79 - 23,93	0,59 - 1,18

MDA-MB-231	Carcinoma de mama humana	11,61	0,29
		9,69 - 13,91	0,13 - 0,69
HCT116	Carcinoma de cólon humano	6,12	0,04
		4,41 - 8,49	0,20 - 0,070
DU 145	Câncer de próstata humano	20,10	0,18
		15,38 - 26,25	0,13 - 0,26
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	11,86	0,14
		7,57 - 18,58	0,08 - 0,49
B16-F10	Melanoma murino	10,14	0,05
		7,75 - 13,28	0,03 - 0,08
A-375	Melanoma humano	9,82	0,13
		8,31 - 11,61	0,11 - 0,16
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano	10,97	0,23
		7,73 - 15,55	0,17 - 0,32
CAL27	Carcinoma oral de células escamosas humano	12,32	0,15
		7,77 - 19,53	0,07 - 0,30
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosas humano	9,69	0,14
		6,58 - 14,27	0,13 - 0,16
SCC-9	Carcinoma oral de células escamosas humano	> 25	0,62
			0,35 - 1,09
SCC25	Carcinoma oral de células escamosas humano	> 25	0,71
			0,39 - 1,29
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário	8,90	0,83
		6,50 - 12,18	0,51 - 1,38
PANC-1	Carcinoma pancreático	6,05	0,76
		4,81 - 7,59	0,50 - 1,15
A549	Carcinoma pulmonar	12,22	1,22
		8,47 - 17,63	0,99 - 1,49
U-87 MG	Glioblastoma humano	13,90	0,20
		11,37 - 16,99	0,13 - 0,31
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humana	5,69	0,16
		4,69 - 6,91	0,13 - 0,21
NB4	Leucemia promielocítica aguda humana	9,64	0,21
		4,50 - 20,64	0,06 - 0,69

KG-1	Leucemia mielóide aguda humana	7,30	0,16
		8,09 - 10,45	0,11 - 0,23
KG-1a	Leucemia mielóide aguda humana	7,08	0,19
		3,52 - 14,25	0,08 - 0,45
MOLM-13	Leucemia mielóide aguda humana	9,61	0,01
		6,19 - 14,91	0,00 - 0,01
PL-21	Leucemia mielóide aguda humana	6,27	0,02
		4,43 - 8,87	0,02 - 0,03
THP-1	Leucemia monocítica aguda	10,34	0,11
		8,23 - 12,99	0,07 - 0,19
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana	11,59	2,85
		8,81 - 15,24	2,01 - 4,03
Kasumi-1	Leucemia mieloblástica aguda humana	6,70	1,92
		4,79 - 9,36	1,24 - 2,98
MV4-11	Leucemia mielomonocítica bifenotípica B humana	5,96	0,01
		2,85 - 12,45	0,01 - 0,01
Jurkat	Leucemia linfóide de células T humana	6,79	0,37
		5,17 - 8,918	0,30 - 0,46
Células não cancerosas			
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano	17,11	10,72
		13,54 - 21,63	0,45 - 1,15
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico	21,29	0,49
		19,31 - 23,48	0,29 - 0,82
BJ	Fibroblasto de prepúcio humano	18,41	1,58
		14,10 - 24,05	0,51 - 4,90

A tabela apresenta os valores de CI_{50} (concentração inibitória média) e o intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de tratamento, obtidos por regressão não-linear. Doxorubicina (Dox) foi usada como controle positivo. N.d. Não determinado.

Fonte: Autora

A avaliação da viabilidade celular foi realizada utilizando o método de exclusão por azul de tripan. O tratamento das células KG-1a com BT durante 12, 24, 48 e 72 horas foi capaz de reduzir significativamente o número de células viáveis tempo e concentração dependente quando comparado ao controle negativo (DMSO 0,2%), apresentando melhor

resultado no tempo de 72 horas, conforme demonstrado na figura 5. Essa redução na viabilidade celular é uma característica comum de compostos com propriedades citotóxicas.

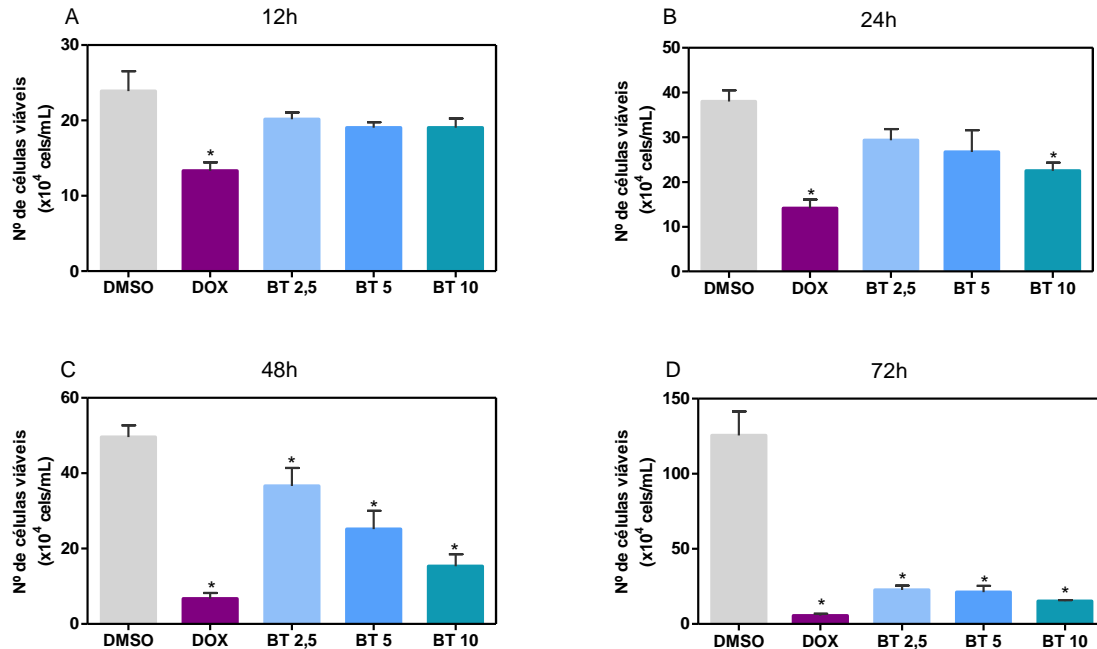


Figura 5 - Efeito do BT sobre a viabilidade de células KG-1a determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam após 12h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste, DMSO 0,2%. Doxorrubicina (DOX) 1 μ M foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por test-t.

Fonte: Autora

5.2 BT é capaz de eliminar células-tronco leucêmicas de LMA

A identificação de células-tronco leucêmicas foi feita utilizando anticorpos anti-CD13 PE-CF594, anti-CD33 BV510, antiCD34 PE, anti-CD38 BV421 e anti-CD123 BV605 e para a quantificação da viabilidade foi utilizado Anexina V-FITC. CD13 e CD33 são marcadores de células mieloides, enquanto CD34, CD38 e CD123 são de CTLs. Os resultados (figura 6) demonstram diminuição significativa da população de CTLs que expressam CD33 e CD38 tratadas com BT utilizando a maior concentração e de CD13, CD34 e CD123 tratadas com BT em todas as concentrações no período de 48h.

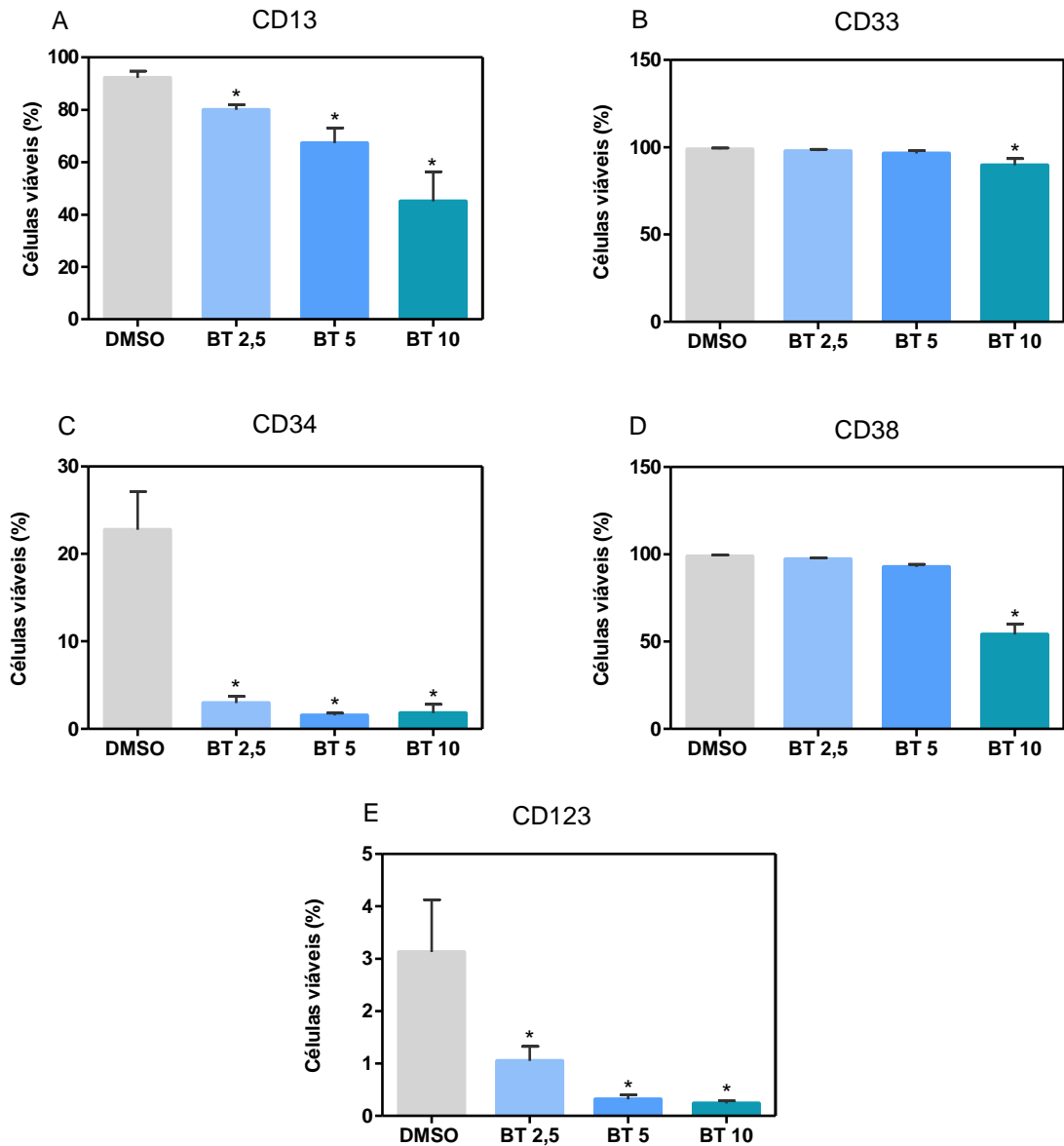


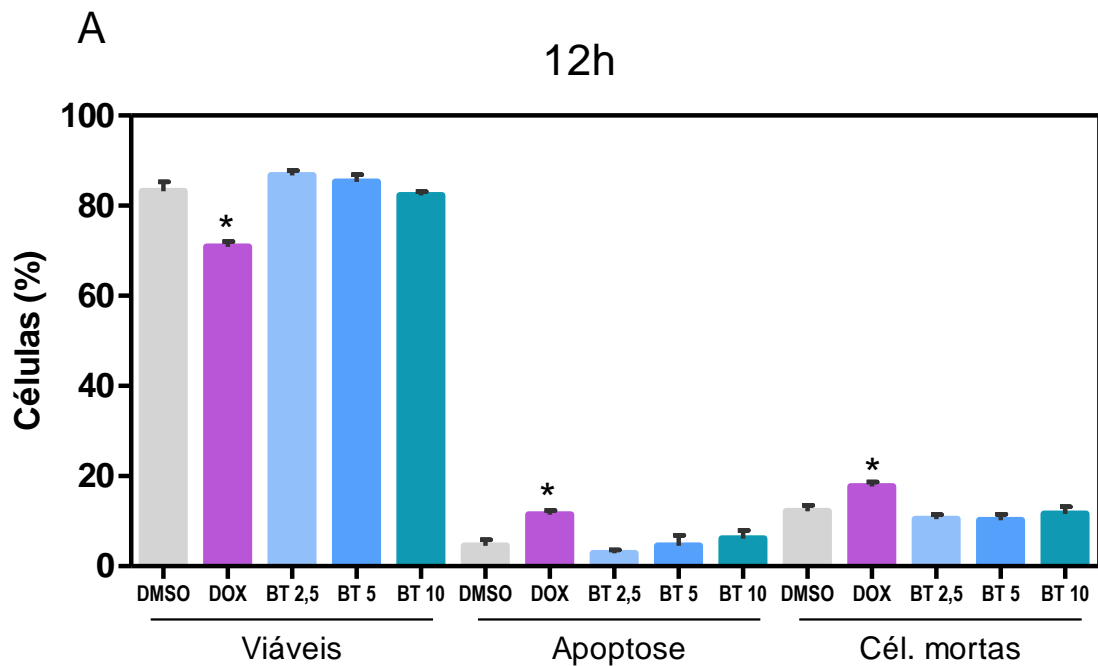
Figura 6 - Efeito do BT sobre a viabilidade de células-tronco leucêmicas em células KG-1a após 48h de tratamento determinada por citometria de fluxo. A-E Marcação para os anticorpos (A) anti-CD13 PECF594, (B) anti-CD33 BV510, (C) anti-CD34 PE, (D) anti-CD38 BV421 e (E) anti-CD123 BV605. O DMSO (0,2%), usado para diluir o composto testado, foi utilizado como controle negativo. 30.000 eventos foram analisados por amostra e os detritos celulares foram omitidos das análises. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. *p < 0,05 quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por test-t.

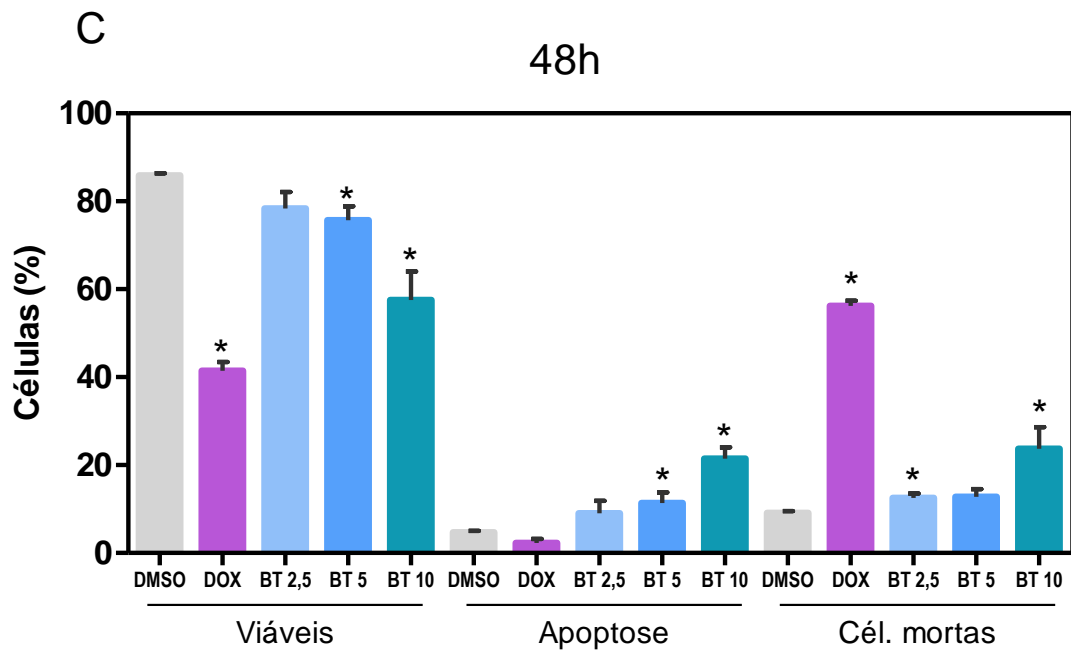
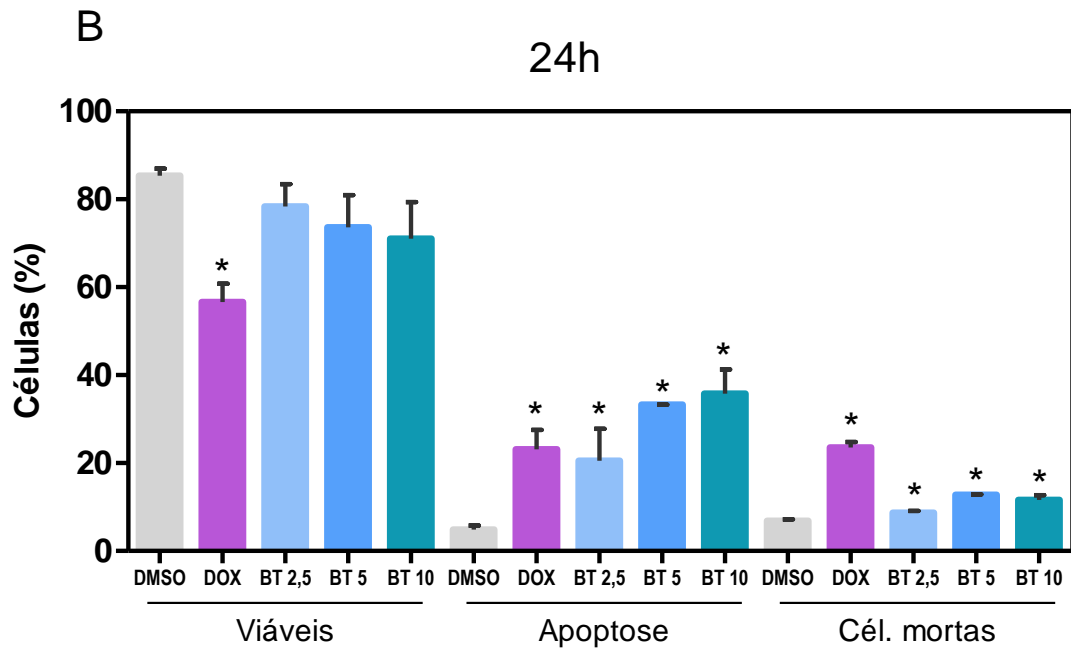
Fonte: Autora

5.3 BT induz a morte celular apoptótica mediada por caspases em células KG-1a

Foi realizado o ensaio de marcação com YO-PRO e IP a fim de avaliar se o BT induz morte celular por apoptose em células KG-1a. As células no estado inicial da apoptose são permeáveis ao YO-PRO, mas permanecem impermeáveis a marcadores nucleares maiores, como o IP. O IP se liga ao DNA e pode atravessar apenas as membranas das células necróticas e não das apoptóticas. Nenhum dos dois corantes é capaz de penetrar as células viáveis. Na figura 7, é possível observar um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas a partir do período de 24 horas de tratamento com todas as concentrações do composto, sendo mais acentuado quando utilizado a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BT. Também podemos observar um aumento nas células em necrose no período de 72 horas. A figura 8 mostra os dotplots representativos da marcação com YO-PRO + IP nos diferentes tempos testados.

A morte celular por apoptose também foi analisada utilizando Anexina V + IP nas linhagens KG-1, KG-1a, Kasumi-1 e HL-60 (figura 9). Quando a célula entra em processo de apoptose, ocorre a externalização da fosfatidilserina e a Anexina V consegue se ligar a ela. Os resultados indicam um efeito do composto na morte por apoptose concentração dependente.





