

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA



SUELLEN LAILA ROCHA SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL DA EMETINA EM ELIMINAR CÉLULAS-TRONCO
LEUCÊMICAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

SALVADOR, BAHIA
2023

SUELLEN LAILA ROCHA SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL DA EMETINA EM ELIMINAR CÉLULAS-TRONCO
LEUCÊMICAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) como requisito para obtenção do grau de Doutora em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

SALVADOR, BAHIA
2023

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Silva, Suellen Laila Rocha.

Estudo do potencial da emetina em eliminar células-tronco leucêmicas de leucemia mieloide aguda / Suellen Laila Rocha Silva. - 2023.

103 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2023.

1. Farmacologia. 2. Alcalóides. 3. Leucemia mieloide aguda. 4. Células-tronco. 5. Tumores. 6. Câncer - Tratamento. 7. Emetina. I. Bezerra, Daniel Pereira. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 615.321

CDU - 615.322



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



TERMO DE APROVAÇÃO

Suellen Laila Rocha Silva

**“ESTUDO DO POTENCIAL DA EMETINA EM
ELIMINAR CÉLULAS-TRONCO LEUCÊMICAS DE
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA”**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Doutorado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Aprovada em 19 julho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Daniel Pereira Bezerra

Dr. Daniel Pereira Bezerra
Fundação Oswaldo Cruz
PPGFAR
Orientador

Cynara Gomes Barbosa

Dr^a. Cynara Gomes Barbosa
Universidade Federal da Bahia

Gardenia Carmen Gadelha Militão

Dr^a. Gardenia Carmen Gadelha Militão
Universidade Federal de Pernambuco

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Universidade Federal do Piauí

Raquel Carvalho Montenegro

Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará

FONTE DE FINANCIAMENTO:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir completar mais esse ciclo e por todas as bênçãos que têm me sido concedidas.

Minha gratidão à Célia, minha mãe, e ao meu pai, Elias (*in memoriam*), por todo o sacrifício que fizeram para me proporcionar as oportunidades que me trouxeram até aqui e por todo amor que me dedicaram.

Ao meu marido Suélito Júnior, por todo o amor, apoio e cumplicidade, e por, junto com nossa cadela Fiona, tornar minha vida mais completa e feliz.

Ao meu irmão e sua família, por alegrarem meus dias e estarem sempre disponíveis para ajudar no que for possível.

A todos os amigos e colegas, tanto os que estão perto quanto os que estão longe, os que conheci a pouco e os de longa data, por fazerem parte do que sou.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pereira Bezerra, por todo o ensino, paciência e dedicação.

À Dr^a Milena Botelho Pereira Soares, coordenadora do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (FIOCRUZ/BA), e todos os colegas do LETI, onde realizei este trabalho, em especial à equipe de pesquisa em Oncologia e ao meu “grupinho” do RASIM.

Ao programa de pós-graduação em farmácia da UFBA e ao IGM/FIOCRUZ, por me proporcionarem a estrutura e a oportunidade de especialização com alta qualidade e excelência.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença com baixa taxa de sobrevivência em 5 anos. Uma das razões para essa alta mortalidade é a resistência das células-tronco leucêmicas (CTLs) aos tratamentos convencionais, levando à recorrência da doença. A via de sinalização NF-κB está ativada nas CTLs de LMA, tornando-se um alvo atrativo para a eliminação dessas células. A emetina (EMT), um antiparasitário utilizado clinicamente, mostrou inibir a sinalização NF-κB. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial antileucêmico da emetina em eliminar CTLs de LMA em modelo translacional *in vitro* e *in vivo* utilizando células KG-1a. **METODOLOGIA:** Inicialmente, EMT foi testada em um painel de células cancerosas e não cancerosas para determinar a CI_{50} e avaliar sua citotoxicidade. Em seguida, a presença e eliminação das CTLs foi identificada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos para CD34, CD38, CD13, CD33, CD123, CD97 e CD99. Ensaios para investigar o mecanismo de ação do composto utilizando a linhagem KG-1a foram realizados, incluindo ensaio de exclusão por azul de tripan, análise do padrão de morte celular, expressão de caspase-3 e PARP-1, ativação da via NF-κB, avaliação do ciclo celular, estresse oxidativo e despolarização mitocondrial. Além disso, foram realizadas análises por microscopia confocal, qPCR e ensaio *in vivo* utilizando camundongos NSG. **RESULTADOS:** EMT mostrou citotoxicidade contra todas as linhagens cancerosas testadas, com uma CI_{50} de 0,74 μ M para KG-1a. O composto também reduziu a porcentagem de células CD13, CD34, CD38, CD123, CD97 e CD99 positivas. Observou-se que EMT induziu morte celular apoptótica, aumentou a expressão de caspase-3 ativa e clivagem de PARP-1, promoveu a despolarização mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio e fragmentação do DNA internucleossomal, além de inibir a expressão de NF-κB. Dos 92 genes analisados por qPCR, 54 foram regulados positivamente e 5 foram regulados negativamente pelo composto. No modelo de xenoinxerto, o tratamento com EMT reduziu a quantidade de células leucêmicas na medula óssea e sangue dos camundongos. **CONCLUSÃO:** EMT demonstrou ser um composto citotóxico promissor, capaz de eliminar as CTLs de LMA *in vitro* e *in vivo*, induzindo a expressão de caspase-3 ativa, clivagem de PARP-1, geração de espécies reativas de oxigênio, fragmentação do DNA internucleossomal e inibição da via NF-κB em células KG-1a.

Palavras-chave: Antitumoral; Citotoxicidade; Leucemia mieloide aguda; Emetina; NF-κB; Células-tronco leucêmicas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Acute myeloid leukemia (AML) is a disease with a low 5-year survival rate. One of the reasons for this high mortality is the resistance of leukemic stem cells (CTLs) to conventional treatments, leading to disease recurrence. The NF- κ B signaling pathway is activated in AML CTLs, making it an attractive target for the elimination of these cells. Emetine (EMT), an antiparasitic used clinically, has been shown to inhibit NF- κ B signaling. **OBJECTIVE:** To evaluate the antileukemic potential of emetine in eliminating AML LSCs in an in vitro and in vivo translational model using KG-1a cells. **METHODOLOGY:** Initially, EMT was tested on a panel of cancerous and non-cancerous cells to determine the IC₅₀ and evaluate its cytotoxicity. Then, the presence and elimination of CTLs was identified by flow cytometry, using antibodies for CD34, CD38, CD13, CD33, CD123, CD97 and CD99. Assays to investigate the mechanism of action of the compound using the KG-1a strain were performed, including trypan blue exclusion assay, analysis of cell death pattern, expression of caspase-3 and PARP-1, activation of the NF- κ B pathway, evaluation of the cell cycle, oxidative stress and mitochondrial depolarization. In addition, analyzes were performed by confocal microscopy, qPCR and in vivo assay using NSG mice. **RESULTS:** EMT showed cytotoxicity against all cancer lines tested, with an IC₅₀ of 0.74 μ M for the KG-1a. The compound also reduced the percentage of CD13, CD34, CD38, CD123, CD97 and CD99 positive cells. It was observed that EMT induced apoptotic cell death, increased the expression of active caspase-3 and PARP-1 cleavage, promoted mitochondrial depolarization, generation of reactive oxygen species and internucleosomal DNA fragmentation, in addition to inhibiting the expression of NF- κ B. Of the 92 genes analyzed by qPCR, 54 were up-regulated and 5 were down-regulated by the compound. In the xenograft model, EMT treatment reduced the amount of leukemic cells in the bone marrow and blood of mice. **CONCLUSION:** EMT has shown to be a promising cytotoxic compound, able to eliminate AML LSCs in vitro and in vivo, inducing the expression of active caspase-3, cleavage of PARP-1, generation of reactive oxygen species, fragmentation of internucleosomal DNA and inhibition of NF- κ B pathway in KG-1a cells.

Keywords: Antitumor; Cytotoxicity; Acute myeloid leukemia; Emetine; NF- κ B; Leukemic stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Surgimento das células-tronco leucêmicas	22
Figura 2. Via de sinalização NF- κ B.	25
Figura 3. Estrutura química da EMT	27
Figura 4. Estratégia de análise das CTLs. Gates para os anticorpos CD13, CD33, CD34, CD38 e CD123.....	34
Figura 5. Estratégia de análise das CTLs e diferenciação. Gates para os anticorpos CD14, CD99 e CD97.....	34
Figura 6. Efeito da EMT sobre a viabilidade de células KG-1a determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripan	45
Figura 7. Efeito da EMT sobre a porcentagem de células positivas para os marcadores de células-tronco leucêmicas em células KG-1a.....	46
Figura 8. Efeito da EMT sobre os marcadores de CTL, CD99 e CD97, em células KG-1a após 24h e 72h de tratamento.....	47
Figura 9. Efeito da EMT sobre o marcador de diferenciação celular CD14 em células KG-1a após 48h de tratamento	48
Figura 10. Efeito da EMT sobre a morte de células KG-1a realizado por YO-PRO + IP após 12, 24, 48 e 72 h de incubação.	49
Figura 11. Dotplots representativos da marcação com YO-PRO + IP nos diferentes tempos testados.	50
Figura 12. Ativação de caspase-3 e clivagem de PARP-1 após o tratamento de células KG-1a com EMT 2 μ M.....	51
Figura 13. Efeito do inibidor de pan-caspase (Z-VAD (OMe)-FMK) na apoptose induzida pela EMT 2 μ M em células KG-1a	52
Figura 14. Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP e o uso do inibidor Z-VAD..	53
Figura 15. Efeito da EMT na despolarização da membrana mitocondrial	54

Figura 16. Efeito da EMT e 5-FU na sobrevivência de células WT-MEF e BAD-MEF pelo método alamar blue.....	55
Figura 17. Efeito da EMT sobre a morte de células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF realizados por Anexina V/IP.....	56
Figura 18. Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP nas células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF após o tratamento com EMT	57
Figura 19. Efeito da EMT nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) das células KG-1a usando coloração H2-DCF-DA	58
Figura 20. Efeito da EMT nos níveis de superóxido mitocondrial em células KG-1a usando coloração MitoSOX™ (RED).	59
Figura 21. Efeito do inibidor de espécies reativas de oxigênio, N-acetyl-L-cysteine (NAC), na apoptose induzida pela EMT em células KG-1a.....	60
Figura 22. Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP e o uso do inibidor NAC.....	60
Figura 23. Histogramas representativos da análise do conteúdo de DNA de células KG-1a após o tratamento com EMT.....	62
Figura 24. Expressão de NF-κB em células KG-1a após o tratamento com EMT por 24h.....	64
Figura 25. Microscopia Confocal de células KG-1a marcadas com anticorpo anti-NF-κB p65 PE	66
Figura 26. Análise de qPCR para vários genes em células KG-1a	68
Figura 27. Efeito <i>in vivo</i> da EMT sobre células KG-1a inoculadas em camundongos NSG	70
Figura 28. Fotomicrografias representativas dos órgãos de camundongos NSG transplantados com células de LMA (KG-1a) tratados com EMT.....	73
Figura 29. Mecanismo de ação resumido da emetina em células KG-1a.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de estadiamento da OMS (Organização Mundial de Saúde) atualizado em 2022.	18
Tabela 2. Atividade citotóxica de EMT em diferentes tipos histológicos.	43
Tabela 3. Índice de seletividade da EMT.	44
Tabela 4. Efeito da EMT sobre a distribuição do conteúdo de DNA celular.	63
Tabela 5. Efeito da EMT no peso e sobrevivência dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a.	71
Tabela 6. Efeito da EMT no peso dos órgãos dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analisis of Variance (Análise de variância)
ATCC	American Type Culture Collection
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CTL	Células-tronco leucêmicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro padrão da média
EMT	Emetina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAB	Franco-americana-britânica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H2-DCF-DA	Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
IS	Índice de seletividade
IP	Iodeto de Propídio
LMA	Leucemia mielóide aguda
MFI	Média de intensidade de fluorescência
mg	Miligrama
ml	Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
NAC	N-acetil-L-cisteína
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NIH	National Institutes of Health (Instituto Nacional da Saúde)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares do sangue periférico)
PHHN	Progenitores hematopoiéticos humanos normais
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
QR	Quantificação relativa
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
1.1	Leucemia	15
1.2	Leucemia Mieloide Aguda	16
1.3	Tratamento da Leucemia Mieloide Aguda	19
1.4	Células-tronco leucêmicas	21
1.5	Fator nuclear kappa B (NF-κB)	24
1.6	Emetina	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Obtenção do composto	31
3.2	Obtenção e manutenção das células em cultura	31
3.3	Avaliação da citotoxicidade - Ensaio do alamar blue	32
3.4	Avaliação da Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripán	32
3.5	Ensaio de identificação e quantificação de células-tronco leucêmicas	33
3.6	Avaliação <i>in vitro</i> do padrão de morte celular apoptótica	35
3.7	Análise de Caspase-3 e PARP-1	35
3.8	Análise do potencial transmembrânico mitocondrial	36
3.9	Quantificação das espécies reativas de oxigênio intracelular	36
3.10	Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA	37
3.11	Análise da expressão de NF-κB p65 (pS529 e pS536)	38
3.12	Western blot	38
3.13	Microscopia confocal	39
3.14	Análise da expressão gênica por qPCR	39
3.15	Ensaio <i>in vivo</i> – Xenotransplante em camundongos NSG	40
3.16	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	42
4.1	EMT apresenta citotoxicidade frente diversas linhagens celulares	42
4.2	EMT é capaz de eliminar células-tronco leucêmicas de LMA	46