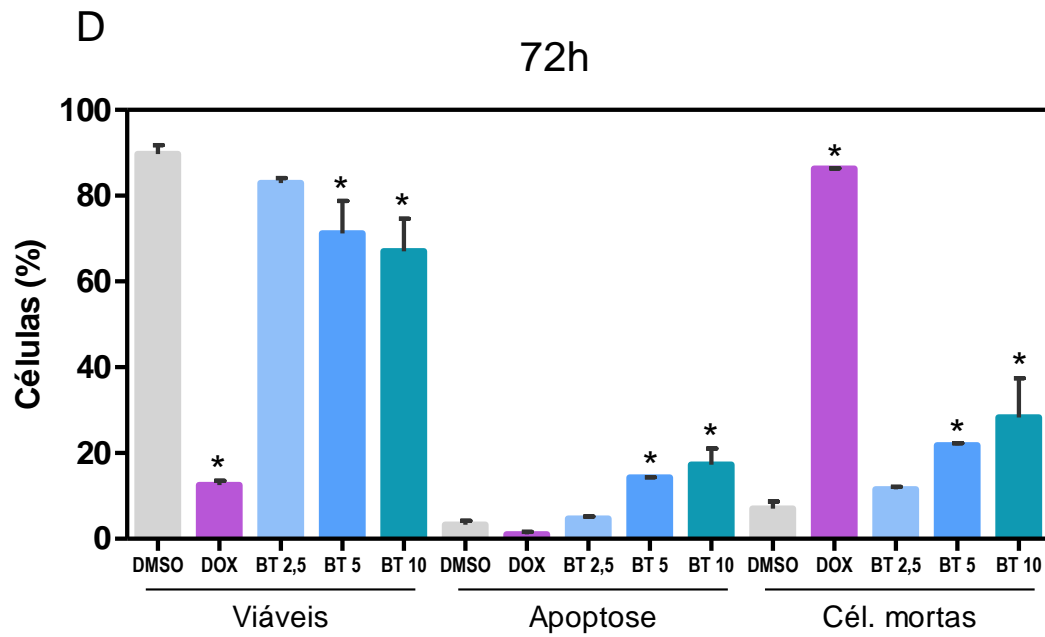


Figura 7 - Efeito do BT sobre a morte de células KG-1a realizado por YO-PRO + IP após (A) 12h, (B) 24h, (C) 48h e (D) 72h de incubação. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Doxorubicina (DOX) 1 μ M foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem à % de células viáveis de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por test-t.

Fonte:
Autora

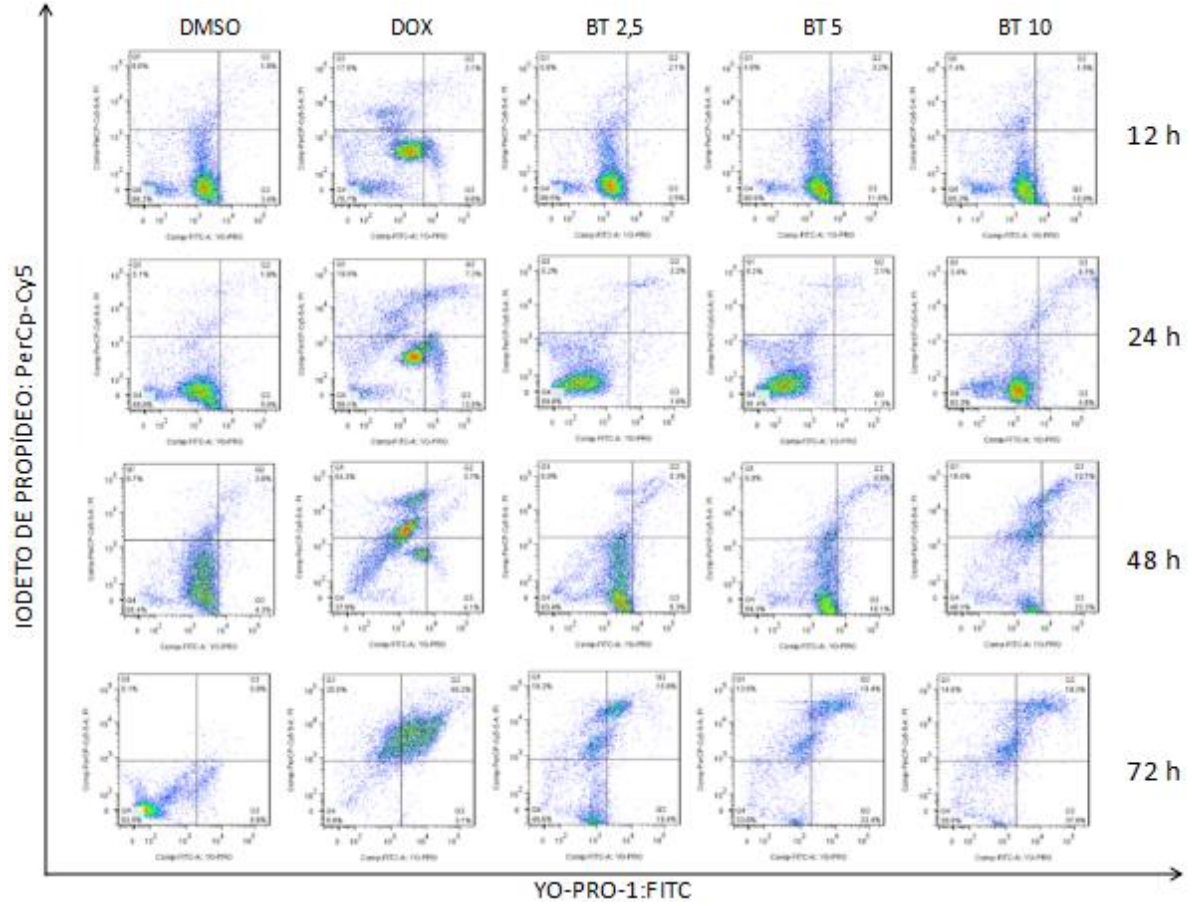


Figura 8 - Dotplots representativos da marcação com YO-PRO + IP nos diferentes tempos testados. O DMSO 0,2%, foi utilizado como controle negativo. Doxorubicina (DOX) 1 μ M foi utilizada como controle positivo.
Fonte: Autora

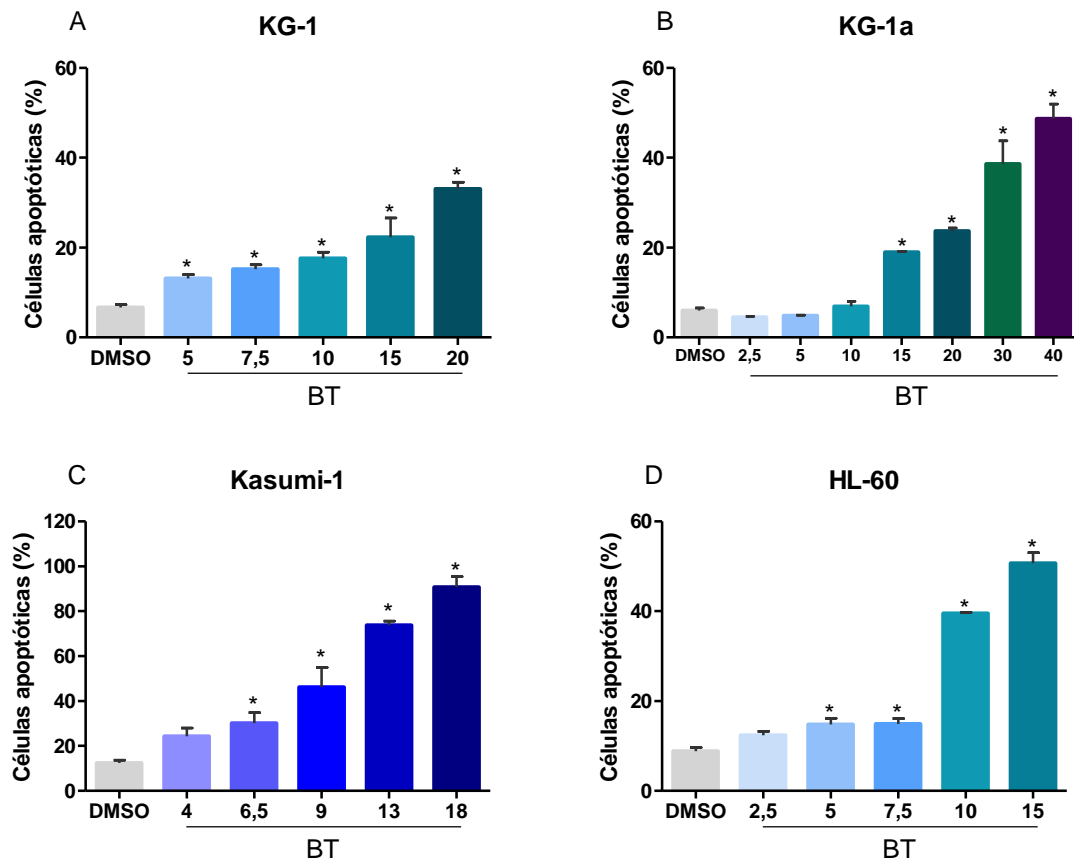


Figura 9 - Efeito do BT sobre a morte das células (A) KG-1, (B) KG-1a, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 realizado por Anexina V + IP após 72h de incubação. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Doxorrubicina (DOX) 1 μ M foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem à % de células viáveis de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por test-t.

Fonte: Autora

Para melhor compreensão dos mecanismos de apoptose induzidos pelo tratamento com BT em células KG-1a e se a ativação de caspase está envolvida nesse mecanismo, realizamos a quantificação da caspase-3 ativa (Anti-Active caspase-3) e de PARP clivado (Anti-Cleaved PARP (Asp214)) por meio de citometria de fluxo após 24 horas de incubação. A caspase-3 é uma caspase efetora que é ativada para desencadear o processo de apoptose. A proteína PARP é uma poli (ADP-ribose) polimerase nuclear envolvida no reparo do DNA em resposta ao estresse ambiental. Ela pode ser clivada pelas caspases, se tornando inativa, e é um dos principais alvos de clivagem da caspase-3. A clivagem da PARP serve como um marcador de células em apoptose.

O tratamento com BT na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ aumenta significativamente os níveis de caspase-3 ativa e de PARP clivado após 24h de tratamento (figura 10). Também podemos observar o aumento de PARP-1 no blot da figura 11, onde há um aumento da banda tratada com BT em comparação com o controle negativo (não tratado).

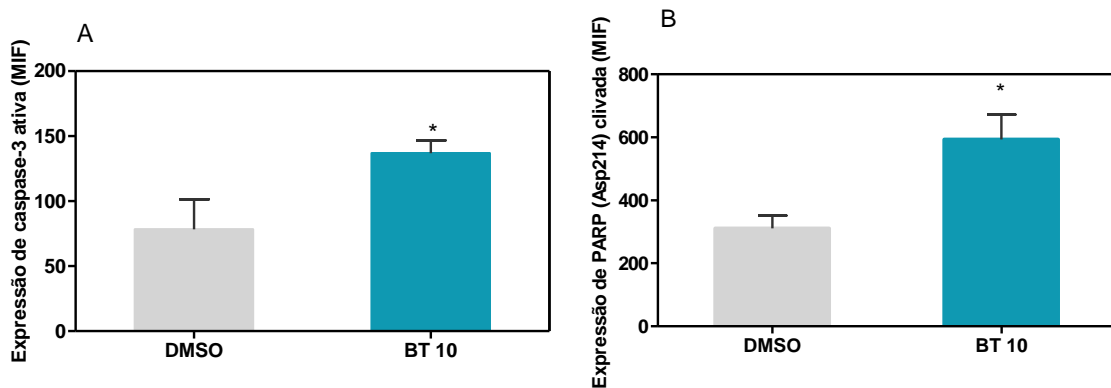


Figura 10 - Ativação de caspase-3 e clivagem de PARP-1 após o tratamento de células KG-1a com BT 10 $\mu\text{g/mL}$. (A) Caspase-3 ativa e (B) PARP-1 clivada determinados por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. O DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por correlação estatística seguida por test-t.

Fonte: Autora

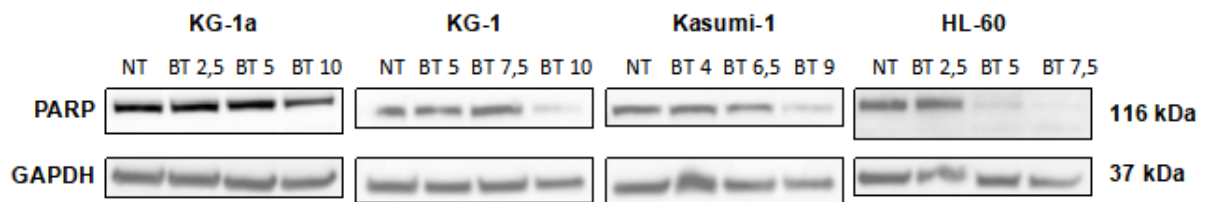


Figura 11 - Western blot de PARP após o tratamento de células KG-1a, KG-1, Kasumi-1 e HL-60 com BT 10 $\mu\text{g/mL}$ após 72 h de tratamento. O DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo.

Fonte: Autora

A determinação da despolarização mitocondrial e consequente alteração do potencial transmembrânico mitocondrial foi medida pela incorporação da rodamina 123 usando citometria de fluxo após 24 h de tratamento. Podemos observar que houve aumento significativo da despolarização mitocondrial em relação ao controle negativo em células KG-1a tratadas com a maior concentração de BT (figura 12).

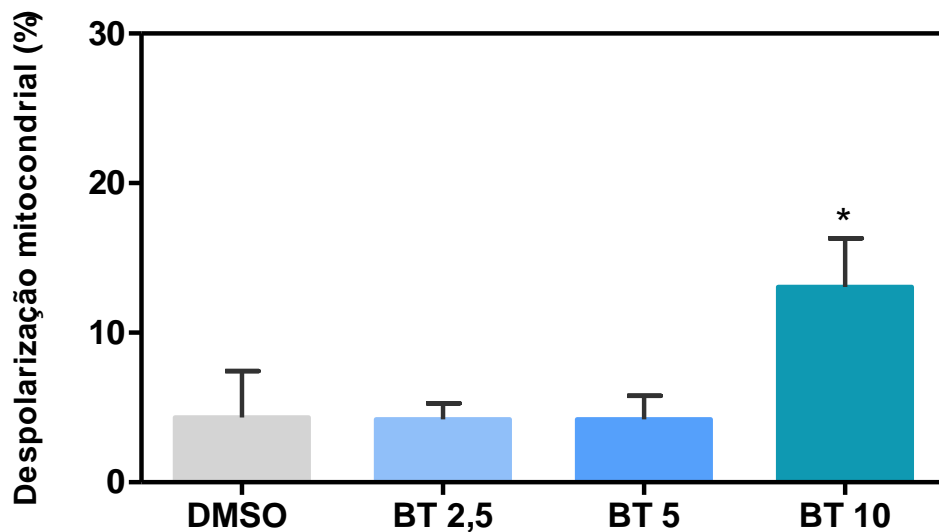


Figura 12 - Efeito do BT na despolarização da membrana mitocondrial após 24h de tratamento determinada por citometria de fluxo. O DMSO 0,2% foi utilizado como controle. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student-Newman-Keuls.

Fonte: Autora

Também foi feita a investigação do papel da proteína bad na morte celular apoptótica induzida por BT. O bad é um membro pró-apoptótico da família do gene Bcl-2 e está envolvido no início do processo de apoptose. Para estudar a importância do gene *BAD* na morte celular apoptótica induzida por BT, utilizamos as linhagens celulares BAD KO SV40 MEF (fibroblastos embrionários de camundongo imortalizados com o gene *BAD* knockout) e sua linhagem parental WT SV40 MEF (fibroblastos embrionários de camundongo selvagens imortalizados). Na figura 13a, podemos observar que o efeito do BT sobre a porcentagem de sobrevivência celular das células BAD-MEF foi menor em comparação as células WT-MEF, sugerindo que o gene *BAD* não é essencial para a citotoxicidade induzida pelo BT.

Além disso, realizamos uma análise do perfil de morte celular induzido pelo BT nas células WT SV40 MEF e BAD KO SV40 MEF utilizando anexina V e IP por citometria de fluxo (figura 13b). Observamos que a morte celular induzida por bitionol parece ser independente de *BAD*, uma vez que esta molécula exibe citotoxicidade semelhante às células WT-MEF e BAD-MEF. A figura 14 mostra os dotplots representativos da marcação com

Anexina-V/IP nas células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF após o tratamento com BT.

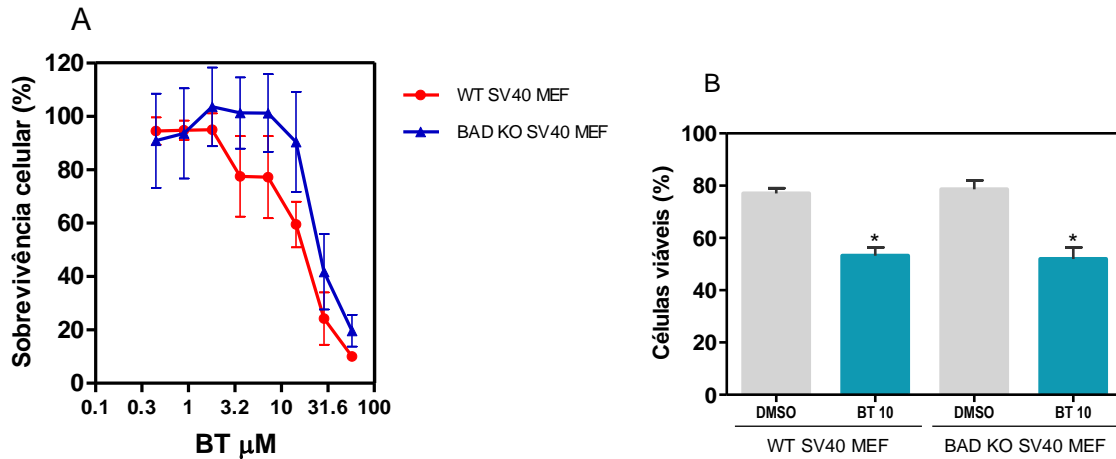


Figura 13 - Efeito do BT na (A) sobrevivência de células WT-MEF e BAD-MEF pelo método alamar blue após 72h de incubação e sobre a (B) morte de células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF realizados por Anexina V/IP após 48h de incubação. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Os valores correspondem à % de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por test-t.

Fonte: Autora

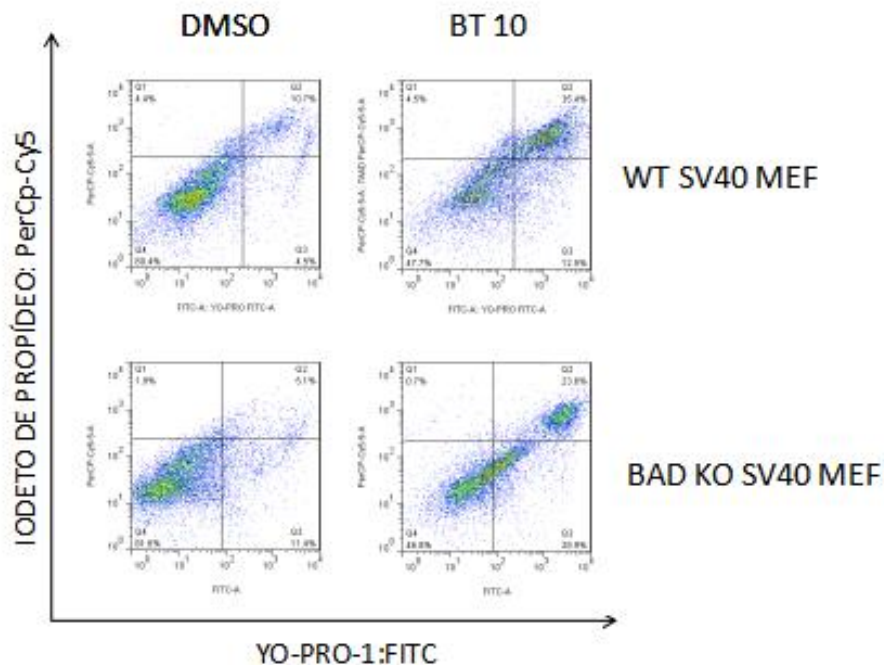


Figura 14 - Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP nas células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF após o tratamento com BT. O DMSO 0,2%, foi utilizado como controle negativo.

Fonte: Autora

5.4 BT induz estresse oxidativo em células KG-1a

A quantificação das espécies reativas de oxigênio intracelular foi feita utilizando o indicador de superóxido mitocondrial, MitoSOX™, por citometria de fluxo nos tempos de 1h e 24h. Podemos observar na figura 15 que houve um aumento significativo nos níveis de ERO em ambos os tempos testados após o tratamento com o BT nas diferentes concentrações, sendo esse aumento mais expressivo no período de 24h.

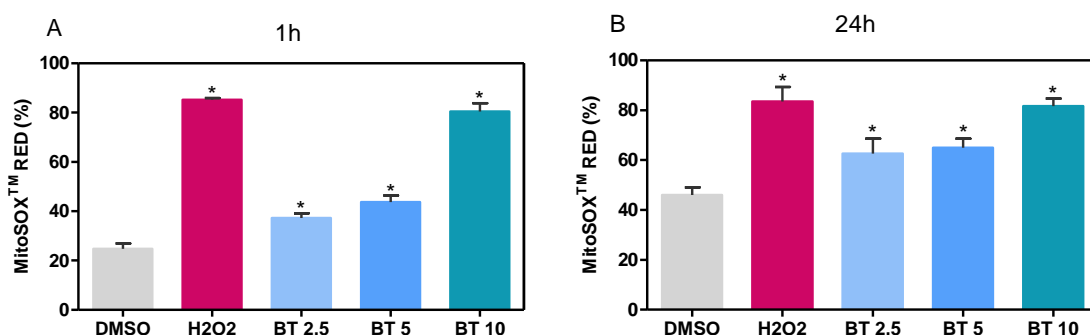


Figura 15 - Efeito do BT nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) das células KG-1a após 1 e 24 h de incubação determinada por citometria de fluxo. A-B. Quantificação do ERO com o uso da coloração MitoSOX™ (RED). O DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por test-t.

Fonte: Autora

A morte celular por ferroptose mediada por estresse oxidativo foi investigada na citotoxicidade induzida por BT. Em particular, o inibidor seletivo da ferroptose, ferrostatina-1, preveniu parcialmente a morte celular induzida por BT, indicando que este composto pode induzir a morte celular por ferroptose (Figura 16).

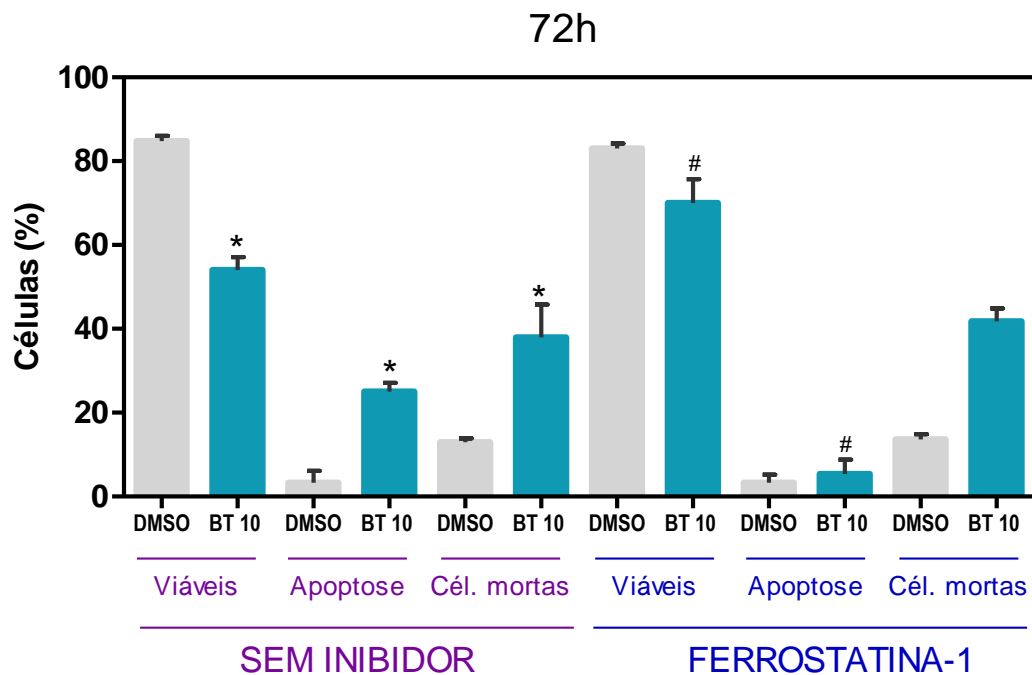


Figura 16 - Efeito do inibidor seletivo da ferroptose ferrostatina-1 na morte celular induzida por bitionol em células KG-1a após 72h de tratamento determinada por citometria de fluxo. O veículo (0,2% DMSO) foi usado como controle negativo (CTL) e a doxorubicina (DOX, 1 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com o controle pelo teste-t de Student. # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor pelo teste-t de Student.

Fonte: Autora

5.5 BT causa fragmentação do DNA em células KG-1a

A distribuição do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo com o intuito de mensurar a fragmentação internucleossomal do DNA e diferenciar as fases do ciclo celular em células KG-1a tratadas com BT nos períodos de 12, 24, 48 e 72 horas. A tabela 6 mostra os resultados encontrados. Consideramos como DNA sub-diplóide (sub-G0/G1) todo o DNA fragmentado.

O BT induziu fragmentação do DNA internucleossomal observado pelo aumento do número de células em sub-G0/G1 em todas as concentrações, a partir de 12h de tratamento, resultando em uma conseqüente diminuição no número de células nas outras fases do ciclo celular. Para a concentração mais alta testada de BT (10 μ g/mL), observamos um aumento no número de células com fragmentação internucleossomal em relação ao controle negativo de

10,9% para 26,11% após 12 horas de tratamento, de 10,48% para 46,21% após 24 horas, de 14,57% para 57,02% após 48 horas e de 13,46% para 80,75% após 72 horas de tratamento. A doxorubicina, utilizada como controle positivo, também induziu parada do ciclo celular na fase em sub-G₀/G₁ de modo tempo dependente.

Tabela 6 - Distribuição do conteúdo de DNA em células KG-1a tratadas com BT.

Tratamento	Distribuição do Conteúdo de DNA (%)			
	Sub G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
12 h				
DMSO 0,2%	10,90 ± 1,79	37,95 ± 4,18	14,56 ± 0,81	12,48 ± 1,71
Dox 0,5	24,16 ± 3,53*	24,77 ± 3,60	13,28 ± 1,40	20,32 ± 3,48*
BT 2,5	19,01 ± 1,18*	36,68 ± 3,42	13,04 ± 1,05	10,33 ± 1,37
BT 5	21,27 ± 2,15*	35,71 ± 6,18	6,02 ± 1,24*	6,80 ± 1,15*
BT 10	26,11 ± 2,95*	28,34 ± 3,83	7,16 ± 0,74*	4,98 ± 1,17*
24 h				
DMSO 0,2%	10,48 ± 3,24	47,61 ± 6,36	13,26 ± 0,41	12,16 ± 1,70
Dox 0,5	44,57 ± 12,95*	19,17 ± 3,16*	5,59 ± 1,24*	7,57 ± 2,65
BT 2,5	19,16 ± 3,83	43,80 ± 4,91	9,38 ± 1,71	8,24 ± 1,17
BT 5	22,85 ± 1,13*	40,83 ± 4,17	8,99 ± 1,46*	6,92 ± 1,63
BT 10	33,73 ± 2,97*	32,04 ± 3,81	6,73 ± 1,02*	3,36 ± 0,68*
48 h				

DMSO 0,2%	14,57 ± 2,85	46,54 ± 3,10	14,02 ± 0,94	12,90 ± 0,66
Dox 0,5	76,30 ± 3,13*	8,18 ± 2,25*	1,52 ± 0,23*	3,13 ± 1,19*
BT 2,5	22,54 ± 2,66	56,00 ± 2,61	7,20 ± 1,62*	8,40 ± 1,99
BT 5	42,89 ± 11,87	38,47 ± 11,00	2,39 ± 0,75*	5,86 ± 2,57*
BT 10	57,02 ± 6,92*	13,44 ± 2,29*	1,35 ± 0,46*	1,94 ± 1,10*
72 h				
DMSO 0,2%	13,46 ± 1,08	49,25 ± 1,69	13,19 ± 0,84	14,82 ± 1,70
Dox 0,5	89,59 ± 2,74*	1,71 ± 0,58*	1,03 ± 0,29*	0,92 ± 0,27*
BT 2,5	38,65 ± 6,86*	43,01 ± 2,31	4,85 ± 1,25*	6,80 ± 0,72*
BT 5	61,97 ± 8,53*	12,04 ± 3,74*	3,38 ± 1,19*	5,05 ± 1,44*
BT 10	80,75 ± 6,55*	5,16 ± 3,49*	0,41 ± 0,23*	2,81 ± 1,45*

Os valores correspondentes a média ± E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. DMSO 0,2% foram utilizados como controle negativo. A doxorubicina (1 µM) foi usada como controle positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. *p < 0,05 quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por test-t.

Fonte: Autora

5.6 BT inibe a via NF-κB nas células KG-1a

A subunidade p65 é uma componente do fator de transcrição NF-κB, que forma heterodímeros com outras subunidades, como p50 ou p52. A fosforilação da p65 resulta na translocação do complexo para o núcleo, onde ativa a transcrição de vários genes alvos. A figura 17 mostra a marcação de células KG-1a por citometria de fluxo utilizando anticorpo monoclonal específico para a subunidade p65 de NF-κB fosforilada em serina 529 e 536. Observou-se uma redução significativa na expressão de NF-κB p65 (pS529) após o tratamento com BT em comparação com o controle negativo. Adicionalmente, a redução NF-κB fosforilada em serina 536 foi observada no blot tratado com BT (figura 18). Em conjunto

com os resultados da citometria de fluxo, sugerem uma possível inibição da ativação da via NF- κ B pelo composto.

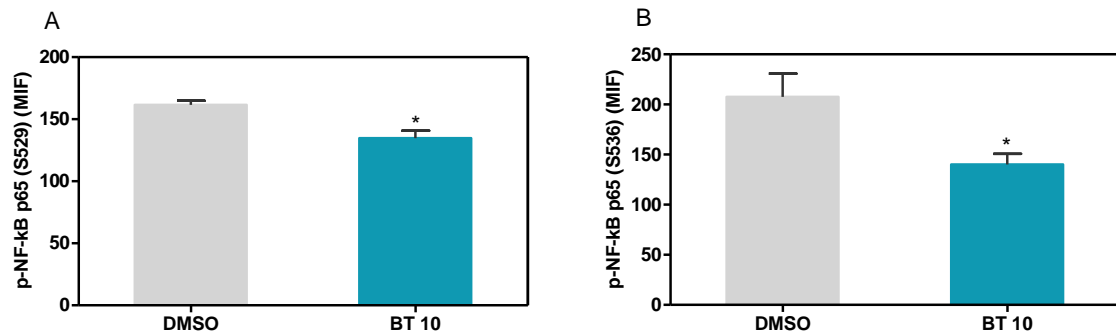


Figura 17 - Expressão de NF- κ B em células KG-1a após o tratamento com BT por 24h. Expressão de NF- κ B (A) pS529 e (B) pS536 determinada por citometria de fluxo. (C) Imagens de western blot. O DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por correlação estatística seguida por test-t.

Fonte: Autora

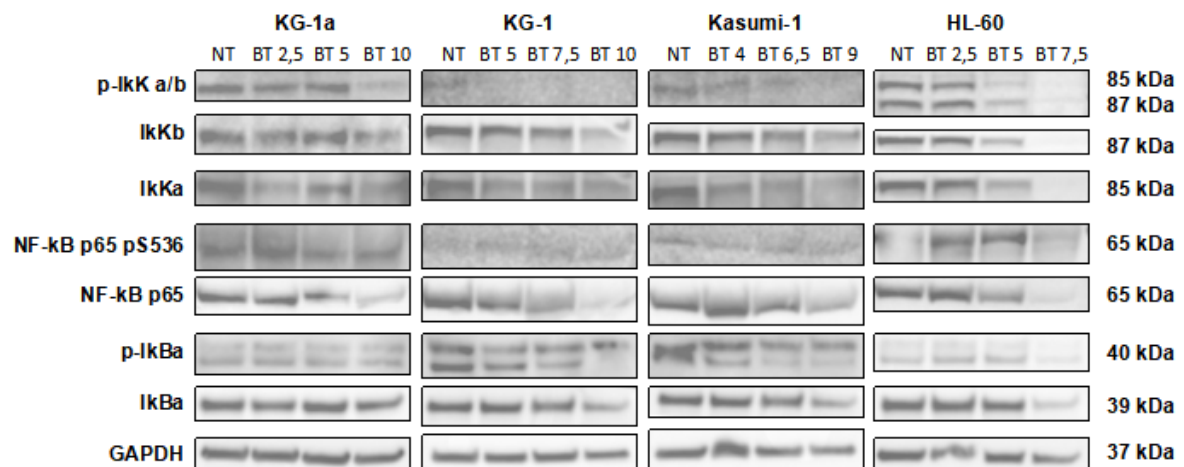


Figura 18 - Western blot de fosfo-IKK α/β (Ser176/180), IKK α , IKK β , NF- κ B p65, fosfo-NF- κ B p65 (Ser536), fosfo-I κ B α (Ser32) e I κ B α de células KG-1a, KG-1, Kasumi-1 e HL-60 após 72 h de tratamento com BT.

Fonte: Autora

Paralelamente, realizamos também a microscopia confocal para analisar a influência do tratamento com BT na via NF- κ B em células KG-1a utilizando o anticorpo anti-NF- κ B p65 PE. Na figura 19, é possível notar uma redução na ativação de NF- κ B após o tratamento com BT por 24 horas. Isso é evidenciado pela maior concentração de NF- κ B no citoplasma e

uma menor marcação de NF- κ B no núcleo da célula em comparação com o grupo de controle tratado com DMSO 0,2%.

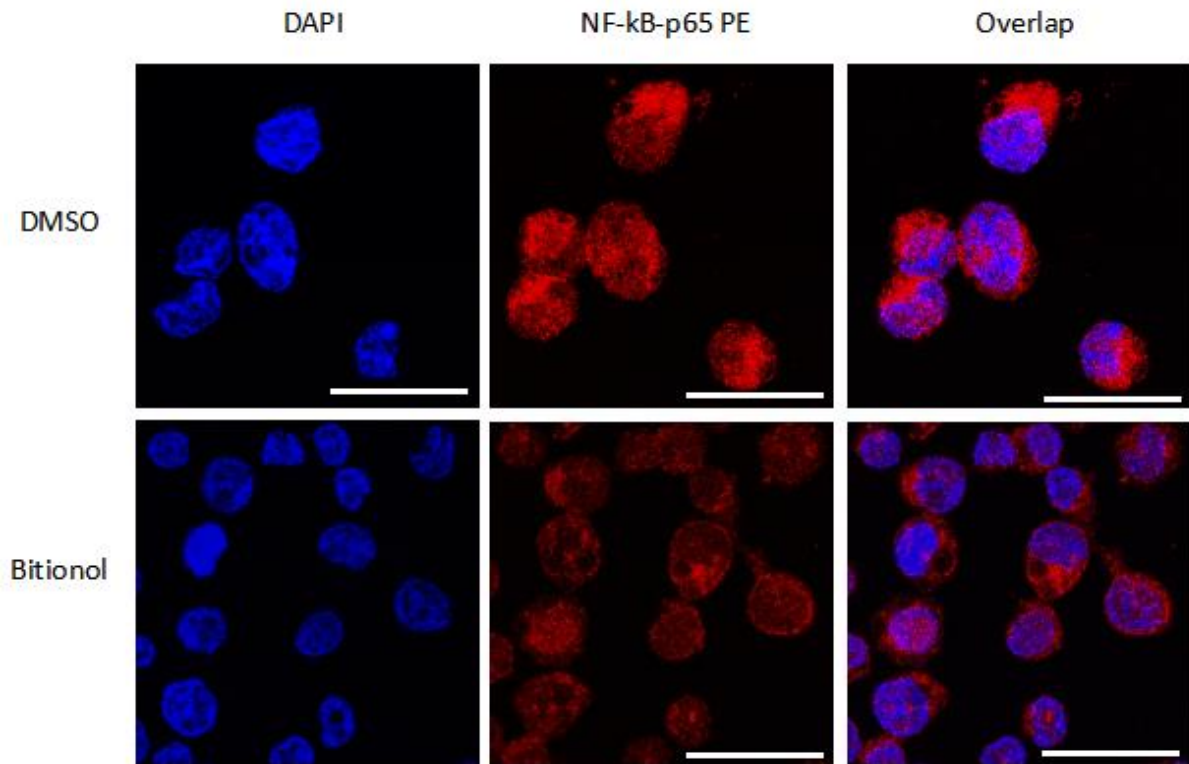


Figura 19 - Microscopia Confocal de células KG-1a marcadas com anticorpo anti-NF- κ B p65 PE (vermelho) e DAPI (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific) (azul) após 24 h de tratamento. Imagem obtida através do microscópio confocal Zeiss na objetiva de 60x.

Fonte: Autora

5.7 BT afeta a regulação de diversos genes

O efeito do BT sobre a expressão de 96 genes envolvidos em diferentes mecanismos celulares, incluindo proliferação celular, ciclo celular, apoptose, estresse oxidativo, metástase e angiogênese, foi detectado após 12 h de incubação em células KG-1a por qPCR array. Um total de 11 genes tiveram a expressão aumentada e 3 genes tiveram a expressão reduzida após o tratamento (figura 20). Entre eles, os genes RELB (QR: 4,05), STAT3 (QR: 2,04), PIK3CA (QR: 2,40), FOXO1 (QR: 2,19), SMAD2 (QR: 3,35), TGFB2 (QR: 2,43), PPARG (QR: 2,22), PPARG (QR: 5,46), MAP1LC3B (QR: 5,97), VIM (QR: 2,18) e ZEB2 (QR: 2,06) estavam aumentados após o tratamento, enquanto os genes WNT10B (QR: 0,38), JAG2 (QR: 0,00) e TWIST1 (QR: 0,29) tiveram sua expressão reduzida. A expressão reduzida dos genes

WNT10B e TWIST1 sugerem que o BT pode interferir na sinalização celular Wnt e na motilidade celular, respectivamente.