4.3	EMT induz a morte celular apoptótica mediada por caspases em células KG-1a.....	48
4.4	EMT induz estresse oxidativo em células KG-1a	57
4.5	EMT causa fragmentação do DNA em células KG-1a	61
4.6	A EMT inibe a via NF-κB nas células KG-1a.....	64
4.7	A EMT afeta a regulação de diversos genes.....	67
4.8	EMT inibe o desenvolvimento <i>in vivo</i> de células KG-1a.....	69
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÃO	85
7	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE.....	97

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Leucemia

As leucemias são um conjunto de doenças hematológicas malignas caracterizadas pela proliferação excessiva de leucócitos, resultando no aumento do número dessas células no sangue e na medula óssea, substituindo as células sanguíneas normais (Lyengar e Shimanovsky, 2020). Existem mais de 12 tipos de leucemia, que são classificados principalmente com base na célula de origem, se é mieloide ou linfóide, e na velocidade de crescimento das células malignas, se é crônica (crescimento mais lento/com células diferenciadas não funcionais) ou aguda (crescimento mais rápido/com células não diferenciadas – blastos leucêmicos). Os quatro tipos primários de leucemia são: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (INCA, 2022).

Em termos gerais, as leucemias ocupam a 14ª posição no ranking dos cânceres mais incidentes no mundo, com 474.519 mil casos, e são a 11ª causa de morte, resultando em 311.594 mil mortes por ano, de acordo com os dados de 2020 (Sung, 2021). No Brasil, estima-se que essa doença cause 11.540 mil novos casos por ano para cada ano do triênio de 2023 a 2025, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres, o que coloca as leucemias em 10º lugar entre os cânceres mais incidentes, excluindo os tumores de pele não melanoma. No que diz respeito ao número de mortes, essa doença causa 6.738 mil mortes por ano, sendo o 12º câncer mais letal em 2020 (Brasil, 2022; INCA, 2022).

As leucemias podem ter origem em fatores genéticos, predominantemente, e em menor medida, fatores ambientais. A idade é um fator de risco para o desenvolvimento da doença, exceto no caso da LLA. O tabagismo, a exposição prévia à radioterapia ou a certos agentes quimioterápicos, a exposição ao benzeno, formaldeído e às radiações X e gama são outros fatores de risco. Além disso, temos as síndromes genéticas como a

síndrome de Down e a anemia de Fanconi, assim como outras doenças hereditárias e histórico familiar, além infecções, como pelo vírus do HTLV-1 ou Epstein-Barr, contribuindo para o desenvolvimento das leucemias (American Cancer Society, 2022).

1.2 Leucemia Mieloide Aguda

A LMA é uma doença hematológica maligna de rápida progressão que afeta as células da linhagem mieloide. Caracteriza-se pela proliferação clonal de células-tronco hematopoiéticas e progenitoras (CTHPs), bem como pela interrupção da diferenciação das células precursoras mieloides. Essas células precursoras, conhecidas como blastos, apresentam alta capacidade de proliferação e acabam substituindo as células sanguíneas normais na medula óssea (Rodrigues et al., 2021; Granroth et al., 2022).

As CTHPs se desenvolvem na medula óssea e dão origem às células sanguíneas, que podem se tornar linfócitos ou células mieloides, como glóbulos vermelhos (hemácias), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas. Quando ocorrem alterações no DNA das células mieloides normais, como a ativação de oncogenes ou a desativação de genes supressores de tumor, elas podem se transformar em células leucêmicas. A LMA apresenta mutações em diversos genes, além de alterações cromossômicas, o que contribui para sua alta heterogeneidade e para a existência de diferentes classificações para a doença (American Cancer Society, 2020; Pelosi et al., 2023).

A classificação franco-americano-britânica (FAB), estabelecida em 1970, divide a LMA em oito tipos, de M0 a M7, com base no tipo de célula e no grau de maturidade da célula a partir da qual a leucemia se desenvolve. Esses tipos são os seguintes: M0, leucemia mieloblástica aguda indiferenciada; M1, leucemia mieloblástica aguda com mínima maturação; M2, leucemia mieloblástica aguda com maturação; M3, leucemia promielocítica aguda; M4, leucemia mielomonocítica aguda; M4 eos, leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia; M5, leucemia monocítica aguda; M6, leucemia eritroide aguda; e M7,

leucemia megacarioblástica aguda (American Cancer Society, 2020; Bennett et al., 1976, 1985a; Bennett et al., 1985b, 1991).

Embora o sistema FAB seja útil, ele não leva em consideração alguns dos fatores que afetam o prognóstico da doença. Portanto, em 2022, a Organização Mundial de Saúde (OMS) atualizou a classificação da LMA, levando em consideração os avanços recentes no entendimento e no manejo da doença, incorporando características morfológicas, imunológicas, citogenéticas, genéticas e clínicas. Com isso, a LMA foi subdividida em diferentes categorias.

A primeira categoria é a LMA com anormalidades genéticas definidoras, que inclui subtipos como a leucemia promielocítica aguda com a fusão LMP::*RARA*; LMA com fusão RUNX1::*RUNX1T1*, CBFB::*MYH11*, DEK::*NUP214*, RBM15::*MRTFA*, BCR::*ABL1*; LMA com rearranjo em KMT2A, MECOM, NUP98; LMA com mutação em NPM1 e CEBPA; LMA relacionada à mielodisplasia e LMA com outras alterações genéticas específicas (Khoury et al., 2022).

A segunda categoria é a LMA definida por diferenciação, que engloba subtipos como LMA com mínima diferenciação, sem maturação, com maturação, mielomonocítica aguda, basofílica aguda, monocítica aguda, eritroide aguda e megacarioblástica aguda (Khoury et al., 2022; Rodrigues et al., 2022). A tabela 1 apresenta o estadiamento da leucemia baseada na OMS 2022.

Além dessa subdivisão com base na diferenciação, a LMA pode ser classificada de acordo com sua origem em três grupos distintos: LMA de novo, quando ocorre sem eventos predisponentes anteriores; LMA secundária, quando a doença se desenvolve após uma neoplasia mieloide pré-existente; e LMA relacionada à terapia, que surge como resultado de eventos mutagênicos induzidos por quimioterapia citotóxica e/ou radioterapia. Essas categorias auxiliam na compreensão da etiologia da LMA e podem ter implicações significativas no prognóstico do paciente (Pelosi et al., 2023; Khoury et al., 2022; Rodrigues et al., 2022).

Tabela 1. Sistema de estadiamento da OMS (Organização Mundial de Saúde) atualizado em 2022 (KHOURY et al., 2022).

LMA COM ANORMALIDADES GENÉTICAS DEFINIDORAS	LMA DEFINIDA POR DIFERENCIAÇÃO
Leucemia promielocítica aguda com a fusão PML::RARA	LMA com diferenciação mínima
LMA com fusão RUNX1::RUNX1T1	LMA sem maturação
LMA com fusão CBFβ::MYH11	LMA com maturação
LMA com fusão DEK::NUP214	Leucemia mielomonocítica aguda
LMA com fusão RBM15::MRTFA	Leucemia basofílica aguda
LMA com fusão BCR::ABL1	Leucemia monocítica aguda
LMA com rearranjo em KMT2A	Leucemia eritroide aguda
LMA com rearranjo MECOM	Leucemia megacarioblástica aguda
LMA com rearranjo NUP98	
LMA com mutação em NPM1	
LMA com mutação em CEBPA	
LMA relacionada à mielodisplasia	
LMA com outras alterações genéticas específicas	

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a American Cancer Society (2023), dos 59.610 novos casos de leucemia diagnosticados nos Estados Unidos, no ano de 2023 a LMA será responsável por 20.380 desses casos e resultará em 11.310 mortes. Embora a LMA possa afetar indivíduos de qualquer idade, ela é mais comum em crianças com 15 anos ou menos e se torna mais frequente à medida que a idade avança. Os adultos são o grupo mais afetado por essa forma de leucemia, e a idade é um fator de prognóstico desfavorável, o que pode afetar negativamente as opções de tratamento disponíveis (Bower et al., 2016; Bosshard et al., 2018; Shallis et al., 2019; Granroth et al., 2022).

A LMA destaca-se por ser a forma de leucemia mais letal, apresentando taxas de sobrevida em 5 anos de apenas 25% para adultos com 20 anos ou mais

e 67% para indivíduos entre 0 e 19 anos, com base nos dados de 2008 a 2014 (American Cancer Society, 2020). Esses números indicam um prognóstico desfavorável e uma baixa taxa de sobrevivência em geral para os pacientes com LMA. Embora o tratamento atual possa levar a altas taxas de remissão, a maioria dos pacientes acaba sofrendo recidiva da doença (Rodrigues et al., 2020).

1.3 Tratamento da Leucemia Mieloide Aguda

O tratamento principal para a LMA é a quimioterapia, que envolve o uso de medicamentos antineoplásicos para destruir ou controlar as células cancerosas. É crucial iniciar o tratamento o mais rápido possível, uma vez que a doença apresenta uma rápida progressão. O tratamento é dividido em três fases principais: indução, consolidação e manutenção (Tian & Chen, 2022).

A fase de indução da remissão tem como objetivo eliminar rapidamente o maior número possível de células leucêmicas do sangue e da medula óssea. Para isso, os pacientes recém-diagnosticados são submetidos a uma terapia chamada "7 + 3". Essa terapia envolve o uso contínuo de citarabina (ara-C) por 7 dias, combinado com infusões curtas de uma antraciclina (daunorrubicina ou idarrubicina) nos primeiros 3 dias (American Cancer Society, 2019; Tian & Chen, 2022).