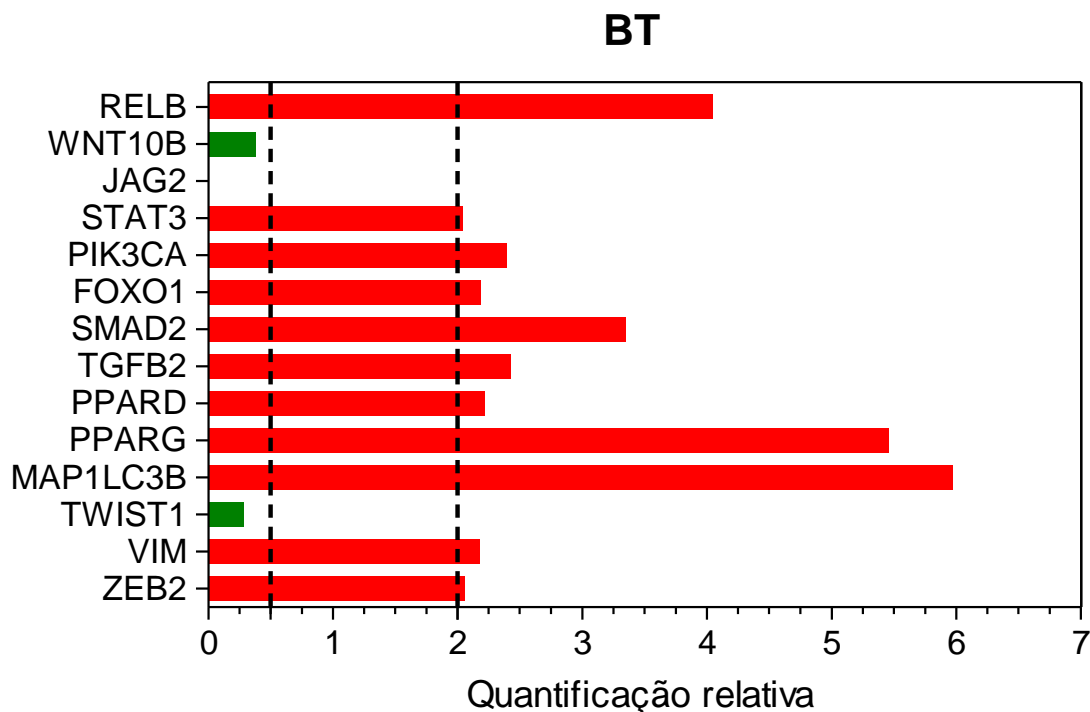


Figura 20 - Análise de qPCR para vários genes em células KG-1a após 12 h de tratamento com BT 10 µg/mL. Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo - DMSO 0,2%). Os genes foram considerados regulados positivamente se $QR \geq 2$ e foram considerados regulados negativamente se $QR \leq 0,5$.

Fonte: Autora

5.8 BT inibi o desenvolvimento *in vivo* de células KG-1a

A atividade antileucêmica *in vivo* do BT foi investigada em camundongos NSG xenotransplantados com células de LMA, KG-1a. O tratamento com o BT foi capaz de reduzir significativamente o crescimento leucêmico *in vivo* (Figura 21). Anticorpos hCD45 e mCD45 foram usados para quantificar blastos leucêmicos humanos e leucócitos de camundongo, respectivamente. O número de células marcadas com CD45 humano diminuiu significativamente, indicando uma redução das células leucêmicas presentes no baço, na medula óssea e no sangue dos camundongos quando comparado ao grupo controle negativo. Já em relação as células marcadas com CD45 murino, houve uma redução no número de

células positivas para o mCD45 na medula óssea, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa no baço ou no sangue. Esses dados indicam ação seletiva do BT na eliminação dos blastos leucêmicos.

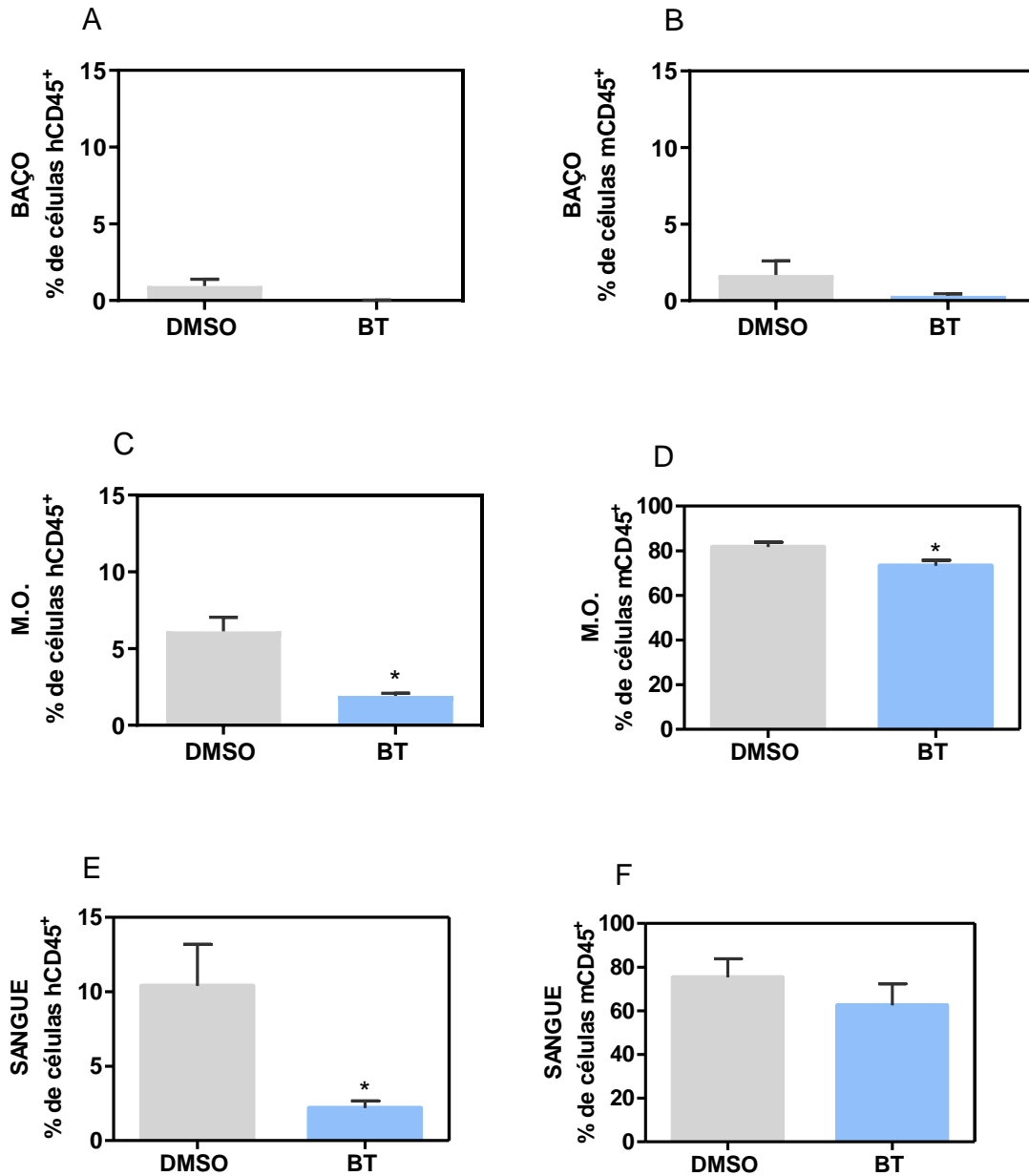


Figura 21 - Efeito in vivo do BT sobre células KG-1a inoculadas em camundongos NSG. As amostras foram marcadas com anticorpo anti-CD45-PE humano e anti-CD45-FITC de camundongo. As figuras A e B mostram as marcações dos anticorpos anti-CD45 humano e de camundongo na medula óssea dos animais. A figura C e D mostram as marcações dos anticorpos anti-CD45 humano e de camundongo no sangue, enquanto que as figuras E e F mostram as marcações dos anticorpos anti-CD45 humano e de camundongo no baço. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por correlação estatística seguida por test-t.

Fonte: Autora

Em relação aos aspectos toxicológicos, não foi detectada alteração significativa no peso corporal (tabela 7) ou no peso dos órgãos (tabela 8).

Tabela 7 - Efeito do BT no peso e sobrevivência dos camundongos NSG inoculados com células KG1a.

Média de peso dos animais (g)		
Grupos	DMSO 5%	BT 50 mg/kg
Início	22,00 ± 0,52	25,00 ± 0,89
Fim	20,68 ± 1,00	22,48 ± 1,31
Sobrevivência	6/6	6/6

O DMSO 5% usado para diluir o composto foi utilizado como controle negativo. Os dados são apresentados médias ± E.P.M. *p < 0,05 quando comparado ao grupo controle negativo por correlação estatística seguida de teste-t.

Fonte: Autora

Tabela 8 - Efeito do BT no peso dos órgãos dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a.

Média de peso (g/100g de massa corpórea)		
Órgãos	DMSO 5%	BT 50 mg/kg
Baço	0,20 ± 0,15	0,06 ± 0,01
Rins	0,25 ± 0,02	0,38 ± 0,02*
Coração	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Pulmão	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Fígado	1,06 ± 0,08	1,29 ± 0,07

O DMSO 5% usado para diluir o composto foi utilizado como controle negativo. Os dados são apresentados médias ± E.P.M. *p < 0,05 quando comparado ao grupo controle negativo por correlação estatística seguida de teste-t.

Fonte: Autora

A análise histológica dos órgãos foi realizada por meio de microscopia óptica e as alterações histopatológicas foram categorizadas em leves, moderadas ou graves. A arquitetura

renal foi preservada nos animais dos grupos controle negativo e BT. Dentre as alterações histológicas observadas no grupo tratado com BT, destacam-se a hiperemia vascular, que variou de moderada a grave, e áreas pontuais de infiltração de polimorfonucleares, necrose de coagulação dos túbulos do córtex renal e fibrose. Além disso, foi observada diminuição do espaço de Bowman, causada por leve hialinização glomerular, nos rins dos animais. Os pulmões dos animais tratados com BT apresentavam arquitetura parcialmente preservada, principalmente devido ao espessamento dos septos alveolares e atelectasias. A hiperemia vascular variou de leve a grave, e áreas focais de hemorragia e infiltrado de células polimorfonucleares foram observadas nos pulmões de todos os grupos experimentais. A arquitetura do parênquima e do sistema porta hepático foi parcialmente preservada nos animais tratados com controle negativo e BT. Dentre as alterações histopatológicas observadas nos animais tratados com BT, destacam-se a degeneração hidrópica, que variou de leve a moderada, hiperemia vascular moderada e áreas pontuais com hepatócitos em necrose de coagulação e infiltração de células mononucleares e polimorfonucleares. Os corações dos animais não apresentaram alterações importantes (figura 22).

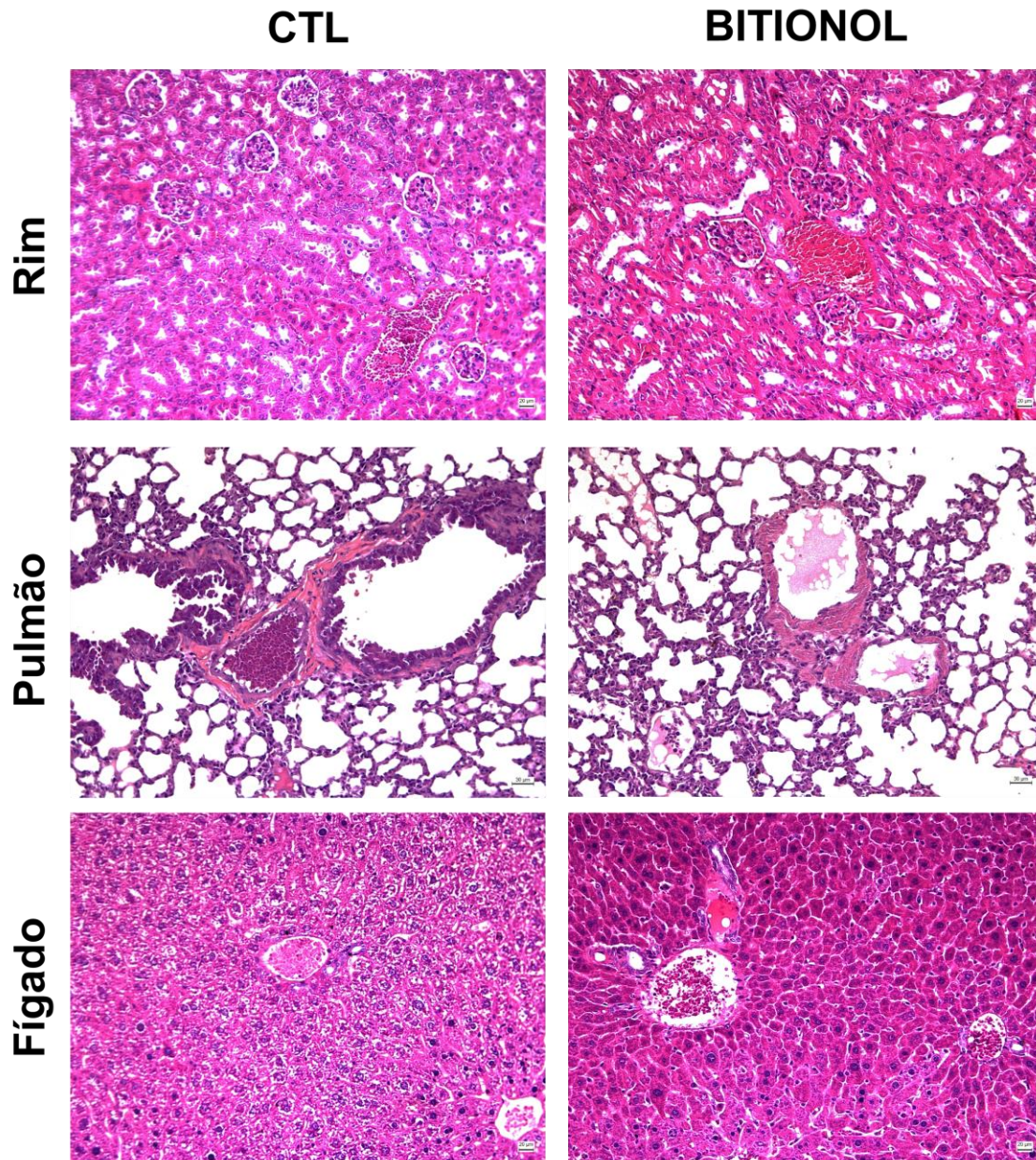


Figura 22 - Fotomicrografias representativas de rins, pulmões e fígados de camundongos NSG transplantados com células de LMA (KG-1a) tratados com 50 mg/kg de BT. DMSO 5% foi utilizado com controle negativo. Os animais foram tratados através da via intraperitoneal durante duas semanas. Barra de escala = 100 μ m.