Após a recuperação do paciente e confirmação da remissão durante a fase de indução, inicia-se a fase de consolidação. Nessa fase, leva-se em consideração o risco do paciente com base em características citogenéticas, moleculares e clínicas, e os pacientes são classificados em grupos de alto risco, risco médio ou baixo risco. O objetivo dessa fase é eliminar as células residuais da leucemia e prevenir recaídas. Em alguns casos, pode ser utilizada uma terceira fase, chamada de fase de manutenção, com o objetivo de evitar o retorno da leucemia por um período mais longo. Nessa fase, o tratamento é administrado em doses mais baixas ao longo de um período prolongado.

É importante mencionar que o uso de quimioterapia pode causar efeitos adversos, uma vez que esses fármacos muitas vezes são pouco seletivos e frequentemente afetam não apenas as células neoplásicas, mas também as células normais do corpo. Alguns efeitos colaterais comuns incluem perda de cabelo, perda de apetite, náuseas, vômitos, fadiga e falta de ar, entre outros. No entanto, a maioria dos efeitos colaterais tende a desaparecer após o término do tratamento (American Cancer Society, 2019; Tian & Chen, 2022).

Medicamentos que visam partes específicas das células cancerosas podem ser úteis no tratamento da LMA mesmo quando a quimioterapia padrão falha. Esses fármacos podem ser utilizados em combinação com a quimioterapia para melhorar a eficácia do tratamento. Alguns exemplos desses medicamentos incluem inibidores de FLT3 (Fator estimulador de colônia de macrófagos - like tirosina quinase 3), como midostaurina e gilteritinib, que são eficazes em pacientes com mutações do gene FLT3; inibidores de PML-RARA, como o ácido transretinoico nos casos de leucemia promielocítica aguda; inibidores de IDH (Isocitrato desidrogenase 1), como ivosidenib, olutasidenib e enasidenib, que são direcionados a mutações específicas do gene IDH; inibidor de BCL-2 (Linfoma de células B-2), como venetoclax, que tem como alvo a proteína BCL-2 envolvida na sobrevivência celular; inibidor da via Hedgehog, como glasdegib, que pode ser utilizado em combinação com a quimioterapia; e gemtuzumab ozogamicina, um anticorpo monoclonal que se liga ao CD33 nas células leucêmicas (American Cancer Society, 2019).

Além desses medicamentos direcionados, outros tratamentos podem ser utilizados na LMA. O transplante de células-tronco hematopoiéticas é considerado a melhor opção de tratamento para pacientes com LMA de alto risco. A imunoterapia, que estimula o sistema imunológico do paciente a combater as células cancerosas, tem se mostrado promissor no tratamento da LMA, com potencial para altas taxas de resposta e menor toxicidade. A radioterapia também pode ser usada em casos específicos da LMA, seja para destruir as células leucêmicas, para aliviar dores ou antes do transplante de células-tronco (Tian & Chen, 2022).

O tratamento para a LMA visa obter a destruição das células leucêmicas para levar a remissão completa. É importante ressaltar que, apesar dos avanços no tratamento, a recidiva da doença ainda é um desafio significativo devido a existência da doença residual mínima. A alta taxa de recorrência está relacionada à presença de células-tronco leucêmicas (CTLs) que não são efetivamente eliminadas pelas terapias convencionais. Portanto, a pesquisa contínua é necessária para desenvolver novas abordagens terapêuticas visando as CTLs e melhorar a sobrevida global dos pacientes com LMA (Ding et al., 2012; Ngai et al., 2021; Heuser et al., 2021; Stelmach et al., 2023).

1.4 Células-tronco leucêmicas

A formação das células sanguíneas e da medula óssea é conhecida como hematopoiese. Essa hematopoiese normal se inicia com as células-tronco hematopoiéticas multipotentes, que têm a capacidade de se dividir em uma célula progenitora multipotente ou se autorrenovar. Duas linhagens celulares principais podem ser geradas a partir das células progenitoras multipotentes: progenitor mieloide comum, que dá origem aos granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e monócitos; e progenitor linfoide comum, que dá origem a células natural killer (NK), linfócitos B e linfócitos T. As células mieloides se proliferam e amadurecem na medula óssea, enquanto os precursores linfoides migram para órgãos linfoides, como linfonodos, baço e timo, para completar seu processo de maturação (Zhang et al., 2018).

Já a transformação das CTH normais em CTLs envolve uma hematopoiese anormal ocorrem alterações genéticas e epigenéticas que afetam a autorrenovação, proliferação e sobrevivência das células. Essas alterações podem ocorrer ao longo do tempo e levar à progressão da doença. Inicialmente, as alterações genéticas ou epigenéticas ocorrem em CTH normais, resultando em células-tronco pré-leucêmicas. Essas células pré-leucêmicas têm uma capacidade aprimorada de autorrenovação, o que significa que elas podem se multiplicar e se replicar mais do que CTH normais. No entanto, as células pré-leucêmicas ainda não são completamente transformadas em células leucêmicas.

À medida que ocorrem mais alterações moleculares nessas células, vias de sinalização podem ser afetadas, promovendo a proliferação celular descontrolada e a sobrevivência prolongada. Esse processo leva à transformação completa das células pré-leucêmicas em CTLs, que são capazes de se diferenciar em blastos leucêmicos imaturos (Figura 1) (Gurska et al., 2019).

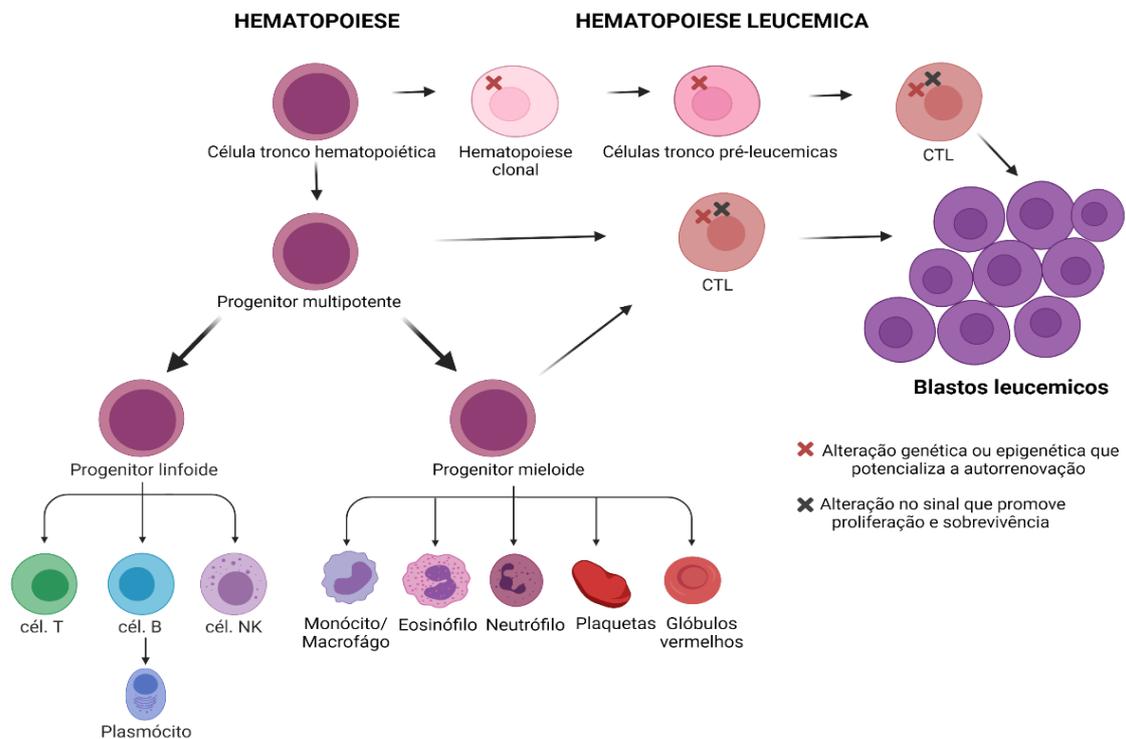


Figura 1. Surgimento das células-tronco leucêmicas. Fonte: adaptado de Gurska et al., 2019.

As CTLs são uma população de células que possuem características únicas, e são definidas por terem capacidade de autorrenovação, potencial de repovoamento ilimitado e a permanência em um estado quiescente, permanecendo por um longo período em G0/G1 (Lapidot et al., 1994; Pollyea et al., 2014). Essas características fazem com que essas células estejam fortemente ligadas à ocorrência de metástases, recidivas, resistência a múltiplos fármacos e resistência à radiação. Essas células persistentes podem permanecer no corpo mesmo após o tratamento inicial, agindo como um reservatório de células resistentes que têm o potencial de desencadear recidivas e metástases (Yang et al., 2020; Stelmach & Trumpp 2023).

A população de CTLs pode ser identificada e isolada com base na expressão dos marcadores de superfície CD34+/CD38- (Bonnet e Dick, 1997), semelhante aos progenitores hematopoiéticos humanos normais (PHHN). Estas células também expressam preferencialmente outros marcadores, como CD123, CD47, CD44, CLL-1, CD96, CD90, CD32, CD25, TIM-3 (Zhou e Chng, 2014), CD93 (Iwasaki et al., 2015), CD97 (Martin et al., 2019) e CD99 (Chung et al., 2014; 2017).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na formação e função das CTLs é crucial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes que visem essas células resistentes. Atualmente as pesquisas estão focadas em identificar alvos terapêuticos específicos nas CTLs e desenvolver estratégias para eliminá-las ou inibir sua capacidade de autorrenovação, a fim de melhorar os resultados de tratamento e a sobrevida dos pacientes com LMA (Gurska et al., 2019).

Os esforços no desenvolvimento de terapias para a LMA têm sido direcionados para eliminar as CTLs enquanto preservam as células-tronco normais. Para isso, busca-se identificar quais estímulos apoptóticos podem afetar especificamente as CTLs (Jordan e Guzman, 2004). Várias vias de sinalização têm sido estudadas nesse sentido, uma vez que desempenham papéis importantes na sobrevivência, proliferação e capacidade de autorrenovação das células da LMA. Algumas dessas vias incluem NF- κ B, Wnt/ β -Catenina, Hedgehog, Notch, EGFR, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR, TGF/SMAD e PPAR, que frequentemente apresentam ativação anormal ou supressão nas CTLs (Rodrigues et al., 2020).

O objetivo dessas abordagens terapêuticas é encontrar estratégias que inibam seletivamente as vias de sinalização anormais nas CTLs, impedindo sua sobrevivência e autorrenovação. Ao direcionar especificamente as CTLs, espera-se reduzir a recorrência da doença e melhorar os resultados do tratamento para os pacientes com LMA. No entanto, é importante ressaltar que a pesquisa nesse campo ainda está em andamento, e o desenvolvimento de

terapias direcionadas às CTLs é um desafio contínuo na busca por melhores opções terapêuticas para a LMA.

1.5 Fator nuclear kappa B (NF-κB)

O fator nuclear que se liga ao elemento potencializador da cadeia leve kappa de imunoglobulina de células B ativadas, ou simplesmente fator nuclear kappa B (NF-κB) é um complexo proteico dimérico que desempenha um papel importante em múltiplos processos fisiológicos e patológicos. Ele foi descoberto em 1986 e tem sido amplamente estudado desde então. O NF-κB atua como um fator de transcrição, o que significa que ele regula a expressão de genes específicos (Sun, 2017; Yu et al., 2020).

Uma das funções bem estabelecidas do NF-κB é sua ação pró-inflamatória. Ele desempenha um papel chave na resposta inflamatória do organismo, regulando a expressão de genes envolvidos na produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e moléculas de adesão celular, estando envolvido na ativação do sistema imunológico inato e na resposta inflamatória a lesões ou infecções. Além disso, o NF-κB também possui uma conhecida ação antiapoptótica, regulando a expressão de genes que inibem a apoptose, permitindo que as células sobrevivam em condições desfavoráveis. Essa propriedade antiapoptótica do NF-κB é importante em diversas doenças, incluindo no câncer, onde contribui para o crescimento e progressão tumoral (Sun, 2017; Rodrigues et al., 2021).

Os membros dessa família são: NF-κB1 (p50 e seu precursor p105), NF-κB2 (p52 e seu precursor p100), RelA (p65), RelB e c-Rel (Khosravi et al., 2018). A ativação do NF-κB pode ocorrer por meio das vias canônica ou não canônica. Na via canônica, a ativação ocorre em resposta a uma diversidade de estímulos externos envolvidos na resposta imune, inflamação, proliferação celular, diferenciação e sobrevivência. No estado inativo da via, os heterodímeros p65 e p50 encontram-se no citosol, complexados com a proteína inibidora IκBα, impedindo sua translocação para o núcleo. A ocorrência de sinais extracelulares

leva à dissociação de I κ B α de p65/p50 e à sua degradação proteossômica, permitindo a ativação dos dímeros e sua translocação para o núcleo, resultando na ativação de genes-alvo (Sun, 2017; Yu et al., 2020; Rodrigues et al., 2021).

Por outro lado, a ativação da via não canônica é principalmente mediada pelos receptores da superfamília de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e está relacionada ao desenvolvimento de células imunes. Na ativação não canônica, os heterodímeros RelB e p52 são responsáveis pela transcrição dos genes-alvo. A forma p100 bloqueia a translocação de RelB para o núcleo, sendo necessário o seu processamento e degradação pelo proteassoma para que RelB/p52 seja translocado para o núcleo e, assim, ative os genes-alvo (Sun, 2017; Yu et al., 2020; Rodrigues et al., 2021). Na figura 2 podemos ver os componentes e a cascata de ativação de cada uma dessas vias.

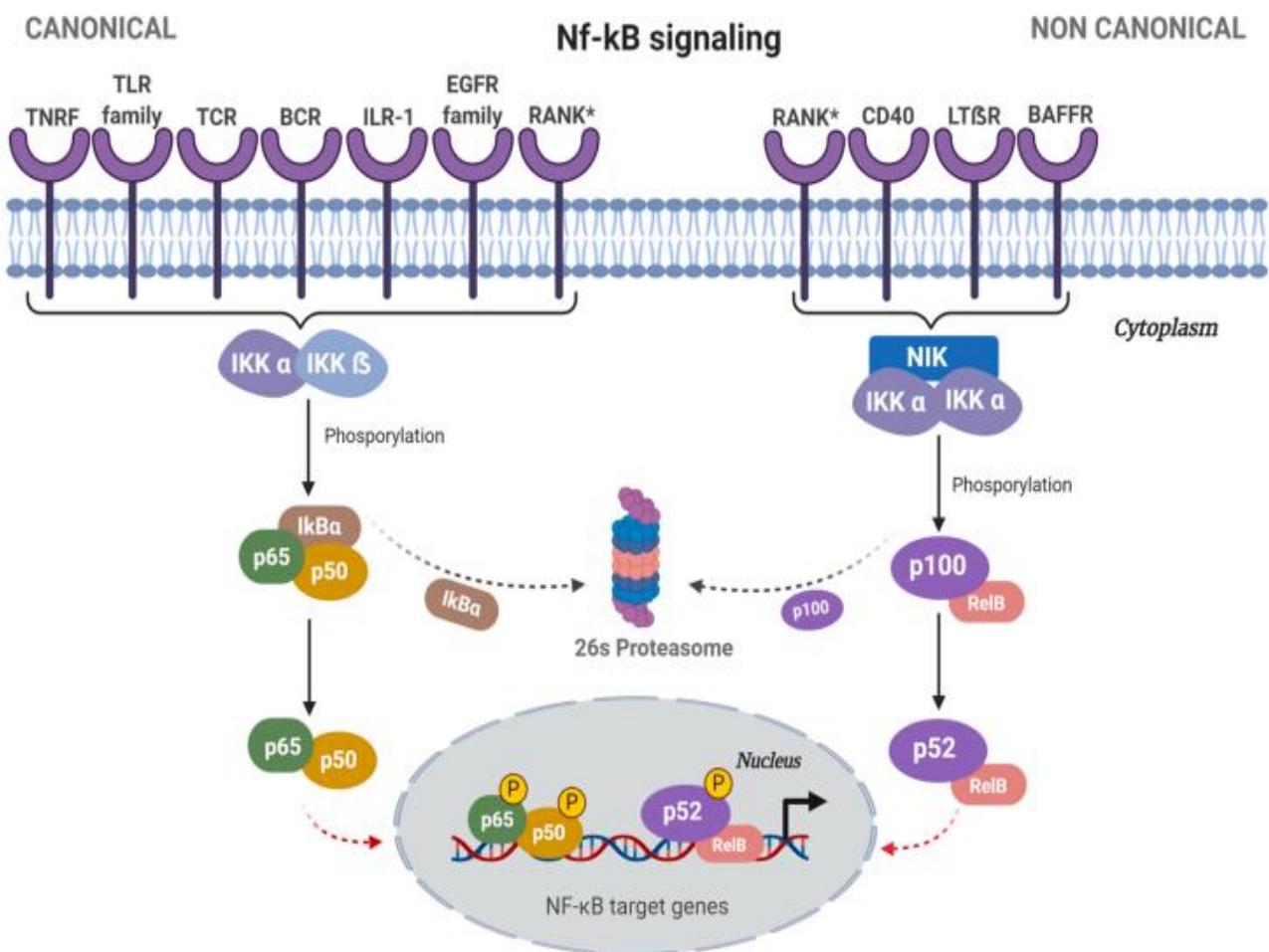


Figura 2. Via de sinalização NF-κB. Fonte: Rodrigues et al., 2021.

A ocorrência de desregulação em NF- κ B está associada a doenças como inflamação crônica, imunodeficiência e câncer, estabelecendo-se como um elo entre inflamação e progressão tumoral. Essa via de sinalização é regulada de forma positiva em neoplasias hematológicas e cânceres sólidos, desempenhando um papel importante nas células cancerosas ao promover resistência a medicamentos, favorecer a sobrevivência e atuar como fator antiapoptótico (Wang et al., 2017).

Acredita-se que um dos mecanismos pelos quais as CTLs podem evitar a apoptose é através da regulação positiva do NF- κ B ou da regulação negativa de Fas/CD95, que são receptores de morte celular (Wang et al., 2017). A atividade anormal dessa via de sinalização pode ocorrer devido a mutações nos genes que a codificam e/ou em seus inibidores; pela ativação constitutiva de IKKs ou devido à exposição a estímulos inflamatórios no microambiente tumoral (Zhou et al., 2015).

Na LMA, a ativação anormal NF- κ B tem sido observada e está associada à resistência à apoptose e ao crescimento descontrolado das células leucêmicas. Inibir seletivamente a atividade do NF- κ B nas células de LMA é uma estratégia terapêutica em investigação para combater a resistência às terapias convencionais e melhorar os resultados do tratamento (Jordan e Guzman, 2004; Zhou et al., 2015).

Dado o papel da via NF- κ B em promover a proliferação e manutenção de CTLs, o *National Institutes of Health (NIH) Chemical Genomics Center* (EUA) conduziu uma triagem de alto rendimento com aproximadamente 2.800 medicamentos clinicamente aprovados e compostos bioativos de sua coleção, buscando identificar pequenas moléculas capazes de inibir essa sinalização. Entre todas as moléculas testadas, 19 apresentaram atividade inibitória de NF- κ B, incluindo a emetina (Miller et al., 2010).

1.6 Emetina

A emetina (EMT) é um alcaloide isoquinolínico de origem natural (Figura 3), extraído da raiz da planta *Cephaelis ipecacuanha*, popularmente conhecida como ipeca ou poaia. Essa planta é nativa do Brasil e América Central. Por séculos, os índios utilizaram extratos das raízes para induzir vômito em casos de envenenamento e como antídoto para picadas de cobra (OMS, 2007). A EMT possui propriedades expectorantes, é capaz de induzir o vômito e tem ação contra protozoários, como amebas. Ela é utilizada clinicamente como agente de segunda linha para o tratamento de infecções por protozoários desde os anos 1900 (Yousefi et al., 2021).

Esse composto é conhecido por ser um inibidor da síntese de biomoléculas, como proteínas, atuando como um inibidor da tradução. Além disso, a EMT é capaz de interagir com o DNA (Wink e Latz-bruning, 1998). Seu mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de proteínas ribossomais, impedindo a incorporação do aminoacil-sRNA em ligações polipeptídicas (Yousefi et al., 2021).

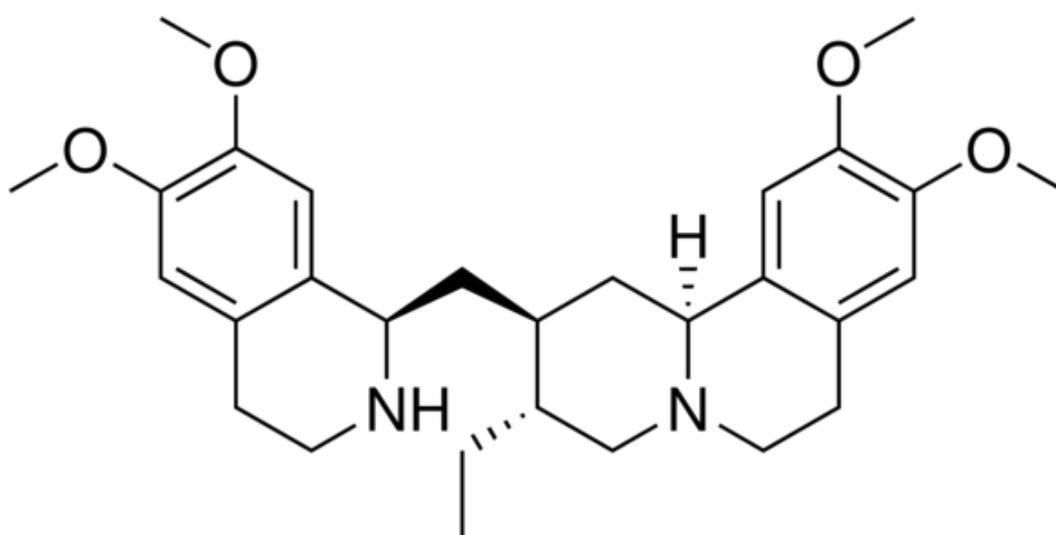


Figura 3. Estrutura química da EMT. Fonte: Sigma-Aldrich.

Os medicamentos podem apresentar efeitos biológicos diferentes daqueles para os quais foram originalmente desenvolvidos. A investigação desses medicamentos conhecidos em busca de novos efeitos biológicos é conhecida como reposicionamento de fármacos. Essa abordagem permite a reutilização desses medicamentos para o tratamento de outras doenças. As vantagens incluem maior rapidez, menor custo e possivelmente uma taxa de sucesso maior no tratamento. Por exemplo, a EMT tem se mostrado um potente inibidor de infecções virais, como o vírus Zika, HIV e SARS-CoV-2. Esse medicamento tem sido relatado como capaz de suprimir a replicação viral, reduzindo assim a entrada do vírus nas células (Yousefi et al., 2021).