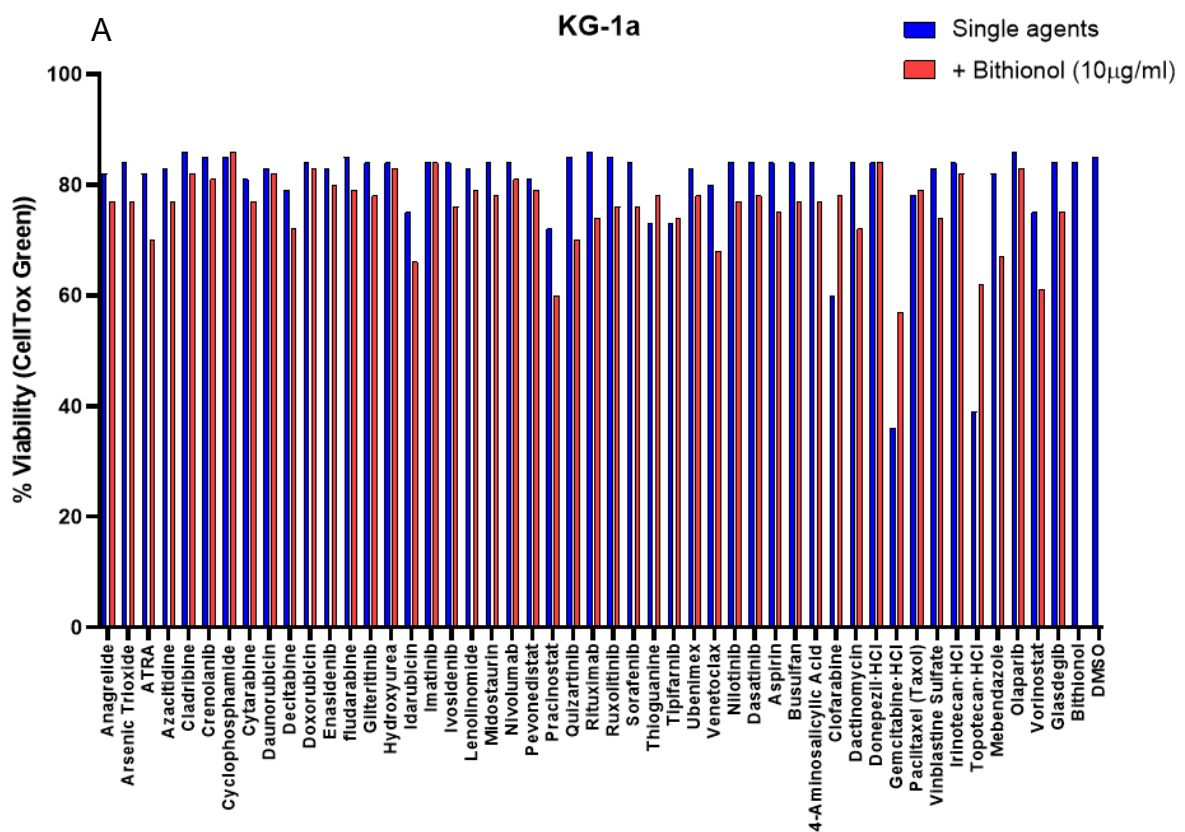
Fonte: Autora

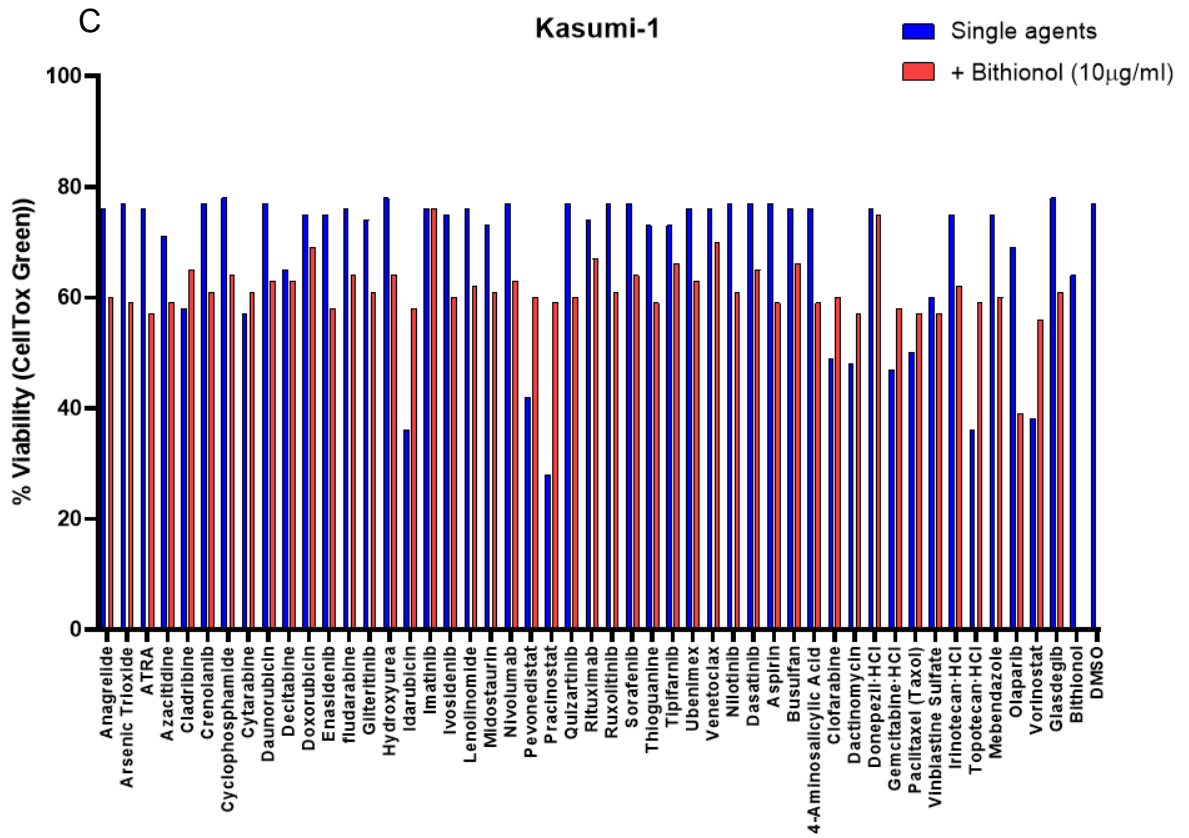
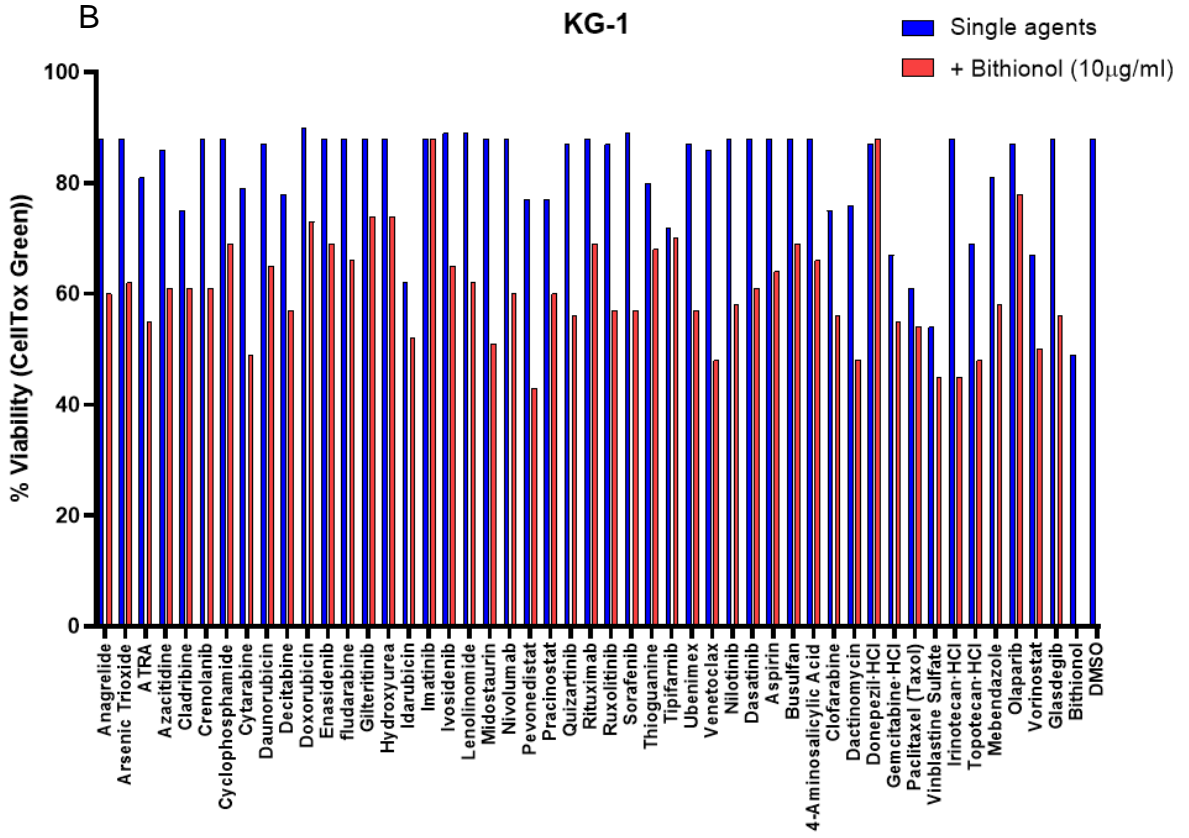
5.9 A combinação de BT com VTX inibe sinergicamente o crescimento de células KG-1a

O ensaio de combinação dos compostos foi realizado em células KG-1a, KG-1, Kasumi-1 e HL-60 após 72 horas de incubação do BT (10 μ g/mL) com 48 compostos (2 nM)

de diferentes classes farmacológicas, a maioria das quais já são usados no tratamento de malignidades mieloides. Entre eles, quizartinib, daunorrubicina, olaparib, midostaurina, mebendazol, fludarabina, pevonedistat, vorinostat, hidroxiureia, sorafenib, ubenimex, venetoclax, irinotecan e glasdegib quando combinados com BT demonstraram uma redução significativa na viabilidade celular (Figura 23). Esses compostos foram selecionados e repetidos em um experimento adicional (Figura 24), onde venetoclax (VTX) mostrou ser a melhor opção de combinação.

Em seguida, o VTX foi selecionado para o cálculo do índice de combinação (IC). Curiosamente, a combinação de BT com VTX apresentou um índice de combinação de sinergismo para a maioria das concentrações testadas (Figura 25). Além disso, a combinação de BT com VTX apresentou citotoxicidade potente em comparação ao tratamento das células com os compostos sozinhos (Figura 26).





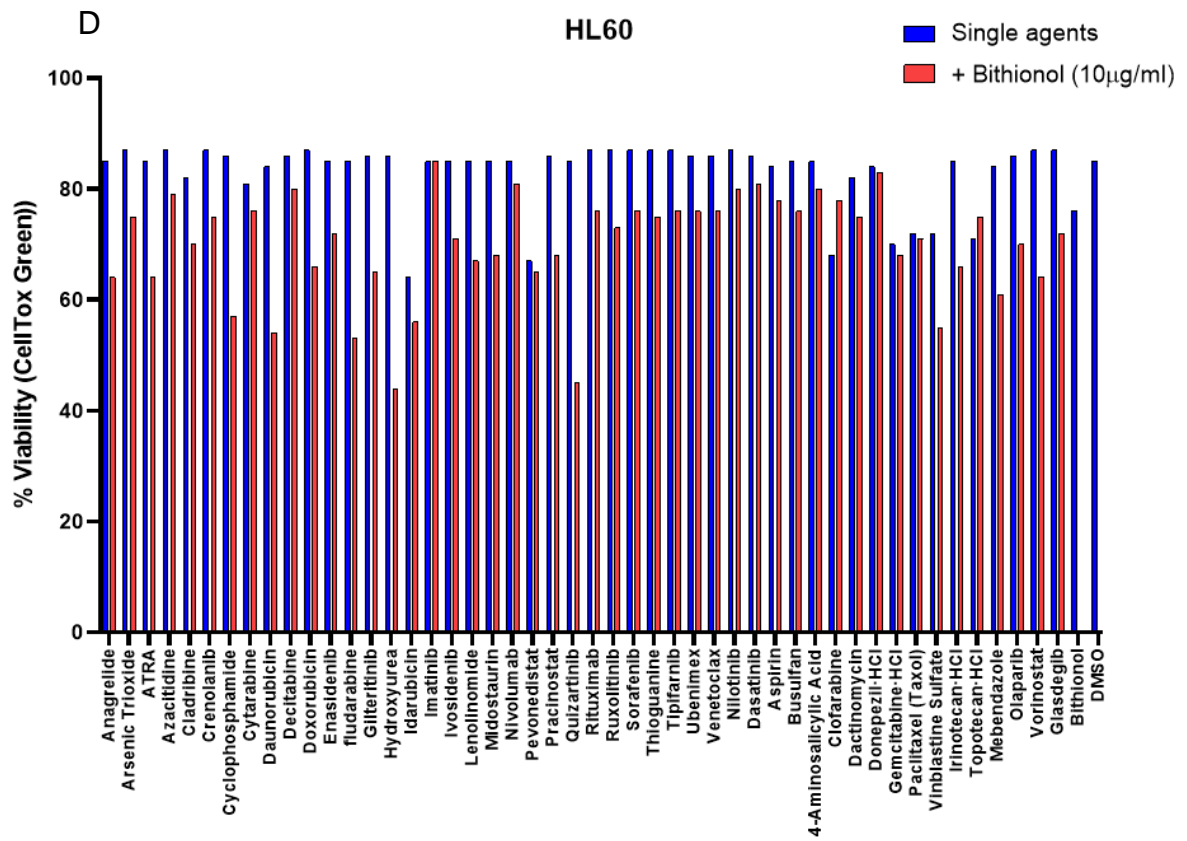
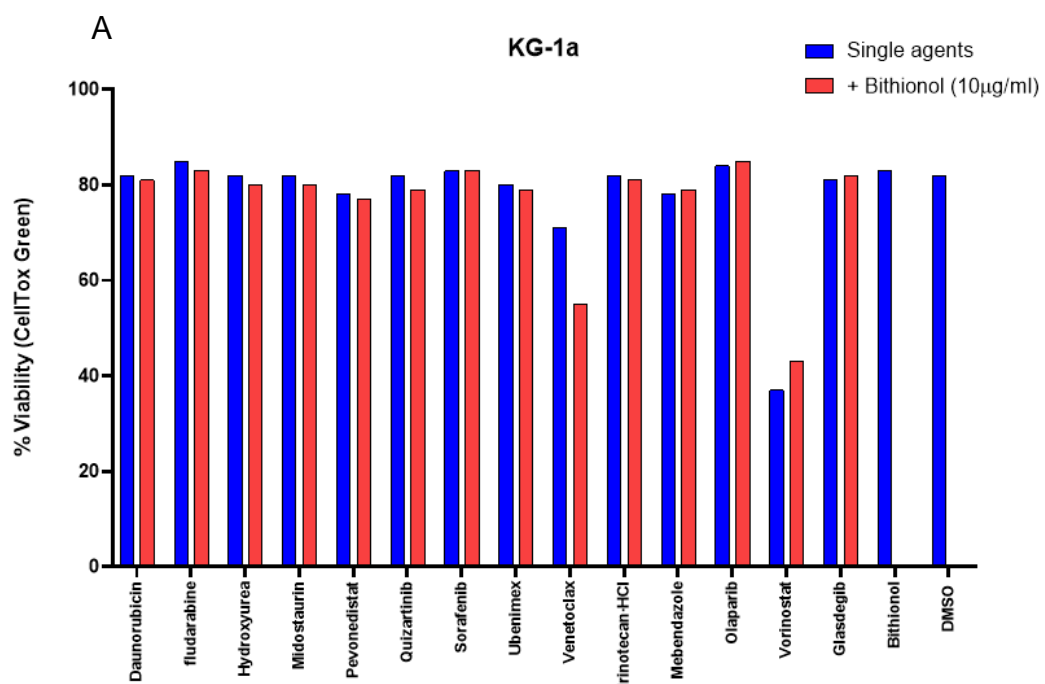
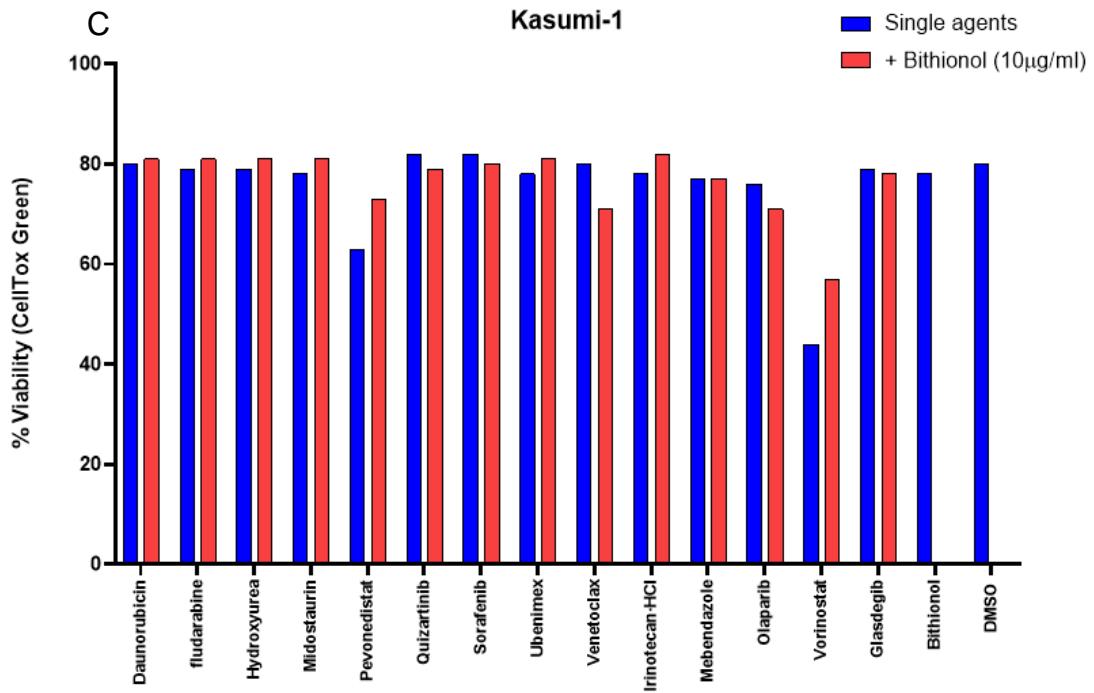
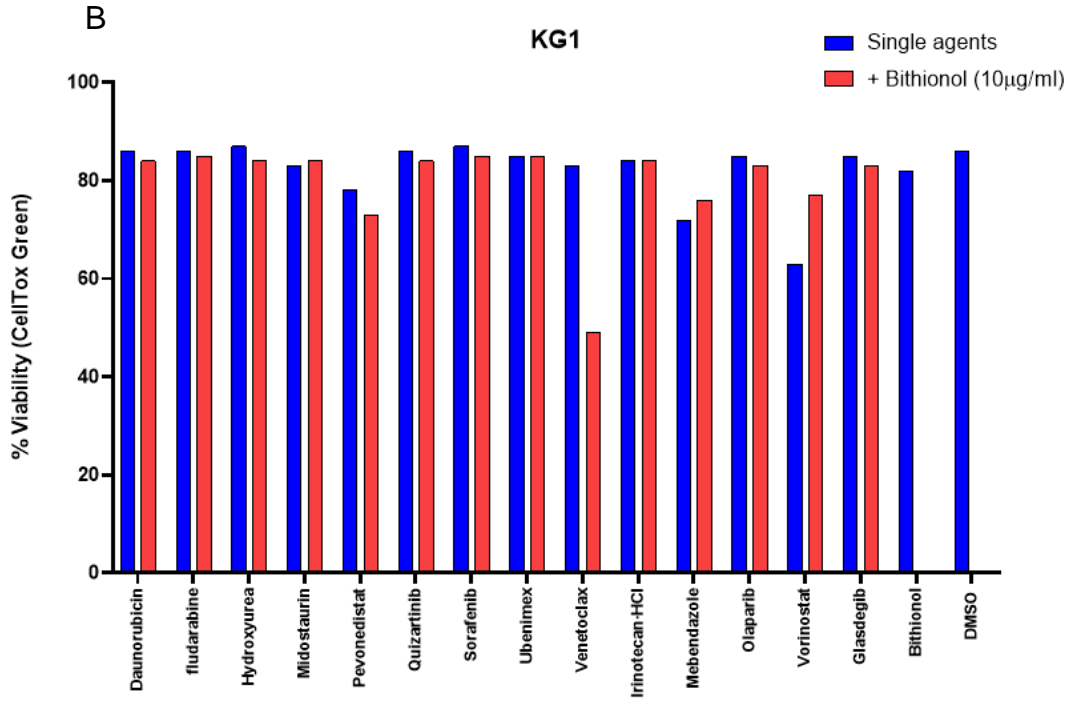


Figura 23 - Ensaio de combinação dos compostos realizado em células (A) KG-1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 após 72 h de incubação do BT (10 µg/mL) com 48 compostos (2 nM) de diferentes classes farmacológicas. Os dados são apresentados como a média ± S.E.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com CTL pelo teste t de Student.

Fonte: Autora





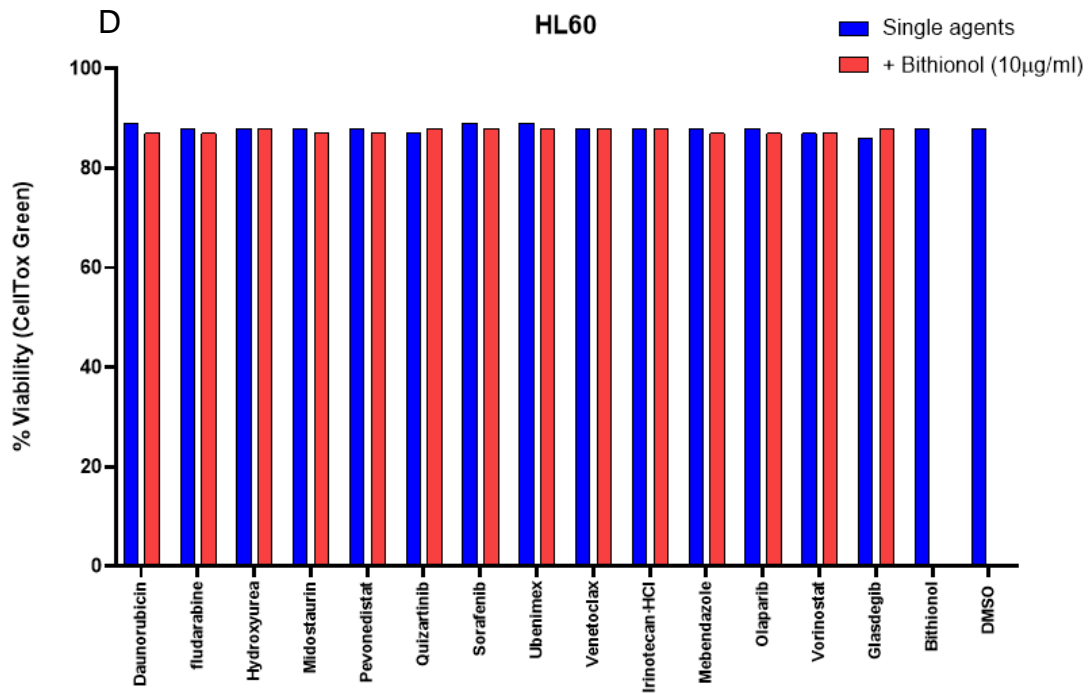


Figura 24 - Ensaio de combinação dos compostos realizado em células (A) KG-1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 após 72 h de incubação do BT (10 µg/mL) com 14 compostos (2 nM) selecionados. Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com CTL pelo teste t de Student.