As propriedades antitumorais da EMT também são destacadas e têm sido relatadas ao longo dos anos para vários tipos de câncer, incluindo leucemias, linfomas, câncer de ovário, pulmão e bexiga, atuando por meio de diferentes vias (Alam et al., 2020). O principal mecanismo atribuído à sua atividade anticancerosa é a capacidade de afetar o splicing alternativo de Bcl-x, resultando na regulação positiva da variante de splicing Bcl-xS, que promove a apoptose em células malignas, e na regulação negativa de Bcl-xL, que é uma variante antiapoptótica (Boon-Unge et al., 2007; Yosifov et al., 2020). Dessa forma, esse fármaco pode ser considerado um agente citotóxico para a terapia do câncer, podendo também ser utilizado em combinação com outros quimioterápicos para obter efeitos sinérgicos ou superar a multirresistência (Möller et al., 2007).

Estudos utilizando sistemas de triagem molecular indicaram que a EMT é capaz de bloquear a autorrenovação das células-tronco de glioblastoma. Além disso, foi observada a inibição da via de sinalização de Hedgehog, por meio da interação com as proteínas Hedgehog, Gli e Smoothened, que são importantes para a biologia das células-tronco cancerosas. Adicionalmente, EMT inibe a sinalização Wnt no câncer de mama e suprime a formação de esferoides, o que indica seu potencial em inibir as células-tronco do câncer de mama (Sun et al., 2019).

Na LMA, a EMT demonstrou induzir apoptose *ex vivo* e *in vitro*, bem como promover diferenciação parcial das células. Além disso, foi observada ativação transcricional de genes envolvidos na diferenciação mielóide e redução da capacidade clonogênica das células leucêmicas, com pouco efeito sobre as células sanguíneas maduras da medula óssea e periféricas. Não foram relatados efeitos supressores na medula óssea em ensaios clínicos com o uso da EMT, o que sugere um efeito antileucêmico específico. Notavelmente, as amostras de LMA com citogenética de alto risco mostraram maior sensibilidade à EMT, e a combinação de EMT com ara-C demonstrou sinergia na indução de citotoxicidade em células de LMA. Isso indica que a EMT pode atuar como um quimiossensibilizador em células resistentes à quimioterapia, o que pode contribuir para a eliminação de CTLs (Cornet-Masana et al., 2016).

Além disso, a EMT também exibiu inibição da via NF- κ B, conforme identificado em um *screening* realizado pelo NIH em 2010, com uma concentração inferior a 20 nM. Além da inibição da fosforilação de I κ B α , EMT promoveu a ativação das caspases 3/7 e apresentou citotoxicidade em células de câncer cervical (Miller et al., 2010). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antileucêmico da EMT na eliminação de CTLs da LMA humana em um modelo translacional *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antileucêmico da EMT em eliminar CTLs de LMA humana em modelo translacional *in vitro* e *in vivo* utilizando células KG-1a.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da EMT em diferentes linhagens celulares;
- Avaliar a capacidade do composto em eliminar CTLs de células KG-1a;
- Analisar a expressão da caspase-3 ativa e PARP-1 clivada em células KG-1a após o tratamento;
- Avaliar o padrão de morte celular em células KG-1a;
- Analisar a ocorrência de alteração no potencial transmembrânico mitocondrial após o tratamento;
- Verificar a indução de estresse oxidativo em células KG-1a;
- Analisar as alterações sobre o ciclo celular em células KG-1a após o tratamento;
- Avaliar a capacidade do composto em inibir NF- κ B em células KG-1a;
- Verificar o efeito do composto sobre a expressão de um painel de genes em células KG-1a;
- Determinar o efeito do composto contra CTLs *in vivo* por xenoenxerto de células KG-1a.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do composto

A EMT (Sigma-Aldrich) foi obtida comercialmente.

3.2 Obtenção e manutenção das células em cultura

Foram utilizadas as linhagens celulares cancerosas MCF-7 (Adenocarcinoma de mama humano), 4T1 (Carcinoma de mama estágio IV), SSC-9 (Carcinoma de células escamosas humano), SSC-25 (Carcinoma de células escamosas humano), HCT116 (Carcinoma de cólon humano), HepG2 (Carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (Melanoma murino), HSC-3 (Carcinoma oral de células escamosas humano), CAL27 (Carcinoma oral de células escamosas humano), HL-60 (Leucemia promielocítica aguda humana), NB4 (Leucemia promielocítica aguda humana), KG-1a (LMA humana), THP-1 (Leucemia monocítica aguda), Jurkat (Leucemia linfóide de células T humana), K-562 (Leucemia mielogênica crônica humana), além de linhagens celulares não cancerosas como WT-MEF (Fibroblasto embrionário murino), BAD-MEF (Fibroblasto embrionário murino), MRC-5 (Fibroblasto de pulmão humano), BJ (Fibroblasto de prepúcio humano), e PBMC (Células mononucleadas de sangue periférico humano). O PBMC foi obtido por gradiente de densidade Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) de sangue heparinizado coletado de doadores saudáveis com consentimento informado (CEP 031019/2013). As linhagens foram obtidas da *American Type Culture Collection - ATCC* (Rockville, Maryland, U.S.A.) e cultivadas seguindo as instruções do guia de cultura de células animais da ATCC. Foram realizados testes utilizando kit de coloração para micoplasma (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) afim de validar o uso de células livres de micoplasma.

3.3 Avaliação da citotoxicidade - Ensaio do alamar blue

A avaliação da citotoxicidade da EMT foi realizada utilizando o ensaio do alamar blue (resazurina), um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. De acordo com Ahmed *et al.* (1994) o alamar blue é um corante usado para quantificação da viabilidade celular, solúvel em água, estável e não tóxico para as células. A forma oxidada do alamar blue entra no citosol e é convertida por enzimas mitocondriais então ocorre a mudança da coloração do meio de azul (não fluorescente/célula não viável) para rosa (fluorescente) nas células viáveis. Para o experimento, as células foram adicionadas a 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 μ L de meio). Após 24h, diluição seriada dos compostos testes foram adicionados em cada poço em duplicatas, variando a concentração de 0,19 a 25 μ g/ml, e então foram incubados por 72h. Doxorrubicina (pureza $\geq 95,0\%$, cloridrato de doxorrubicina, Laboratório IMA SAIC) foi usada como controle positivo. Foram adicionados 20 μ L da solução estoque (0,312 mg/ml) de alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) em cada poço 4 horas (para células tumorais) ou 24 horas (para PBMC) antes do término do período de incubação. Após o período de incubação, a absorbância foi mensurada nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm 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.

3.4 Avaliação da Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripán

Para avaliar a viabilidade celular e confirmar os resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade do alamar blue, foi realizado o ensaio de exclusão por azul de tripan. Após o tratamento com EMT em células KG-1a nos tempos de 12, 24, 48 e 72h, uma alíquota de 90 μ L de células foi acrescida a 10 μ L do corante azul de tripan. O princípio do teste baseia-se no fato de que células não viáveis, por apresentarem danos na membrana, coram-se em azul enquanto células viáveis conseguem expulsar o corante e permanecem sem coloração. A contagem foi realizada levando em consideração a exclusão do corante por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de

microscópio óptico. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em duplicatas.

3.5 Ensaio de identificação e quantificação de células-tronco leucêmicas

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 foram tratadas por 48h com EMT nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μM (concentrações pré-estabelecidas baseando-se no valor de CI_{50}). Após o tratamento, as células foram marcadas para moléculas de superfície com anticorpos anti-CD34-(PE), anti-CD38-(BV421), anti-CD13-(PE-CF594), anti-CD33-(BV510) e anti-CD123-(BV605) (BD Biosciences) durante 40 minutos para a identificação de CTLs e posteriormente foi adicionado o YO-PRO™-1 (Sigma-Aldrich Co.) em 200ul de salina para separar células viáveis de inviáveis. As células foram então analisadas no citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e software Flowjo 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em duplicatas. Trinta mil eventos foram analisados em cada amostra e os detritos celulares foram omitidos dos resultados.

Para que a MIF (média de intensidade de fluorescência) pudesse ser calculada de forma correta, utilizamos o software FlowJo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA) para selecionar as amostras contendo os eventos de interesse. Para isso, foi utilizada a estratégia de gates mostrada abaixo (figura 4). Iniciamos a análise a partir do número de células totais, selecionando a população principal excluindo os detritos celulares (etapa 1). Em seguida se excluí os “doublets” (etapa 2 e 3) utilizando FSC-A vs FSC-H e SSC-A vs SSC-H. A presença dos doublets pode interferir no resultado da análise, alterando os percentuais relativos de intensidade de fluorescência de um determinado marcador uma vez que os doublets são a agregação de duas células que são detectadas pelo laser ao mesmo tempo e assim são caracterizadas por ele como apenas um evento. Após a exclusão dos doublets, se seleciona a população viável,

ou seja, YOPRO negativa (etapa 4) e dentro dessa população viável se analisa as células positivas para cada um dos marcadores utilizados (etapa 5). Depois desta análise, os valores da MIF foram inseridos no software Graph Pad Prism 8 para análise estatística. A figura 5 apresenta a estratégia de gate para a análise das CTLs e diferenciação. As etapas 1-3 são similares a estratégia anteriormente citada, na etapa 4 a população viável é selecionada, ou seja, DAPI negativa (etapa 4) e dentro dessa população viável se analisa as células positivas para cada um dos marcadores utilizados (etapa 5).

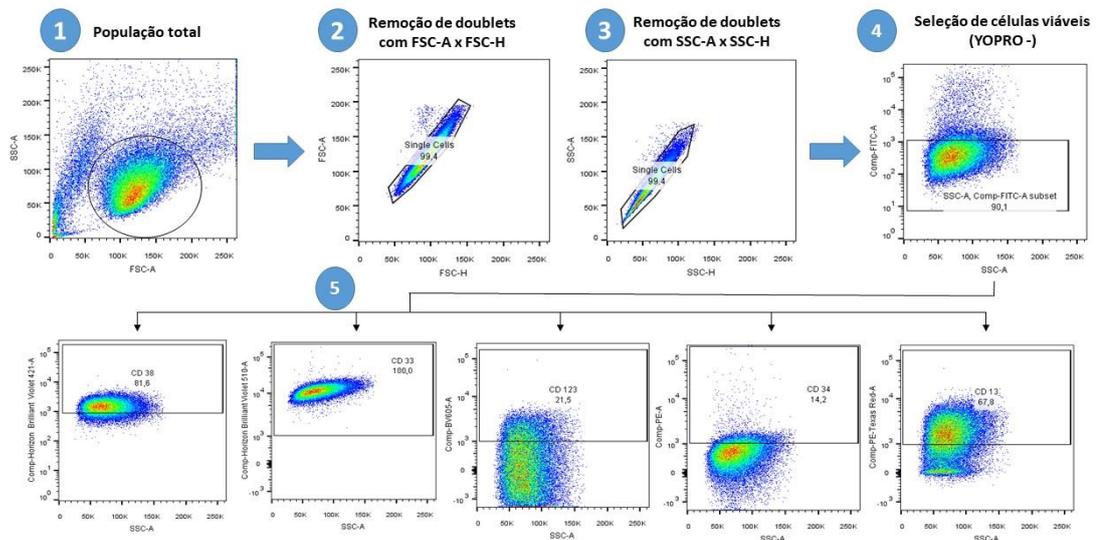


Figura 4. Estratégia de análise das CTLs. Gates para os anticorpos CD13, CD33, CD34, CD38 e CD123.