Fonte: Autora

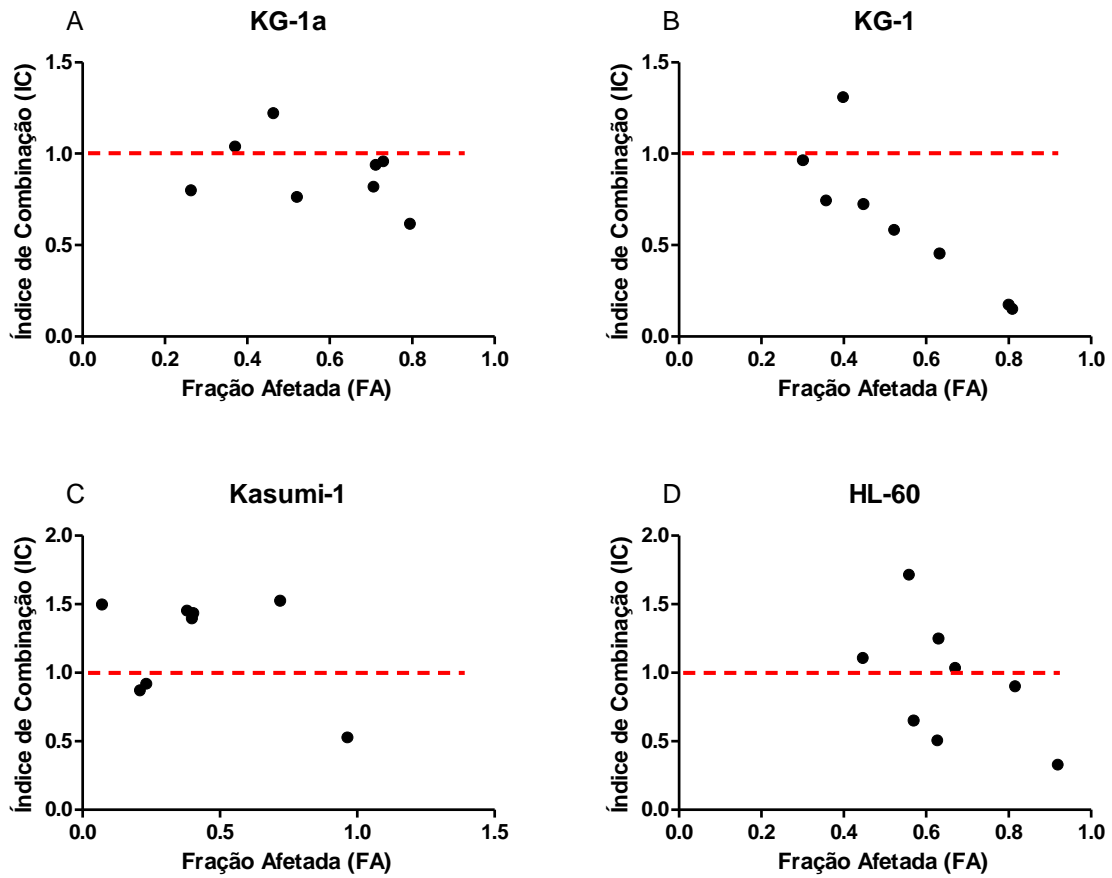


Figura 25 - Gráfico do índice de combinação (IC) da combinação entre BT e VTX em células (A) KG-1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 após 72 h de incubação. Os efeitos sinérgicos, aditivos e antagonistas dos compostos são definidos por valores de IC < 1,0, 1,0 e > 1,0, respectivamente. Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com CTL pelo teste t de Student.

Fonte: Autora

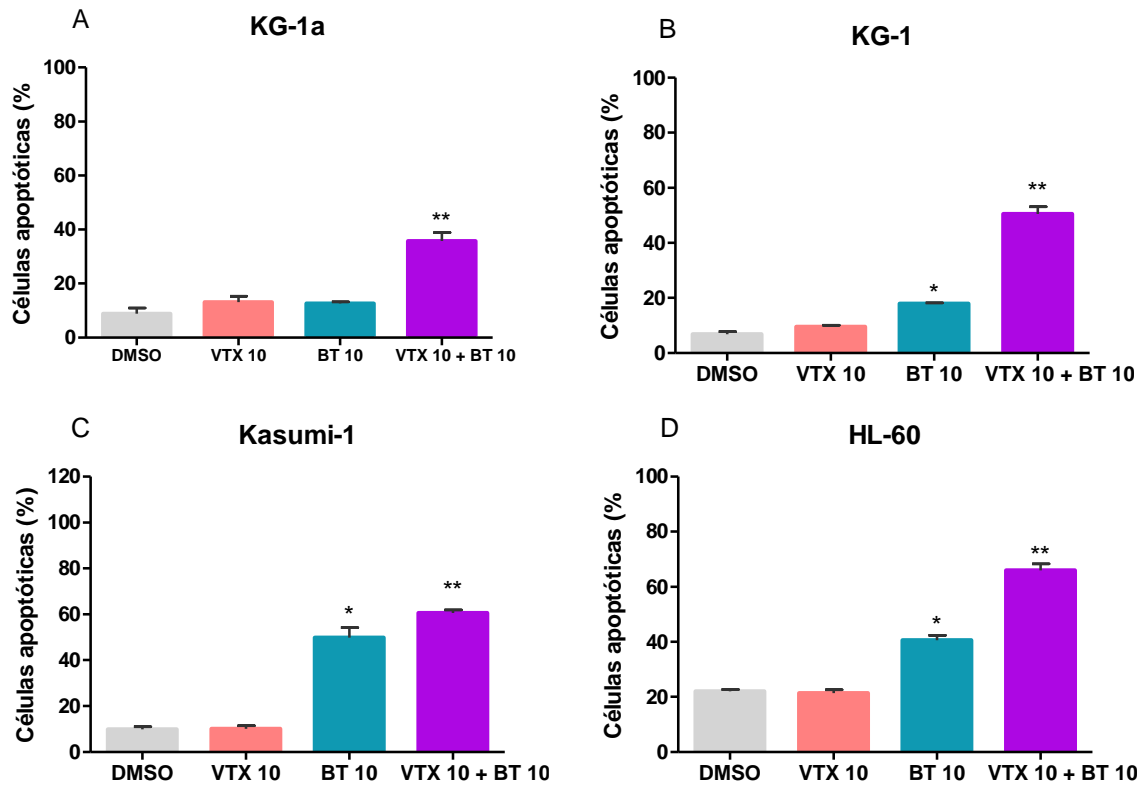


Figura 26 - Efeito da combinação do BT com VTX sobre a morte das células (A) KG-1a, (B) KG-1, (C) Kasumi-1 e (D) HL-60 realizado por Anexina V + IP após 72h de incubação. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Doxorrubicina (DOX) 1 μ M foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem à % de células viáveis de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com CTL pelo teste t de Student.

Fonte: Autora

6 DISCUSSÃO

O surgimento de novas terapias para o câncer, em especial para as leucemias, tem contribuído para o aumento da sobrevida dos pacientes. Nos últimos 10 anos, muitos medicamentos foram aprovados para o tratamento da LMA e apesar dos avanços no tratamento estarem levando a melhores resultados de alguns subgrupos de LMA, a mortalidade permanece alta e a taxa de sobrevida relativamente baixa (Stubbins *et al.*, 2022). Devido a esse cenário, se faz necessário a descoberta de novos medicamentos, porém esse processo pode ser oneroso e levar um tempo considerável, então, uma abordagem alternativa é o redirecionamento de fármacos. Muitos fármacos podem apresentar diversas propriedades farmacológicas, podendo modular novos alvos ou alvos alternativos daqueles em que foram clinicamente aprovados inicialmente. Essa alternativa é interessante, pois a ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e a toxicidade do fármaco já estão estabelecidas e podem ir diretamente para ensaios clínicos de fase II/III. No entanto, para o redirecionamento desses medicamentos para novos alvos e doenças, é necessário primeiramente entender seu mecanismo de ação em modelos pré-clínicos e animais (Ayyagari; Brard, 2014).

Neste trabalho, avaliamos o potencial antileucêmico do bitionol (BT), um medicamento antiparasitário clinicamente aprovado. O BT recebeu a aprovação da *Food and Drug Administration* como um medicamento de segunda linha para o tratamento de infecções helmínticas administrado por via oral (Bacq *et al.*, 1991).

Inicialmente, avaliamos o potencial citotóxico do BT frente a diferentes linhagens de células cancerosas e não cancerosas. BT foi previamente relatado como um agente citotóxico contra células de câncer de ovário resistentes à cisplatina (OVACAR-3, SKOV-3, A2780-CDDP e IGROV-1CDDP) ou sensíveis à cisplatina (A2780 e IGROV-1) (Ayyagari & Brard, 2014). Pela primeira vez, foi testado o BT frente as linhagens leucêmicas HL-60, NB4, KG-1, KG-1a, MOLM-13, PL-21, THP-1, K562, Kasumi-1, MV4-11 e Jurkat e encontramos que o CI_{50} variou de 5,69 na linhagem HL-60 a 11,59 na linhagem K-562, enquanto na linhagem KG-1a, apresentou CI_{50} de 7,08. Além disso, a citotoxicidade do BT também foi avaliada pela primeira vez em um painel com linhagens de células tumorais sólidas: MCF-7, 4T1, MDA-MB-231, HCT116, DU 145, HepG2, B16-F10, A-375, HSC-3, CAL27, SCC-4, SCC-9, SCC25, PANC-1, A549, U-87 MG, e células não tumorais MRC-5, PBMC e BJ. O ensaio de

citotoxicidade demonstrou que o BT pode inibir a viabilidade celular tanto de células cancerosas de tumores sólidos, como de hematológicas, confirmado com a redução do número de células viáveis utilizando o método de exclusão por azul de tripan.

As linhagens celulares KG-1, KG-1a e Kasumi-1 são caracterizadas por expressarem perfis que contêm CD34+, conseqüentemente, essas células são mais amplamente utilizadas para estudar CTLs (She *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2019). A maioria dos experimentos foram realizados utilizando a linhagem KG-1a, bem como outras linhagens de LMA a fim de comparação do efeito do BT.

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença heterogênea, caracterizada pela ocorrência de blastos anormais em diferentes estágios de maturação na medula óssea (MO), perturbando a hematopoiese normal. O padrão para o tratamento de indução da LMA é uma combinação de citarabina com antraciclinas, resultando em uma taxa de remissão completa de 60–80%, no entanto, 50–70% deles apresentam uma recaída. A recorrência da doença é atribuída às células iniciadoras de leucemia, também chamadas de células-tronco leucêmicas (LSCs), que se acredita serem poupadas da quimioterapia e capazes de reiniciar a doença. Assim, novas estratégias terapêuticas bem-sucedidas para o tratamento da LMA devem ter como objetivo erradicar as LSCs, bem como a maior parte dos blastos e causando significativamente menos efeitos colaterais em comparação com a quimioterapia convencional (Ehninger *et al.*, 2014).

As células tronco leucêmicas (CTLs) são CD34+/CD38– com características de autorrenovação, ciclo celular quiescente, aumento do efluxo de drogas e resistência à quimioterapia, indicando associação com um prognóstico ruim. O fenótipo de células-tronco CD34+ CD38- não é exclusivo das CTLs, porém as CTLs possuem características imunofenotípicas únicas que podem ser usadas para distingui-las das células tronco hematopoiéticas (CTHs) e direcioná-las terapêuticamente. Entre esses marcadores específicos, encontram-se o CD13 e CD33, marcadores mieloides e os CD34, CD38 e CD123 que marcam o fenótipo de CTLs original (Taussig *et al.*, 2005; Al-Mawali *et al.*, 2017; Zong *et al.*, 2022; Mohd *et al.*, 2023).

CD13 é preferencialmente expresso em células blásticas mieloides agudas (Thalhammer-Scherrer *et al.*, 2002). He *et al.* (2020), encontraram uma alta porcentagem de células positivas para CD13 na população enriquecida com CTLs (CD34 + CD38 -) de LMA,

mas não da medula óssea de doador normal, o que foi consistente com relatórios anteriores, assim como Mohd *et al* (2023), que encontraram uma alta expressão de CD13 em células THP-1.

CD33 é um antígeno de diferenciação mielóide com propriedades endocíticas amplamente expressas em vários tipos de células mielóides: é expresso em progenitores mielóides multipotentes e unipotentes e em compartimentos de maturação das linhagens granulocíticas e monocíticas. CD33 não é expresso em células-tronco hematopoiéticas pluripotentes (Pelosi *et al.*, 2015). O CD33 é expresso na grande maioria das LMA e geralmente a sua expressão é maior nos blastos leucêmicos do que nos precursores mielóides normais. O CD33 foi detectado em blastos de 85-90% dos pacientes que apresentavam LMA, bem como em progenitores mielóides normais e mielócitos. Curiosamente, o CD33 parece estar restrito às células hematopoiéticas, mas ausente nas células-tronco hematopoiéticas normais, tornando-o um alvo ideal para terapia de LMA (Ehninger, *et al.*, 2014; Krupka *et al.*, 2014). Em consonância com esta observação, Taussig e colaboradores (2005), mostraram que na grande maioria dos pacientes com LMA (11/12) a fração CD33+ contém células iniciadoras de leucemia (assim como a CD13 e CD123) (Pelosi *et al.*, 2015).

A expressão de CD33 e CD123 em blastos de LMA foi estudada por citometria de fluxo em uma coorte de 319 pacientes. 87,8% das LMA expressam CD33, 9,4% das LMA expressam CD123 sem expressão concomitante de CD33. A presença simultânea de ambos os antígenos foi observada em 69,5% dos pacientes. Assim, quase todas as LMA poderiam ser direcionadas via CD33 ou CD123 (Ehninger *et al.*, 2014). Hermann e colaboradores exploraram as características imunofenotípicas de CD34/CD38⁺⁺- células purificadas de um grande grupo de pacientes com LMA e LMC e observadas que CD123, assim como CD33, são claramente mais expressos em células leucêmicas em comparação com CD34/CD38⁺⁻ normais contrapartida (Hermann *et al.*, 2020). No diagnóstico inicial da LMA, as CTLs foram positivas para CD33 (88,7%), CD123 (95,3%), TIM3 (78,5%) e CD244 (98,1%), enquanto na recidiva, as CTLs na maioria dos pacientes foram positivas para CD33 (90,2%), CD123 (92,7%), TIM3 (64,7%) e CD244 (95,0%) (Haubner *et al.*, 2019).

A expressão de CD123 foi observada em células da linhagem mielóide e em blastos de LMA, bem como em CTLs em 75-89% dos pacientes com LMA, estando ausente em CTHs (Ehninger *et al.*, 2014). Al-Mawali e colaboradores (2017), encontram que o CD123+

estava presente em 97% dos blastos de LMA dos pacientes diagnosticados com LMA e em 97% no compartimento CD34+/CD38-, enquanto CD123+ não estava presente (menos que 0,1%) nas células-tronco normais da medula óssea, nem nas células-tronco regeneradoras da medula óssea. A expressão de CD123 em blastos de LMA está associada à falha em obter uma resposta completa à quimioterapia de indução inicial e à baixa sobrevida global, estando aumentado significativamente na LMA quimiorresistente (Arai *et al.*, 2019; Mohd *et al.*, 2023).

É importante ressaltar que CD123 é igualmente expresso em células volumétricas de LMA e em células-tronco leucêmicas no diagnóstico inicial e na recidiva e, portanto, sua expressão não está relacionada à evolução clonal leucêmica. A independência da expressão de CD123 da evolução clonal da LMA apoia fortemente o CD123 como um potencial alvo terapêutico de LMA em vários estágios da doença: diagnóstico inicial, doença residual mínima (DRM) e recidiva. (Haubner *et al.*, 2019; Testa *et al.*, 2019).

Nossos dados demonstram pela primeira vez que o BT causou uma redução significativa da população de células CD13, CD33, CD34, CD38 e CD123 viáveis. Ultimamente alguns quimioterápicos já foram descritos por terem ação nos blastos leucêmicos, no entanto, nenhum desses quimioterápicos utilizados rotineiramente na terapia antileucêmica conseguem eliminar as CTLs, enquanto o BT pode ser um forte candidato para esse tipo de terapia.

Após avaliar a atividade citotóxica do BT e sua capacidade de eliminar CTLs, estudamos seu mecanismo de ação. Para isso, avaliamos se o BT causa morte celular por apoptose em células de LMA através da avaliação da atividade de caspase 3 ativa, da expressão de PARP clivada, de Bcl-2 e Bad. Além desses marcadores de morte celular, analisamos outras alterações específicas da apoptose, como a condensação da cromatina, bem como alterações no potencial mitocondrial e indução de EROs.

A capacidade de induzir apoptose é um fator crítico para o tratamento eficaz contra o câncer. A apoptose, também chamada de morte celular programada, é um processo fundamental necessário para a homeostase morfogênica durante o desenvolvimento inicial e em condições fisiopatológicas. A apoptose é mediada por duas vias, a extrínseca (via do receptor de morte) e a intrínseca (mitocondrial). A maioria das drogas antineoplásicas

(citotóxicas) induz apoptose pela via intrínseca (Kaufmann; Earnshaw, 2000; Ayyagari; Brard, 2014).

A via intrínseca pode ser ativada por estímulos internos, como dano ao DNA e estresse oxidativo. Membros da família Bcl-2, incluindo as proteínas Bax (pró-apoptóticas) e Bcl-2 (antiapoptóticas,) presentes na membrana mitocondrial, são os principais mediadores dessa via. A ruptura do potencial mitocondrial pode levar à oxidação dos poros mitocondriais por ERO, resultando na liberação de citocromo C no citosol. O citocromo C, Apaf1 (fator ativador da protease apoptótica-1) e o dATP formam então um apoptossoma para o qual a procaspase-9 é recrutada e clivada em caspase-9. A caspase-9, por sua vez, ativa as caspases efetoras -3 e -7 que executam as etapas finais da apoptose (Ayyagari; Brard, 2014; Kashyap *et al.*, 2021).

A ativação da caspase-3 desempenha um papel central no mecanismo de apoptose, clivando vários componentes celulares envolvidos no reparo e controle do DNA, como o PARP-1. Quando PARP-1 é clivado, resulta em sua inativação, o que impede o desempenho de seu papel no reparo do DNA, desencadeando a apoptose (Pan *et al.*, 2011; Haykal *et al.*, 2021).

Os membros da família Bcl-2 podem ser antiapoptóticos, como Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w e Bfl-1/A1, quanto pró-apoptóticos, como Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, Bmf, Puma e Noxa. O equilíbrio entre essas proteínas anti e pró-apoptóticas decide se uma célula deve sofrer ou resistir à apoptose. A proteína bad desempenha um papel importante na inativação dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, levando à indução da apoptose (Basu, 2021).

Para identificar células em apoptose e morte celular, foi realizado inicialmente o ensaio de marcação com YO-PRO e IP, onde houve um aumento significativo no número de células em apoptose e células mortas após o tratamento com BT. Para confirmar a morte celular por apoptose, avaliamos a expressão de caspase-3 ativa e Parp-1 clivado, onde observamos a diminuição da caspase-3 ativa e aumento de Parp-1 clivado, confirmados com os resultados do Western Blot. Também encontramos um aumento da despolarização mitocondrial, de ERO e da fragmentação do DNA, indicativos de que o composto tem a capacidade de induzir morte por apoptose nas células de LMA humana. Já em relação a *BAD*, encontramos que a apoptose induzida por BT é independente de *BAD*.