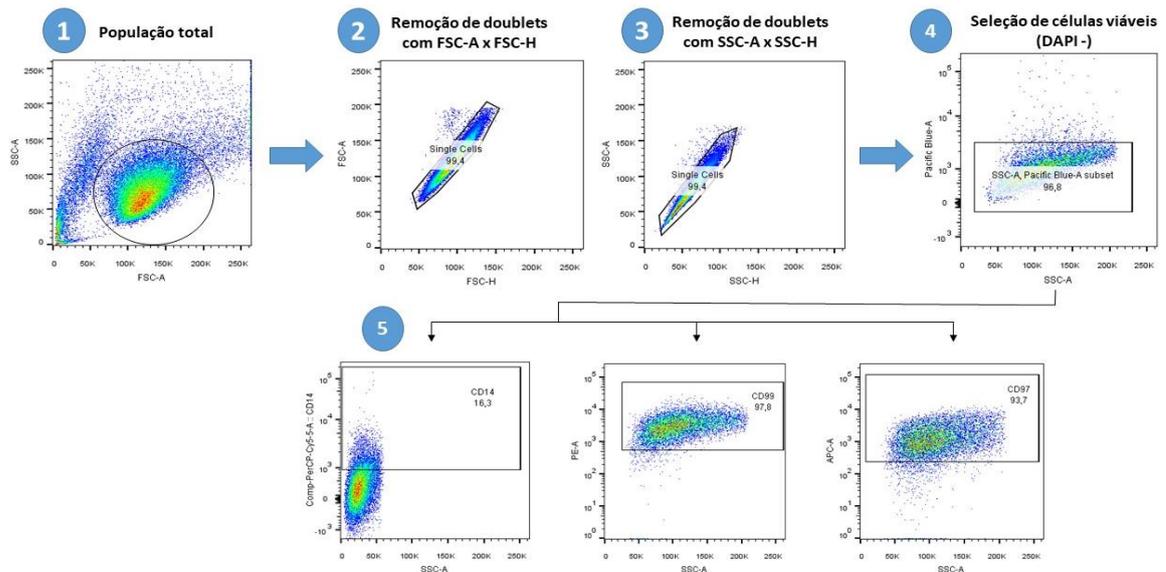


Figura 5. Estratégia de análise das CTLs e diferenciação. Gates para os anticorpos CD14, CD99 e CD97.

3.6 Avaliação *in vitro* do padrão de morte celular apoptótica

Para determinação da morte celular apoptótica células KG-1a foram plaqueadas na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/ml, tratadas com EMT nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μM , além dos controles positivo (DOX 1 μM) e negativo (DMSO 0,2%), incubadas na estufa a 37° C por um período de 12, 24, 48 e/ou 72 h. Posteriormente foram centrifugadas, lavadas com salina e foram adicionados 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 analisadas por 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 foram realizados em três experimentos independentes em duplicata. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Também foi utilizado o YO-PRO™-1 (Sigma-Aldrich Co.) e IP como método de detecção de morte celular apoptótica por citometria de fluxo.

Adicionalmente, foi realizado ensaio funcional com inibidor farmacológico de pan-caspase (Z-VAD(OMe)-FMK, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) para confirmar o efeito de EMT sobre a indução de apoptose. O inibidor foi adicionado 2h antes do tratamento com EMT, após a incubação com o composto foi realizada a marcação com anexina V/IP para avaliar a prevenção da morte celular apoptótica.

3.7 Análise de Caspase-3 e PARP-1

A análise da expressão de caspase-3 ativa e PARP-1 clivada foi realizada após 24 horas de tratamento com EMT a 2 μM . Células KG-1a na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/ml foram incubadas por 1h com anticorpos anti-Caspase 3-ativa-(FITC) e anti-PARP clivada (Asp 214)-(PE) (BD Biosciences), centrifugadas, ressuspensas em 200 μL de PBS/BSA e então analisadas no citômetro (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 foram realizados em três experimentos

independentes em duplicatas. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

3.8 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial

O corante fluorescente rodamina 123 é sequestrado para dentro da mitocôndria quando o estado de variação de potencial transmembrânico mitocondrial está inalterado. Assim, células com polarização inalterada emitem alta fluorescência verde devido a uma maior concentração de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que, mitocôndrias com alterações do potencial transmembrânico emitem menos fluorescência (Wong, 2009). As células KG-1a foram na plaqueadas na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/ml, tratadas com EMT nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μM , além do controle negativo (DMSO 0,2%) por 24h. Uma solução de rodamina 123 (5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) foi adicionada ao pellet celular, na ausência de luz por 15 min, a 37 °C. Posteriormente as células foram centrifugadas, o precipitado foi ressuspensão em salina e as amostras foram analisadas por 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 foram realizados em três experimentos independentes em duplicatas. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

3.9 Quantificação das espécies reativas de oxigênio intracelular

Os métodos fluorescentes de detecção apresentam uma maior sensibilidade e por isso têm sido extremamente utilizados para monitorar a produção de EROs. O diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co.), que é um indicador de EROs intracelular (reativo ao H₂O₂) que penetra na membrana plasmática e emitem fluorescência verde mediante oxidação. Para a quantificação de EROs, as células foram plaqueadas na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/ml, tratadas com EMT nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μM , além do controle negativo (DMSO

0,2%) por 1 e 3 h e então uma solução H₂-DCF-DA (Sigma-Aldrich Co.) foi adicionada, na ausência de luz por 15 minutos, a 37 °C. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas, o precipitado foi ressuspensão em salina e as células foram analisadas por citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em duplicatas. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. A presença de EROs também foi avaliada utilizando o indicador de superóxido MitoSOX™ (Invitroge) nos tempos de 1 e 24h por citometria de fluxo, segundo instruções do fabricante.

Adicionalmente, foi realizado ensaio funcional com inibidor farmacológico de espécies reativas de oxigênio N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma-Aldrich Co.), potente antioxidante, para verificar a ocorrência da prevenção de dano oxidativo induzido pelo composto. O inibidor foi adicionado 1h antes do tratamento com EMT, após a incubação com o composto foi realizada a marcação com anexina V/IP ou MitoSox para confirmar o mecanismo de ação do composto.

3.10 Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA

É possível determinar em qual fase do ciclo celular as células se encontram baseando-se nas variações do seu conteúdo de DNA. O iodeto de propídeo é um agente fluorogênico hidrofílico com 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 (Cibas, 1995). A determinação do conteúdo de DNA celular foi avaliada após o tratamento com o composto por 12, 24, 48 e 72h. As células foram centrifugadas e diluídas com a solução de permeabilização (200µL) contendo 0,1% de triton X-100 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), 0,1% de citrato de sódio, 2µg/mL iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) e 100µg/mL RNase (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) em PBS, na ausência de luz a 37°C. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas por citometria 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 foram realizados em três experimentos independentes em duplicatas. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

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

A marcação para NF-κB foi realizada pela técnica de citometria de fluxo no citômetro (BD LSR Fortessa). Após 24 horas de tratamento com EMT a 2 μM 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 o anticorpo anti-NF-κB p65 (pS529) Alexa Fluor® 488 (#558421, BD Phosflow™), incubadas durante 1 hora, diluídas em tampão de incubação, centrifugadas, ressuspensas em 200 μL de PBS/BSA e analisadas no 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 foram realizados em três experimentos independentes em duplicatas. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

3.12 Western blot

As células foram tratadas com EMT 2μM, por um período de 17h de incubação, foram lisadas para extração das proteínas, quantificadas por Bradford e então foi realizado o western blot utilizando gel, buffers e reagentes da Bio Rad. Após a eletroforese em gel de poliacrilamida (4-20%), transferência para membrana de nitrocelulose e incubação da membrana com um anticorpo para as proteínas de interesse, a membrana foi revelada com o auxílio do West Fento (Thermo Fisher Scientific).

3.13 Microscopia confocal

Células KG-1a foram incubadas por 24h com o composto na maior concentração. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução salina e então foi realizado o método de gota, onde as células foram colocadas na lamina como uma pequena gota (5µL), fixadas em metanol a -20 °C, permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%), lavadas, tratadas com RNase (10 µg/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 63x em um microscópio confocal Zeiss.

3.14 Análise da expressão gênica por qPCR

As células KG-1a foram incubadas com 2 µM de EMT por 12 h e o RNA total foi isolado das células usando o RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen; Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A análise do RNA foi realizada levando-se em consideração a 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 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, então 40 ciclos de 15s a 95 °C e 1 min a 60°C. A quantificação relativa (QR) da expressão de mRNA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001), usando Gene Expression Suite™ Software (Applied Biosystems™), e as células tratadas com o controle negativo (DMSO 0,2%) foram utilizadas como calibrador. As reações foram normalizadas pela média geométrica da 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 se o QR (quantificação relativa) for maior ou igual a 2, o que significa que a expressão gênica nas células tratadas com EMT foi pelo menos duas vezes maior do que nas células tratadas com controle negativo. Da mesma forma, a regulação negativa dos genes foi considerada se $QR \leq 0,5$, o que significa que a expressão gênica em células tratadas com EMT foi pelo menos metade daquela das células tratadas com controle negativo.

3.15 Ensaio *in vivo* – Xenotransplante em camundongos NSG

Camundongos imunodeficientes da linhagem NSG obtidos do biotério da Fiocruz-Bahia (CEUA 016/2018), foram tratados com bulsufano (25 mg/kg) um dia antes do transplante para eliminar as células da medula óssea dos camundongos. Então as 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 a EMT e controle negativo (DMSO 0,2%) foi iniciado cinco semanas após o transplante por via intraperitoneal diariamente por duas semanas. Após o tratamento, os animais foram sacrificados, tiveram o sangue, baço e células da medula óssea marcadas com anticorpo anti-CD45-PE humano e anti-CD45-FITC de camundongo (Becton Dickinson) para investigar a presença de células humanas por citometria 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). Para avaliar os efeitos toxicológicos, os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. 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. Os órgãos foram corados em hematoxilina e eosina para análise da arquitetura tecidual e alterações morfológicas. Ainda, os fígados e rins foram analisados por uma coloração especial (PAS - ácido periódico-Schiff) para avaliar o acúmulo de glicogênio nos hepatócitos e membrana basal glomerular.

3.16 Análise estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prism 8 (Intuitive Software for Science). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. ou valores de CI_{50} e respectivos intervalos de confiança de 95%, obtidos através de regressão não linear, a partir de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas utilizando correlação estatística seguida por test-t ou análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 EMT apresenta citotoxicidade frente diversas linhagens celulares

A EMT foi submetida a uma triagem citotóxica utilizando o ensaio de alamar blue para análise quantitativa da viabilidade e proliferação celular em diversas linhagens de células cancerosas (MCF7, 4T1, HCT116, B16-F10, HepG2, HSC-3, CAL27, HL-60, NB4, KG-1a, THP-1, Jukart, K-562, SSC-9, SSC-25) e não cancerosas (MRC-5, PBMC, BJ). Os resultados dessa triagem após 72 horas de incubação com os compostos teste estão apresentados na tabela 1.

A EMT demonstrou um efeito citotóxico potente em todas as linhagens de células tumorais testadas, com valores de CI_{50} variando de 0,06 a 4,33 μM para HCT116 e B16-F10, respectivamente. Nas células não cancerosas, os valores de CI_{50} variaram de 2,44 μM em PBMC a 3,79 μM em MRC-5. Para a linhagem de LMA, KG-1a, a EMT apresentou um CI_{50} de 0,74 μM , com índice de seletividade (IS) de 3,3 vezes em relação ao PBMC, 5,04x em relação a linhagem BJ e 5,12x relação a MRC-5. O IS de todas as linhagens é apresentado na tabela 2.

A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e apresentou valores de CI_{50} para as linhagens tumorais entre 0,02 e 1,4 μM em Jukart e K-562, respectivamente. Já para as células não tumorais, os valores de CI_{50} variaram de 1,31 μM em PBMC a 3,23 μM em BJ.