Estudos prévios mostraram o efeito inibitório do BT sobre o crescimento de células de câncer cervical e de células cancerosas do ovário via indução da atividade da caspase 3/7 e

subsequente clivagem/inativação de PARP-1 após o tratamento com o composto em concentrações mais baixas. Outras características da apoptose, como condensação nuclear, fragmentação do DNA e perda do potencial mitocondrial, foram observadas demonstrando ainda mais que o BT desencadeia apoptose em células cancerosas de ovário (Miller *et al.*, 2010; Ayyagari *et al.*, 2014).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são conhecidas por causar apoptose, necrose ou ferroptose, dependendo da quantidade e do tipo de ERO gerado (Englert & Shacter, 2002). Compostos antineoplásicos como paclitaxel, cisplatina e doxorrubicina possuem a capacidade de aumentar a geração de ERO em linhagens celulares (Berndtsson *et al.*, 2007; Meshkini; Yazdanparast, 2012). Ayyagari e colaboradores (2014) demonstraram uma geração significativa de ERO em células de câncer de ovário tratadas com BT em comparação com células não tratadas de forma dependente da concentração e do tempo. Nesse trabalho, além da apoptose induzida por BT, encontramos que ele foi capaz de aumentar as EROs e induzir ferroptose em células KG-1a.

Espécies reativas de oxigênio são conhecidas por modificar moléculas sinalizadoras importantes na sobrevivência celular, como Akt1, e fatores de transcrição, incluindo NF- κ B, devido à presença de grupos cisteína ou metionina redox-sensíveis que são suscetíveis à oxidação (Irani, 2000). Curiosamente, o aumento da ativação da sinalização celular de NF- κ B foi relatado como um mecanismo de resistência por algumas quimioterapias citotóxicas e, portanto, alguns inibidores de NF- κ B poderiam superar esse fenótipo de quimiorresistência (Oiso *et al.*, 2012; Samuel *et al.*, 2014; Esparza-López *et al.*, 2022). Nesse trabalho, encontramos que o BT foi capaz de suprimir a sinalização do NF- κ B. Em particular, tanto a inibição da sinalização celular de NF- κ B quanto a indução de estresse oxidativo são alvos para eliminar CTLs de LMA (Guzman *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2023).

Analisamos o efeito do BT sobre a expressão de 96 genes envolvidos em diferentes mecanismos celulares, incluindo proliferação celular, ciclo celular, apoptose, estresse oxidativo, metástase e angiogênese. Encontramos que os genes RELB, STAT3, PIK3CA, FOXO1, SMAD2, TGFB2, PPARG, MAP1LC3B, VIM e ZEB2 tiveram a expressão aumentada e os genes WNT10B, JAG2 e TWIST1 tiveram a expressão reduzida após o tratamento.

A sinalização Wnt atua na padronização celular durante a embriogênese e na regulação da homeostase do tecido adulto. A sinalização disfuncional desta via tem sido associada à evolução e manutenção das CTLs, bem como a muitos outros tipos de câncer. WNT10B faz parte da via WNT canônica, onde é expresso no saco vitelino embrionário de camundongos, fígado fetal e células hematopoiéticas, e, quando superexpresso, na oncogênese de vários sistemas orgânicos (Duchartre *et al.*, 2016; Ghosh *et al.*, 2019; Madueke *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2021).

A via de sinalização Notch atua em diversos processos de desenvolvimento celular e formação de tecidos, regulando a proliferação, diferenciação celular e apoptose. É uma via presente em CTLs de LMA e pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento, proliferação e resistência às quimioterapias. JAG2 pertence à família jagged-4, está envolvido na via canônica de ativação e está superexpresso em CTLs (Gal *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2021).

Twist1 desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário. Sua superexpressão desencadeia características de células tronco cancerígenas (CSC) e a transição epitélio-mesenquimal (EMT) em várias linhagens de células cancerígenas, estando relacionado a vários cânceres humanos, promovendo invasão e metástase de células tumorais, bem como recorrência metastática (Beck *et al.*, 2015; Khales *et al.*, 2022; de Moraes *et al.*, 2023).

Realizamos a avaliação da atividade antileucêmica do BT *in vivo* em camundongos NSG inoculados com células KG-1a. Observamos que o BT pode inibir o desenvolvimento de LMA em camundongos NSG em uma dosagem de 50 mg/kg com toxicidade sistêmica tolerada. Além disso, este composto induziu apoptose em células de câncer de ovário SKOV-3 enxertadas em camundongos Nude Foxn1^{nu}, embora não tenha sido capaz de inibir o desenvolvimento do tumor ou melhorar a sobrevivência do camundongo em dosagens de 30-240 mg/kg (Ayyagari *et al.*, 2016).

Apesar de uma recente expansão na gama de novos agentes usados na terapia de LMA, pacientes com LMA inelutáveis ou refratários à quimioterapia de indução intensiva têm prognóstico ruim e opções terapêuticas limitadas (Lasica; Anderson, 2021). Dessa forma, a combinação de medicamentos se torna uma interessante estratégia para erradicar as células leucêmicas resistentes ao tratamento convencional. Ayyagari e colaboradores mostraram, em

dois trabalhos diferentes, que BT sinergiza com cisplatina e paclitaxel em células de câncer de ovário inibindo a sinalização celular NF- κ B e induzindo estresse oxidativo (Ayyagari *et al.*, 2017a; Ayyagari *et al.*, 2017b). Aqui, observamos que BT sinergiza com venetoclax (VTX) em células de LMA e apresentam citotoxicidade potente quando comparado com o tratamento dos compostos sozinhos.

O desenvolvimento do VTX, um inibidor potente e seletivo de BCL2, transformou o tratamento da LMA. No entanto, a curta duração da resposta e o desenvolvimento de resistência continuam a ser grandes preocupações. Entre 30% a 40% dos pacientes com LMA são refratários primários à terapia baseada em venetoclax e a maioria daqueles que respondem inicialmente recaem posteriormente (Ong *et al.*, 2022; Dhakal *et al.*, 2023). Diante disso, VTX tem sido estudado no tratamento de LMA em combinação com outros agentes, como inibidores de FLT3, inibidores de IDH2, chidamida, ibrutinibe, lapatinibe, mivebresibe, triptólido, inibidores metabólicos, análogos de nucleosídeos e quimioterápicos clássicos (Wei *et al.*, 2020; Mihăilă, 2023). É importante ressaltar que um dos mecanismos de resistência ao venetoclax também foi relacionado ao aumento da ativação da sinalização celular de NF- κ B (Jayappa *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2021; Haselager *et al.*, 2021). Isso indica o potencial translacional do BT para aumentar os efeitos do venetoclax em pacientes com LMA. Outros experimentos precisam ser feitos para avaliar o mecanismo de ação da combinação desses compostos e confirmar sua eficácia *in vivo*.

Em conjunto, esses dados indicam o bitionol como um potencial novo medicamento anti-LMA direcionado à inibição de NF- κ B e indução de estresse oxidativo com a capacidade de reduzir as células progenitoras/tronco CD34+ LMA e sinergizar com a ação do venetoclax.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nós mostramos pela primeira vez que o bitionol exibe citotoxicidade para diversas linhagens de células cancerosas sólidas e hematológicas com a capacidade de reduzir as células progenitoras/tronco CD34+ de LMA e suprimir o desenvolvimento de LMA em camundongos NSG. BT causou apoptose em células de LMA, através do aumento da despolarização mitocondrial, aumento das EROs, ativação das caspases e consequente inativação de PARP além da fragmentação do DNA com parada em sub GO/G1 com supressão da sinalização de NF- κ B. Além disso, BT sinergizou os efeitos do venetoclax nas células de LMA, indicando que esse composto exibe importantes efeitos anti-LMA e que a combinação é promissora para o tratamento contra LMA.

REFERÊNCIAS

- ALFAYEZ, M., BORTHAKUR, G. Checkpoint inhibitors and acute myelogenous leukemia promises and challenges. **Expert Rev Hematol**, v. 11, p. 373-389, 2018.
- AL-MAWALI, A., PINTO, A. D.; AL-ZADJALI, S. CD34+CD38-CD123+ Cells Are Present in Virtually All Acute Myeloid Leukaemia Blasts: A Promising Single Unique Phenotype for Minimal Residual Disease Detection. **Acta haematologica**, v. 138(3), p. 175–181, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2020. **American Cancer Society**, Atlanta, 2020.
- ARAI, N. *et al.* Impact of CD123 expression, analyzed by immunohistochemistry, on clinical outcomes in patients with acute myeloid leukemia. **International journal of hematology**, v. 109(5), p. 539–544, 2019.
- AYYAGARI, V. N. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity of the Bithionol-paclitaxel combination in a panel of human ovarian cancer cell lines. **PLoS One**, v. 12(9), p. e0185111, 2017 a.
- AYYAGARI, V. N. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity of the Bithionol - cisplatin combination in a panel of human ovarian cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 17(1), p. 49, 2017 b.
- AYYAGARI, V. N.; BRARD, L. Bithionol inhibits ovarian cancer cell growth in vitro - studies on mechanism(s) of action. **BMC cancer**, v. 14, p. 61, 2014.
- AYYAGARI, V.N.; JOHNSTON, N.A.; BRARD, L. Assessment of the antitumor potential of Bithionol in vivo using a xenograft model of ovarian cancer. **Anticancer Drugs**, v. 27, p. 547-559, 2016.
- BACQ, Y. *et al.* Successful treatment of acute fascioliasis with bithionol. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 14, n. 6, p. 1066–1069, 1991.
- BASU, A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 230, p. 107943, 2022.
- BECK, B. *et al.* Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. **Cell stem cell**, v. 16(1), p. 67–79, 2015.
- BERNDTSSON, M. *et al.* Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. **International journal of cancer**, v. 120(1), p. 175–180, 2007.

BONNET, D., DICK, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell., **Nat Med**, v. 3, p. 730-737, 1997.

BYSTROM, L. M. *et al.* Cranberry A-type proanthocyanidins selectively target acute myeloid leukemia cells. **Blood advances**, v. 3, n. 21, p. 3261–3265, 2019.

CHEN, F. *et al.* Transdução de Sinal Upstream da Ativação NF-kB. **Atlas de Genética e Citogenética em Oncologia e Hematologia**, v. 6, p. 345-69, 2002.

CHENG, H.; ZHENG, Z.; CHENG, T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. **Protein & cell**, v. 11(1), p. 34–44, 2020.

CLARKE, M. F. *et al.* Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 9339–9344, 2006.

CORTES, J. E., PERL, A. E., DOMBRET, H. Final results of a phase 2 open-label, monotherapy efficacy and safety study of quizartinib (AC220) in patients ≥ 60 years of age with FLT3 ITD positive or negative relapsed/refractory acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 120, p. 673, 2012.

COSTA, R. G. A. *et al.* Emerging drugs targeting cellular redox homeostasis to eliminate acute myeloid leukemia stem cells. **Redox Biol**, v. 62, p. 1026922023, 2023.

DAMIANI, D. *et al.* Clinical impact of CD200 expression in patients with acute myeloid leukemia and correlation with other molecular prognostic factors. **Oncotarget**, v. 6, p. 30212–30221, 2015.

DE MORAIS, E. F. *et al.* TWIST1 regulates proliferation, migration, and invasion and is a prognostic marker for oral tongue squamous cell carcinoma. **Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 52(2), p. 127–135, 2023.

DESAI, S.; PINILLA-IBARZ, J. Front-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Control**, v. 19, p. 26–36, 2012.

DUCHARTRE, Y., KIM, Y.M., KAHN, M. The Wnt signaling pathway in cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol**, v. 99, p. 141–149, 2016.

EHNINGER, A. *et al.* Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. **Blood cancer journal**, v. 4(6), p. e218, 2014.

ENGLERT, R. P.; SHACTER, E. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 277(23), p. 20518–20526, 2002.

ESPARZA-LOPEZ, J. *et al.* Paclitaxel resistance is mediated by NF- κ B on mesenchymal primary breast cancer cells. **Oncol Lett**, v. 23(2), p. 50, 2022.

FISKUS, W. *et al.* Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. **Leukemia**, v. 28, n. 11, p. 2155–2164, 2014.

GAL, H. *et al.* Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 20(12), p. 2147–2154, 2006.

GHOSH, N. *et al.* The Wnt signaling pathway: a potential therapeutic target against cancer. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 1443 (1), p. 54–74, 2019.

GILLILAND, D. G.; JORDAN, C. T.; FELIX, C. A. The molecular basis of leukemia. **American Society of Hematology Education Program**, v. 80, p. 97, 2004.

GREENBERG, E. M.; PROBST, A. Chronic leukemia. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 4, p. 459-470, 2013.

GRIMWADE, D.; IVEY, A.; HUNTLY, B. J. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. **Blood**, v. 127, n. 1, p. 29–41, 2016.

GRIMWADE, D. *et al.* Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 22, p. 3650–36, 2009.

GUY, D. G., & UY, G. L. Bispecific Antibodies for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Current hematologic malignancy reports**, v. 13(6), p. 417–425, 2018.

GUZMAN, M. L., NEERING, S. J., UPCHURCH, D., GRIMES, B., HOWARD, D. S., RIZZIERI, D. A., LUGER, S. M., & JORDAN, C. T. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2301–2307, 2001.

GUZMAN, M. L. *et al.* The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. **Blood**, v. 105, n. 11, p. 4163–4169, 2005.

GUZMAN, M. L. *et al.* An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4427–4435, 2007.

GUZMAN, M. L. *et al.* Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16220–16225, 2002.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. 52-57, 2008.

HAN, J. G. *et al.* Piperlongumine chemosensitizes tumor cells through interaction with cysteine 179 of I κ B α kinase, leading to suppression of NF- κ B-regulated gene products. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 10, p. 2422–2435, 2014.

HASELAGER, M. *et al.* Regulation of Bcl-XL by non-canonical NF- κ B in the context of CD40-induced drug resistance in CLL. **Cell Death Differ**, v. 28(5), p. 1658-1668, 2021.

HASSANE, D. C. *et al.* Discovery of agents that eradicate leukemia stem cells using an in silico screen of public gene expression data. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5654–5662, 2008.

HAUBNER, S. *et al.* Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. **Leukemia**, v. 33, p. 64–74, 2019.

HAYKAL, T *et al.* The pro-apoptotic properties of a phytonutrient rich infusion of A. cherimola leaf extract on AML cells. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 140, p. 111592, 2021.

HE, X. *et al.* Bispecific and split CAR T cells targeting CD13 and TIM3 eradicate acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 135(10), p. 713–723, 2020.

HERMANN, H. *et al.* Delineation of target expression profiles in CD34CD38⁺ and CD34CD38 stem and progenitor cells in AML and CML. **Blood Adv**, v. 4, p. 5118–5132, 2020.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular cancer**, v. 12, p. 86, 2013.

HOPE, K. J.; JIN, L.; DICK, J. E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. **Nature Immunology**, v. 5, p. 738–743, 2004.

HORTON, S. J.; HUNTLY, B. J. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. **Haematologica**, v. 97, p. 966–974, 2012.

HUNGER, S. P. *et al.* Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 14, p. 1663–1669, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em: 08/04/2021

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circulation research**, v. 87(3), p. 179–183, 2000.

ISHIKAWA, F. *et al.* Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1315–1321, 2007.

JABBOUR, E. *et al.* New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 121, n. 15, p. 2517–28, 2015.

JAYAPPA, K. D. *et al.* Microenvironmental agonists generate de novo phenotypic resistance to combined ibrutinib plus venetoclax in CLL and MCL. **Blood Adv**, v. 1(14), p. 933-946, 2017. Erratum in: **Blood Adv**, v. 1(19), p. 1537. 2017.

Ji, Q. *et al.* Antineoplastic effects and mechanisms of micheliolide in acute myelogenous leukemia stem cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65012–65023, 2016.

JORDAN, C. T.; GUZMAN, M. L. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. **Oncogene**, v. 23, n. 43, p. 7178–7187, 2004.

JORDAN, C. T.; GUZMAN, M. L.; NOBLE, M. Cancer stem cells. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 12, p. 1253–1261, 2006.

JORDAN, C.T. The leukemic stem cell. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 20, p. 13–18, 2007.

KASHYAP, D.; GARG, V. K.; GOEL, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 125, p. 73–120, 2021.

KAUFMANN, S. H.; GORES, G. J. Apoptosis in cancer: cause and cure. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 22(11), p. 1007–1017, 2000.

KHALES, S. A. *et al.* TWIST1 activates cancer stem cell marker genes to promote epithelial-mesenchymal transition and tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma. **BMC cancer**, v. 22(1), p. 1272, 2022.

KHOURY, J. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, v. 36(7), p. 1703–1719, 2022.

KRUPKA, C. *et al.* CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*, v. 123(3), p. 356–365, 2014.

LAPIDOT, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, v. 367, p. 645–648, 1994.

LASICA, M.; ANDERSON, M. A. Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *Journal of personalized medicine*, v. 11(6), p. 46, 2021.

LE DIEU, R. *et al.* Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, v. 114, n. 18, p. 3909–3916, 2009.

LIU, J. *et al.* Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential. *PloS one*, v. 10(9), p. e0137345, 2015.

LIU, Y. *et al.* Low-dose triptolide in combination with idarubicin induces apoptosis in AML leukemic stem-like KG1a cell line by modulation of the intrinsic and extrinsic factors. *Cell death & disease*, v. 4(12), p. e948, 2013.

MADUEKE, I. *et al.* The role of WNT10B in normal prostate gland development and prostate cancer. *The Prostate*, v. 79(14), p. 1692–1704, 2019.

MARDIANA, S.; GILL, S. CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Frontiers in oncology*, v. 10, p. 697, 2020.

MESHKINI, A.; YAZDANPARAST, R. Involvement of oxidative stress in taxol-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, v. 64(4), p. 357–365, 2012.

MILLER, S. C. *et al.* Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochemical pharmacology*, v. 79(9), p. 1272–1280, 2010.

MOHD AMIN, A. *et al.* ENPP4 and HOXA3 as potential leukaemia stem cell markers in acute myeloid leukaemia. *The Malaysian journal of pathology*, v. 45(1), p. 65–76, 2023.

MUGHAL, T. I. *et al.* Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica*, v. 101, n. 5, p. 541–558, 2016.

NEMKOV, T.; D'ALESSANDRO, A.; REISZ, J. A. Metabolic underpinnings of leukemia pathology and treatment. **Cancer reports (Hoboken, N.J.)**, v. 2(2), p. e1139, 2019.

OH S. J. Bithionol treatment in cerebral paragonimiasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 16, n. 5, p. 585–590, 1967.

OISO, S. *et al.* Involvement of NF- κ B activation in the cisplatin resistance of human epidermoid carcinoma KCP-4 cells. **Oncol Rep**, v. 28(1), p. 27-32, 2012.

OKOYE-OKAFOR, U. C. *et al.* New IDH1 mutant inhibitors for treatment of acute myeloid leukemia. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 11, p. 878–886, 2015.

PAN, D. *et al.* Emetine regulates the alternative splicing of caspase 9 in tumor cells. **Oncology letters**, v. 2(6), p. 1309–1312, 2011.

PARK, Y. D. *et al.* Identification of Multiple Cryptococcal Fungicidal Drug Targets by Combined Gene Dosing and Drug Affinity Responsive Target Stability Screening. **mBio**, v. 7, n. 4, p. e01073-16, 2016.

PATEL, J. P. *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 12, p. 1079–1089, 2012.

PAUL, S.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clinic proceedings**, v. 91, n. 11, p. 1645–1666, 2016.

PELCOVITS, A.; NIROULA, R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. **Rhode Island medical journal**, v. 103, n. 3, p. 38–40, 2013.

PELOSI, E., CASTELLI, G.; TESTA, U. Targeting LSCs through membrane antigens selectively or preferentially expressed on these cells. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 55(4), p. 336–346, 2015.

RODRIGUES, A. *et al.* Cell signaling pathways as molecular targets to eliminate AML stem cells. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 160, p. 103277, 2021.

ROWE J. M. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. **British journal of haematology**, v. 150, n. 4, p. 389–405, 2010.