Devido à linhagem celular KG-1a ser descrita na literatura como uma linhagem com maior porcentagem de células $CD34^+/CD38^-$, foram conduzidos estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* com essa linhagem para avaliar o mecanismo de ação e o potencial anti-leucêmico da EMT. As concentrações do composto testadas foram de 0,5, 1 e 2 μM , selecionadas com base nos valores de CI_{50} para essa linhagem.

Tabela 2. Atividade citotóxica de EMT em diferentes tipos histológicos.

Linhagens	Tipo Histológico	CI ₅₀ (µM)	
		EMT	Doxorrubicina
Células cancerosas			
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	2,55 1,52 - 4,27	1,4 0,87 - 2,17
4T1	Carcinoma de mama estágio IV	3,78 1,47 - 9,69	1,53 1,09 - 2,17
HCT116	Carcinoma de cólon humano	0,06 0,02 - 0,21	0,56 0,40 - 0,81
B16-F10	Melanoma murino	4,34 2,52 - 7,49	0,1 0,06 - 0,17
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	4,08 2,56 - 6,50	0,44 0,31 - 0,58
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano	0,49 0,23 - 1,03	0,54 0,35 - 0,83
CAL27	Carcinoma oral de células escamosas humano	0,59 0,25 - 1,39	0,10 0,02 - 0,4
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humano	1,22 0,73 - 2,05	0,12 0,06 - 0,23
NB4	Leucemia promielocítica aguda humana	3,96 3,26 - 4,80	0,41 0,12 - 1,44
KG-1a	Leucemia mielóide aguda humana	0,74 0,39 - 1,40	0,14 0,11 - 0,22
THP-1	Leucemia monocítica aguda	0,87 0,63 - 1,21	0,23 0,14 - 0,40
Jurkat	Leucemia linfóide de células T humana	1,70 1,42 - 2,04	0,02 0,01 - 1,13
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana	1,77 0,76 - 4,11	1,40 0,77 - 2,52
SSC-9	Carcinoma de células escamosas humano	1,67 0,98 - 2,84	1,14 0,64 - 2,01
SSC-25	Carcinoma de células escamosas humano	3,99 1,72 - 9,27	1,31 0,71 - 2,38
Células não cancerosas			
MRC-5	Fibroblasto pulmonar humano	3,79 2,70 - 5,31	1,50 0,93 - 2,38
BJ	Fibroblasto de prepúcio humano	3,73 1,93 - 7,22	3,23 1,63 - 6,4
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico	2,44 1,75 - 3,40	1,31 0,90 - 1,94

Valores de CI₅₀ e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do alamar blue após 72 h de tratamento, obtidos por regressão não-linear. Doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Tabela 3. Índice de seletividade da EMT.

Células cancerosas	Células não cancerosas					
	PBMC		BJ		MRC-5	
	EMT	DOX	EMT	DOX	EMT	DOX
MCF-7	0,96	0,94	1,47	2,31	1,49	1,07
4T1	0,67	0,86	0,99	2,11	1	0,98
HCT116	40,67	2,34	62,17	5,77	63,17	2,68
B16-F10	0,56	13,1	0,86	32,3	0,88	15
HepG2	0,60	2,98	0,91	7,34	0,93	3,4
HSC-3	4,98	2,43	7,61	5,98	7,73	2,78
CAL27	4,14	13,1	6,32	32,3	6,42	15
HL-60	2	10,9	3,06	26,92	3,1	12,5
NB4	0,61	3,2	0,94	7,88	0,96	3,66
KG-1a	3,3	9,36	5,04	23,1	5,12	10,71
THP-1	2,8	5,70	4,29	14,04	4,36	6,52
Jurkat	1,44	65,5	2,19	161,5	2,23	75
K562	1,38	0,94	2,1	2,31	3,14	1,07
SSC-9	1,46	1,15	2,3	2,83	2,27	1,32
SSC-25	0,61	1	0,94	2,47	0,9	1,15

Índice de seletividade da EMT. Os dados de índice de seletividade (IS) foram calculados usando a seguinte fórmula: $IS = CI_{50} [\text{células não tumorais}] / CI_{50} [\text{células tumorais}]$. Doxorubicina (DOX) foi usado como controle positivo.

Após a determinação da citotoxicidade e CI_{50} do composto, foi realizada a avaliação da viabilidade celular utilizando o método de exclusão por azul de tripan. Os resultados indicaram que o tratamento das células KG-1a com EMT durante 12, 24, 48 e 72 horas foi capaz de reduzir significativamente no número de células viáveis em todas as concentrações testadas, quando comparado ao controle negativo (DMSO 0,2%), conforme demonstrado na figura 5. Essa redução na viabilidade celular é uma característica comum de compostos com propriedades citotóxicas.

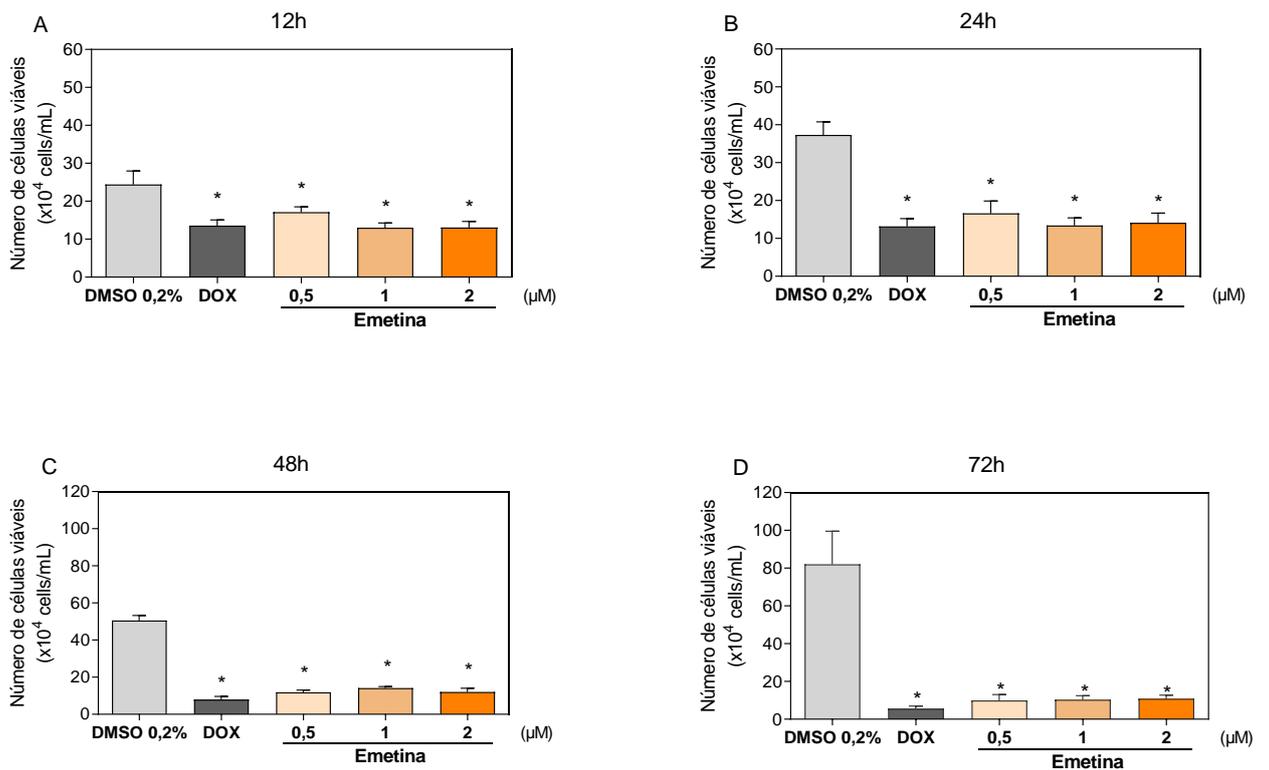


Figura 6. Efeito da EMT sobre a viabilidade de células KG-1a determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripan após 12h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste, DMSO 0,2%. Doxorrubicina (DOX) 1 μM foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem a média ± 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 Student Newman-Keuls.

4.2 EMT é capaz de eliminar células-tronco leucêmicas de LMA

Para a identificação de CTLs, as células foram marcadas para marcadores mielóides, CD13 e CD33, e marcadores de CTLs, CD34, CD38 e CD123, então realizada a aquisição por citometria de fluxo. As figuras 6A-E mostram uma redução na porcentagem de células CD13, CD34, CD38 e CD123 positivas, indicando a eliminação de CTLs.

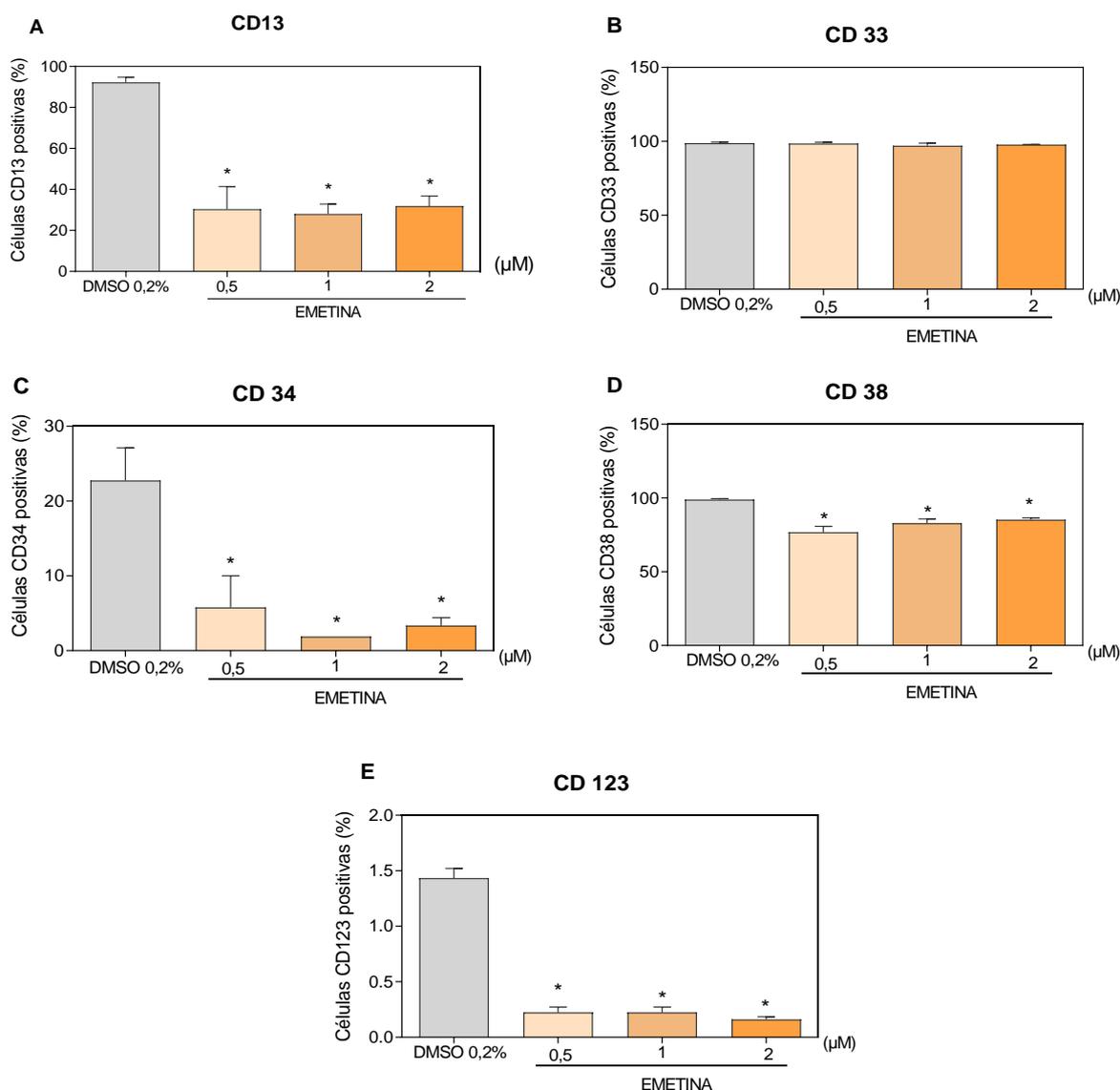


Figura 7. Efeito da EMT sobre a porcentagem de células positivas para os marcadores de células-tronco leucêmicas em células KG-1a após 48h de tratamento determinada por citometria de fluxo. A-E Marcação para os anticorpos anti-CD13 PE-CF594, anti-CD33 BV510, anti-CD34 PE, anti-CD38 BV421, anti-CD123 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 Student Newman-Keuls.