SAIF, A. *et al.* Acute Myeloid Leukemia: Is That All There Is?. **Cureus**, v. 10, n. 8, p. e3198, 2018.

SAMUEL, T. *et al.* Variable NF- κ B pathway responses in colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. **BMC Cancer**, v. 18, p. 599, 2014.

SANTINI V. Advances in myelodysplastic syndrome. **Current opinion in oncology**, v. 33(6), p. 681–686, 2021.

SAUNDERS, L. P. *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 10, p. 3352–3362, 2008.

SAYGIN, C.; CARRAWAY, H. E. Emerging therapies for acute myeloid leukemia. **Journal of hematology & oncology**, v. 10, n. 1, p. 93, 2017.

SCHUMICH, A. *et al.* Phospho-Profilig Linking Biology and Clinics in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. **HemaSphere**, v. 4, n. 1, e312, 2019.

SCHWONZEN, M. *et al.* Immunophenotyping of surface antigens in acute myeloid leukemia by flow cytometry after red blood cell lysis. **Leukemia research**, v. 31(1), p. 113–116, 2007.

SHE, M. *et al.* Resistance of leukemic stem-like cells in AML cell line KG1a to natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Cancer letters**, v. 318(2), p. 173–179, 2012.

SHIMONY, S.; STAHL, M.; STONE, R. M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American journal of hematology**, v. 98(3), p. 502–526, 2023.

SIVEEN, K.S. *et al.* Thymoquinone overcomes chemoresistance and enhances the anticancer effects of bortezomib through abrogation of NF- κ B regulated gene products in multiple myeloma xenograft mouse model. **Oncotarget**, v. 5, p. 634–648, 2014.

SIVEEN, K.S.; UDDIN, S.; MOHAMMAD, R. M. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. **Molecular Cancer**, v. 16, p. 13, 2017.

STIEHL, T.; BARAN, N.; HO, A.D.; MARCINIAK-CZOCHRA, A. Cell division patterns in acute myeloid leukemia stem-like cells determine clinical course: a model to predict patient survival. **Cancer Research**, v. 75, p. 940–949, 2015.

STUBBINS, R. J. *et al.* Management of Acute Myeloid Leukemia: A Review for General Practitioners in Oncology. **Current oncology (Toronto, Ont.)**, v. 29(9), p. 6245–6259, 2022.

STUBBINS, R. J. *et al.* Management of Acute Myeloid Leukemia: A Review for General Practitioners in Oncology. **Current Oncology**, v. 29(9), p. 6245–6259, 2022.

SUGITA, M.; GUZMAN, M. L. CD123 as a Therapeutic Target Against Malignant Stem Cells. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 34(3), p. 553–564, 2020.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAN, M., ZHANG, Q., YUAN, X., CHEN, Y., & WU, Y. Synergistic killing effects of homoharringtonine and arsenic trioxide on acute myeloid leukemia stem cells and the

underlying mechanisms. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 38(1), p. 308, 2019.

TAUSSIG, D. *et al.* Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 106(13), p. 4086–4092, 2005.

TESTA, U.; PELOSI, E.; CASTELLI, G. CD123 as a Therapeutic Target in the Treatment of Hematological Malignancies. **Cancers**, v. 11, p. 1358, 2019.

THALHAMMER-SCHERRER, R. *et al.* The immunophenotype of 325 adult acute leukemias: relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination. **American journal of clinical pathology**, v. 117(3), p. 380–389, 2002.

VAN RHENEN, A. *et al.* High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 6520–6527, 2005.

WALTER, R. B. *et al.* Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. **Blood**, v. 119(26), p. 6198–6208, 2012.

WANG, F., TRAVINS, J. *et al.* Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6132, p. 622–626, 2013.

YANG, L. *et al.* Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. **Signal Transduct Target Ther**, v. 5(1), p. 8, 2020.

YOKOGAWA, M. Quimioterapia experimental de paragonimiasis. Uma crítica. **Arzneimittel-Forschung**, v. 34, n. 9B, p. 1193-1196, 1984.

ZHOU, J.; CHING, Y. Q.; CHNG, W. J. Aberrant nucleFFar factor-kappa B activity in acute myeloid leukemia: from molecular pathogenesis to therapeutic target. **Oncotarget**, n. 6, v. 8, p. 5490–5500, 2015.

ZHOU, J. *et al.* O NF-κB promove as propriedades semelhantes às células de leucemia por ativação do LIN28B. **Revista mundial de células-tronco**, v. 10, n. 4, p. 34–42, 2018.

ZHOU, J.; CHNG, W.J. Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, p. 473, 2014.

ZHU, S. *et al.* Targeting NF-κB-dependent alkaliptosis for the treatment of venetoclax-resistant acute myeloid leukemia cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 562, p. 55-61, 2021.

ZONG, H. *et al.* In vivo targeting of leukemia stem cells by directing parthenolide-loaded nanoparticles to the bone marrow niche. **Leukemia**, v. 30, n. 7, p. 1582–1586, 2016.

ZONG, L. *et al.* Lineage switch from acute myeloid leukemia to acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 63(9), p. 2257–2259, 2022.

Apêndice A - Tabela 1S. Expressão gênica analisada por q PCR.

Função / Símbolo	Gene	QR	
		CTL	BT
Via NFκB			
NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1	1,00	1,56
NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2	1,00	1,66
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	1,00	1,82
NFKBIB	NFKB inhibitor beta	1,00	0,96
RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	1,00	1,31
RELB	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit	1,00	4,05
Via WNT/β-catenin			
APC	APC, WNT signaling pathway regulator	1,00	1,55
CSNK1A1	casein kinase 1 alpha 1	1,00	1,48
CTNNB1	catenin beta 1	1,00	0,89
GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	1,00	1,71
WNT10A	Wnt family member 10A	n.d.	n.d.
WNT10B	Wnt family member 10B	1,00	0,38
WNT2B	Wnt family member 2B	n.d.	n.d.
WNT6	Wnt family member 6	n.d.	n.d.
Via Hedgehog			

DHH	desert hedgehog	n.d.	n.d.
GLI1	GLI family zinc finger 1	1,00	0,70
GLI2	GLI family zinc finger 2	n.d.	n.d.
PTCH1	patched 1	1,00	1,02
SHH	sonic hedgehog	n.d.	n.d.
SMO	smoothened, frizzled class receptor	n.d.	n.d.
SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling	1,00	1,51
Via NOTCH			
DLL1	delta like canonical Notch ligand 1	1,00	n.d.
DLL3	delta like canonical Notch ligand 3	1,00	n.d.
JAG1	jagged 1	1,00	1,56
JAG2	jagged 2	1,00	0,00
NOTCH1	notch 1	1,00	1,46
NOTCH2	notch 2	1,00	1,19
Via EGFR			
EGF	epidermal growth factor	1,00	n.d.
EGFR	epidermal growth factor receptor	n.d.	n.d.
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase	1,00	1,32
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1,00	1,45
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	1,00	0,98
RHOB	ras homolog family member B	n.d.	n.d.

Via JAK/STAT

JAK1	Janus kinase 1	1,00	1,37
JAK2	Janus kinase 2	1,00	1,20
JAK3	Janus kinase 3	n.d.	n.d.
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	1,00	1,83
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	1,00	2,04
STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B	1,00	1,34
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6	1,00	1,17

Via PI3K/AKT/MTOR

AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	1,00	0,88
AKT2	AKT serine/threonine kinase 2	1,00	1,52
MTOR	mechanistic target of rapamycin	1,00	1,52
PIK3C2A	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha	1,00	1,62
PIK3C3	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	1,00	1,73
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	1,00	2,40
PTEN	phosphatase and tensin homolog	1,00	1,28

Via TGF-beta/SMAD

FOXO1	forkhead box O1	1,00	2,19
SMAD2	SMAD family member 2	1,00	3,35

SMAD4	SMAD family member 4	1,00	1,23
SMAD7	SMAD family member 7	1,00	1,52
TGFB1	transforming growth factor beta 1	1,00	1,15
TGFB2	transforming growth factor beta 2	1,00	2,43
TGFB3	transforming growth factor beta 3	1,00	1,50
Via PPAR			
PPARA	peroxisome proliferator activated receptor alpha	1,00	1,17
PPARD	peroxisome proliferator activated receptor delta	1,00	2,22
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma	1,00	5,46
PPARGC1A	PPARG coactivator 1 alpha	n.d.	n.d.
PPARGC1B	PPARG coactivator 1 beta	1,00	1,55
Estresse Oxidativo			
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1	1,00	0,63
OXS1	oxidative stress responsive 1	1,00	0,96
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1,00	0,78
TXN	thioredoxin	1,00	1,16
TXNRD1	thioredoxin reductase 1	1,00	1,71
Apoptose			
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	1,00	1,59
BAD	BCL2 associated agonist of cell death	1,00	0,61
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	1,00	1,30

BCL2	BCL2, apoptosis regulator	1,00	0,89
BID	BH3 interacting domain death agonist	1,00	0,96
CASP3	caspase 3	1,00	1,42
CASP7	caspase 7	1,00	1,34
DIABLO	diablo IAP-binding mitochondrial protein	1,00	0,80
FADD	Fas associated via death domain	1,00	1,42
FAS	Fas cell surface death receptor	1,00	1,28
PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1	1,00	0,66
Autofagia			
ATG12	autophagy related 12	1,00	1,12
ATG3	autophagy related 3	1,00	0,89
ATG5	autophagy related 5	1,00	0,85
BECN1	beclin 1	1,00	1,00
MAP1LC3A	microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha	1,00	n.d.
MAP1LC3B	microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	1,00	5,97
Necroptose			
RIPK1	receptor interacting serine/threonine kinase 1	1,00	1,33
RIPK2	receptor interacting serine/threonine kinase 2	1,00	1,65
RIPK3	receptor interacting serine/threonine kinase 3	1,00	1,00
Transição epitélio-mesenquimal			
CDH1	cadherin 1	n.d.	n.d.

SNAI1	snail family transcriptional repressor 1	1,00	0,93
SNAI2	snail family transcriptional repressor 2	n.d.	n.d.
SNAI3	snail family transcriptional repressor 3	1,00	0,81
TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1	1,00	0,29
VIM	vimentin	1,00	2,18
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	1,00	1,65
ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2	1,00	2,06

Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo - CTL). Os genes foram considerados regulados positivamente se $QR \geq 2$ e foram considerados regulados negativamente se $QR \leq 0,5$. N.d - Não determinado (significa nenhuma expressão gênica)

Apêndice B - Figura 1S. Artigo de revisão publicado durante o doutorado

Critical Reviews in Oncology / Hematology 160 (2021) 103277



Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

Cell signaling pathways as molecular targets to eliminate AML stem cells

Ana Carolina B. da C. Rodrigues, Rafaela G.A. Costa, Suellen L.R. Silva, Ingrid R.S.B. Dias, Rosane B. Dias, Daniel P. Bezerra *

Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, Bahia, 40296-710, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute myeloid leukemia
Cell signaling
Leukemic stem cells
Target therapy

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) remains the most lethal of leukemias and a small population of cells called leukemic stem cells (LSCs) has been associated with disease relapses. Some cell signaling pathways play an important role in AML survival, proliferation and self-renewal properties and are abnormally activated or suppressed in LSCs. This includes the NF- κ B, Wnt/ β -catenin, Hedgehog, Notch, EGFR, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR, TGF/ β SMAD and PPAR pathways. This review aimed to discuss these pathways as molecular targets for eliminating AML LSCs. Herein, inhibitors/activators of these pathways were summarized as a potential new anti-AML therapy capable of eliminating LSCs to guide future researches. The clinical use of cell signaling pathways data can be useful to enhance the anti-AML therapy.

1. Introduction

In 2018, the GLOBOCAN database estimated 437,033 new cases of leukemia and 309,006 deaths worldwide (Bray et al., 2018). According to the American Cancer Society, acute myeloid leukemia (AML) remains

the most lethal of leukemias, with a rate of relative 5-year survival (2008–2014) of 25 % in adults (20 years and over) and 67 % in patients aged 0–19 years (American Cancer Society, 2020).

AML affects undifferentiated cells, called blasts, with myeloid characteristics, and can be subclassified into eight subtypes, according to

Abbreviations: [PtdIns (3,4,5)P₃] (PIP3), phosphorylated to phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate; [PtdIns (4,5)P₂] (PIP2), phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate; AMH, anti-mullerianhormone; AML, acute myeloid leukemia; A-PACs, A-type proanthocyanidins; AP-1, activator protein 1; APC, adenomatous polyposis coli; Ara-C, cytarabine; ATM, ataxia telangiectasia mutated; BAFFR, B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor; BCR, B cell receptor; BM, bone marrow; BMP, bone morphogenetic proteins; CEBPA, CCAAT/enhancer-binding protein alpha; CK1 α , casein kinase 1 α ; Co-SMAD, common SMAD mediator; DMAPT, dimethylaminoparthenolide; DNMT1, DNA methyltransferase 1; DNMT3A, DNA methyltransferase 3 alpha; DVL, disheveled; ERK, extracellular signal regulated kinase; ETO, eight twenty one; FDA, Food and Drug Administration; FLT3, FMS-like tyrosine kinase 3; Frz, frizzled; GDFs, growth and differentiation factors; GMP, granulocyte-macrophages; GPCRs, G-protein coupled receptors; GSK3, glycogen synthase kinase 3; HSCs, hematopoietic stem cells; HSP, heat shock proteins; IFNs, interferons; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFR-1, insulin-like growth factor-1 receptor; IKK, I κ B kinase; IL, interleukin; IL-1R, interleukin-1 receptor; IRS1, insulin receptor substrate 1; I-SMADs, SMAD inhibitor; ITD, internal tandem duplication; JAK, Janus kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LEF, lymphocyte-enhancer-binding factor; LICs, leukemia initiator cells; LPA, lysophosphatidic acid; LSCs, leukemic stem cells; LTC-1C, long-term culture initiator cells; LT β R, lymphotoxin β -receptor; MDS, myelodysplastic syndromes; miRNA, microRNA; MLL, mixed lineage leukemia; mTOR, mammalian target of rapamycin; MUC1-C, MUC1 transmembrane C-terminal; NF- κ B, nuclear factor kappa B; NIK, NF- κ B-inducing kinase; NOD, non-obese diabetic; PCP, planar cell polarity; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PDK-1, phosphoinositide-dependent kinase-1; PDX, patient-derived xenograft; PH, pleckstrin homology; PI-103, propidium iodide; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinases; PLZF, promyelocytic leukemia zinc finger; PML, promyelocytic leukemia; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PPRE, peroxisome-proliferator responsive element; PTEN, phosphatase and tensin homolog; PYGO, pygopus homolog; RANK, receptor activator for nuclear factor κ B; Raptor, regulatory protein associated with mTOR; RAR α , retinoic acid receptor alpha; RHEB, Ras homolog enriched in brain; ROS, reactive oxygen species; R-SMAD, receptor-regulated SMAD; RUNX1, runt-related transcription factor 1; RXR, retinoid X receptor; SCID, severe combined immunodeficiency; siRNA, small interfering RNA; STAT, signal transducers and activators of transcription; TBL1, β -Like 1 transducing; TCF, T-cell factor; TCR, T cell receptor; TGFs, transforming growth factors; TKIs, tyrosine kinase inhibitors; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; TNFR, tumor necrosis factor receptor; TNFSF13, tumor necrosis factor ligand superfamily member 13; TSC, tuberous sclerosis complex; TSGs, tumor suppressor genes; TYK2, tyrosine kinase 2; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; VPS34, vacuolar protein sorting 34; Wnt, Wingless-Int; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein; β -TRCP, β -transducin repeat-containing protein.

* Corresponding author.

E-mail address: daniel.bezerra@fio cruz.br (D.P. Bezerra).<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103277>

Received 30 September 2020; Received in revised form 25 January 2021; Accepted 27 February 2021

Available online 11 March 2021

1040-8428/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Apêndice B - Figura 2S. Artigo de revisão publicado durante o doutorado

Redox Biology 62 (2023) 102692



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/redox

Emerging drugs targeting cellular redox homeostasis to eliminate acute myeloid leukemia stem cells

Rafaela G.A. Costa^a, Suellen L.R. Silva^a, Ingrid R.S.B. Dias^a, Maiara de S. Oliveira^a, Ana Carolina B. da C. Rodrigues^a, Rosane B. Dias^{a,b}, Daniel P. Bezerra^{a,*}^a Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, Bahia, 40296-710, Brazil^b Department of Propeudeutics, School of Dentistry of the Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, 40110-909, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute myeloid leukemia
Leukemia stem cells
Oxidative stress

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a very heterogeneous group of disorders with large differences in the percentage of immature blasts that presently are classified according to the specific mutations that trigger malignant proliferation among thousands of mutations reported thus far. It is an aggressive disease for which few targeted therapies are available and still has a high recurrence rate and low overall survival. The main reason for AML relapse is believed to be due to leukemic stem cells (LSCs) that have unlimited self-renewal capacity and long residence in a quiescent state, which promote greater resistance to traditional therapies for this cancer. AML LSCs have low oxidative stress levels, which appear to be caused by a combination of low mitochondrial activity and high activity of ROS-removing pathways. In this sense, oxidative stress has been thought to be an important new potential target for the treatment of AML patients, targeting the eradication of AML LSCs. The aim of this review is to discuss some drugs that induce oxidative stress to direct new goals for future research focusing on redox imbalance as an effective strategy to eliminate AML LSCs.

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a very heterogeneous group of disorders with large differences in the percentage of immature blasts that presently are classified according to the specific mutations that trigger malignant proliferation among thousands of mutations reported thus far [1–5]. The American Cancer Society estimated 20,380 new cases of AML and 11,310 deaths in the United States for 2023 [6].

According to the French-American-British (FAB) classification, AML can be subclassified into undifferentiated acute myeloblastic leukemia, acute myeloblastic leukemia with minimal maturation, acute myeloblastic leukemia with maturation, acute promyelocytic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia, acute monocytic leukemia, acute erythroid leukemia and acute megakaryoblastic leukemia [7–10].

In the most recent update of the World Health Organization (WHO) AML classification, there is a separation of AML with defining genetic abnormalities from AML defined by differentiation. AML with defining genetic abnormalities includes acute promyelocytic leukemia with *PML::RARA* fusion; AML with *RUNX1::RUNX1T1* fusion; AML with

CBFB::MYH11 fusion; AML with *DEK::NUP214* fusion; AML with *RBM15::MRTFA* fusion; AML with *BCR::ABL1* fusion; AML with *KMT2A* rearrangement; AML with *MECOM* rearrangement; AML with *NUP98* rearrangement; AML with *NPM1* mutation; AML with *CEBPA* mutation; AML myelodysplasia-related; and AML with other defined genetic alterations. AML defined by differentiation includes AML with minimal differentiation, AML without maturation, AML with maturation, acute basophilic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, acute monocytic leukemia, acute erythroid leukemia, and acute megakaryoblastic leukemia [11].

AML can affect individuals of any age; although it is the most common malignancy in children aged 15 years or younger, it becomes more common with aging. Generally, adults correspond to the group of individuals who are most affected by this type of neoplasm, which reduces the success of therapeutic alternatives due to age. Thus, the disease has a poor prognosis when compared to younger individuals affected by AML [4,12–14].

AML is an aggressive disease for which few targeted therapies are available. The standard protocol for treatment has remained almost unchanged for more than four decades and basically consists of the

* Corresponding author.

E-mail address: daniel.bezerra@fio cruz.br (D.P. Bezerra).<https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102692>

Received 24 February 2023; Received in revised form 28 March 2023; Accepted 29 March 2023

Available online 2 April 2023

2213-2317/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).