Estudos adicionais avaliando outros marcadores superexpressos em CTLs de LMA, como o CD99 e CD97, mostraram que o tratamento com EMT reduziu a marcação de células CD99 e CD97 após 24 e 72h de tratamento, indicando o potencial do composto em eliminar CTLs (figura 8).

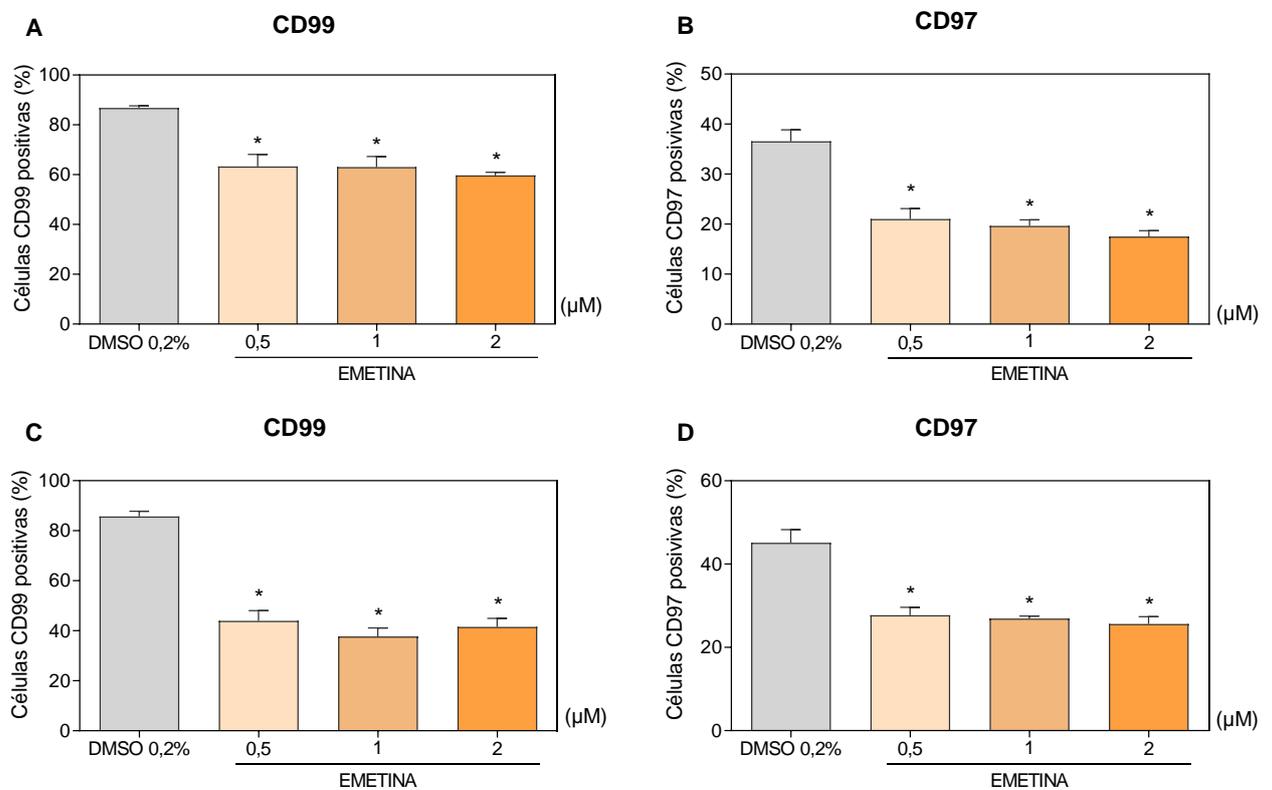


Figura 8. Efeito da EMT sobre os marcadores de CTL, CD99 e CD97, em células KG-1a após 24h e 72h de tratamento determinada por citometria de fluxo. **A e B)** Marcação para os anticorpos anti-CD99 e anti-CD97 por 24h. **C e D)** Marcação para os anticorpos anti-CD99 e anti-CD97 por 72h. O DMSO (0,2%), usado para diluir o composto testado, foi utilizado como controle negativo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Além de ter ação sobre as CTLs, a EMT também induziu a diferenciação nas células KG-1a, vista pelo aumento do CD14, como visto na figura 9.

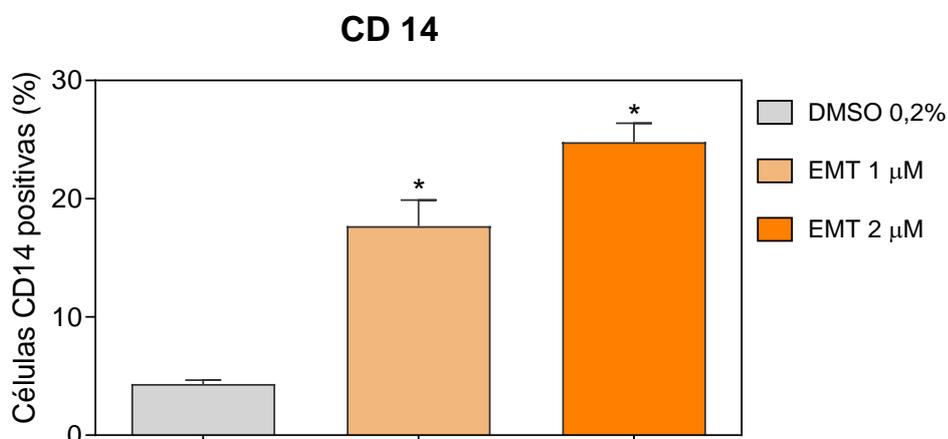


Figura 9. Efeito da EMT sobre o marcador de diferenciação celular CD14 em células KG-1a após 48h de tratamento determinada por citometria de fluxo. O DMSO (0,2%), usado para diluir o composto testado, foi utilizado como controle negativo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.3 EMT induz a morte celular apoptótica mediada por caspases em células KG-1a

Para avaliar se o tratamento de células KG-1a com EMT induz morte celular por apoptose, foi realizado o ensaio de marcação com YO-PRO e IP. O YO-PRO é um marcador nuclear capaz de marcar células em estágios precoces de apoptose ao penetrar através de poros. Além disso, é capaz de marcar células em necrose. O IP pode atravessar apenas as membranas das células necróticas e não das apoptóticas, enquanto nenhum dos corantes é capaz de penetrar nas células viáveis.

Na figura 10, é possível observar um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas após 12 horas de tratamento com a maior concentração do composto, passando de 3,6% no grupo tratado com DMSO para 7,7% no grupo tratado com EMT 2 μM. Após 24 horas, a porcentagem de células mortas duplica em comparação ao controle, quando analisamos o grupo tratado com EMT a 2 μM, indo de 7,15% para 14,7%, respectivamente. A partir de 48 horas, a morte celular se mostra

estatisticamente significativa para todas as concentrações de EMT em relação ao grupo controle negativo. A figura 11 mostra os dotplots representativos da marcação com YO-PRO + IP nos diferentes tempos testados.

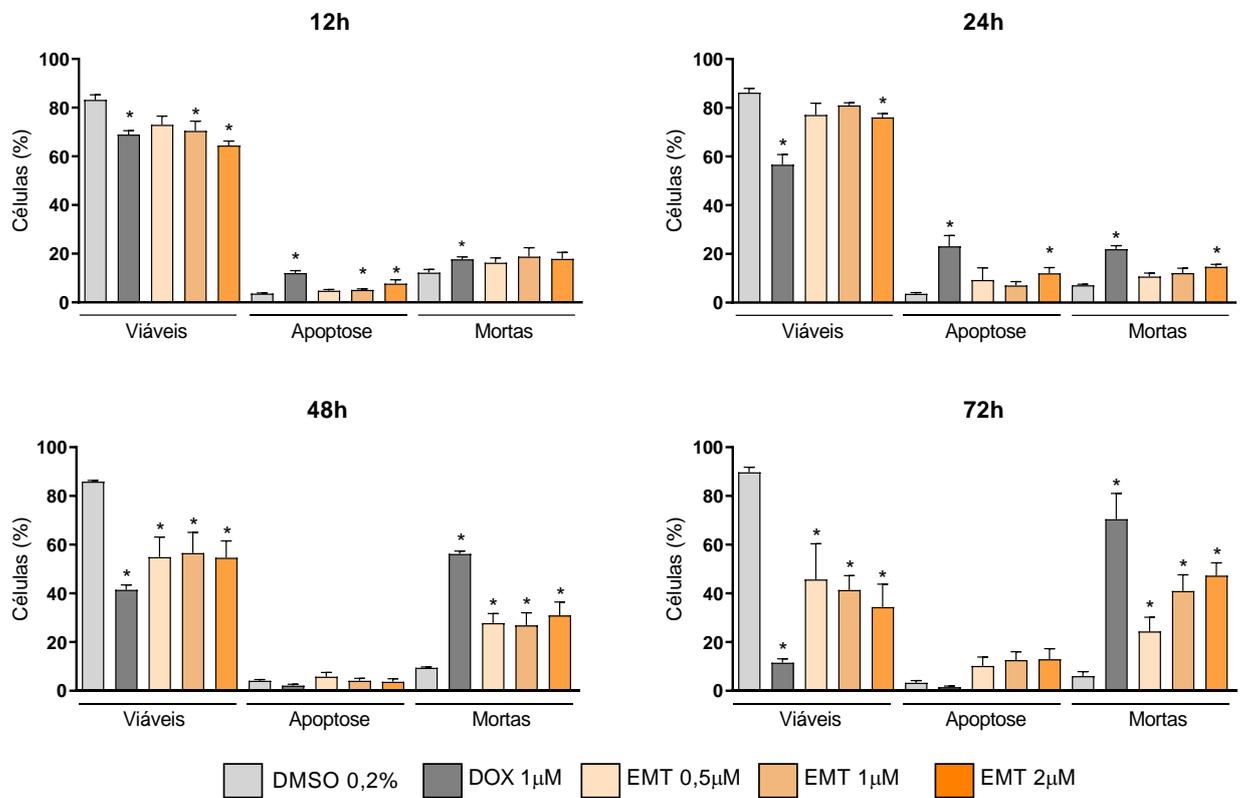


Figura 10. Efeito da EMT sobre a morte de células KG-1a realizado por YO-PRO + IP após 12, 24, 48 e 72 h de incubação. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Doxorubicina (DOX) 1 µM foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem à % de células viáveis de três experimentos independentes realizados em duplicata. * p < 0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls.

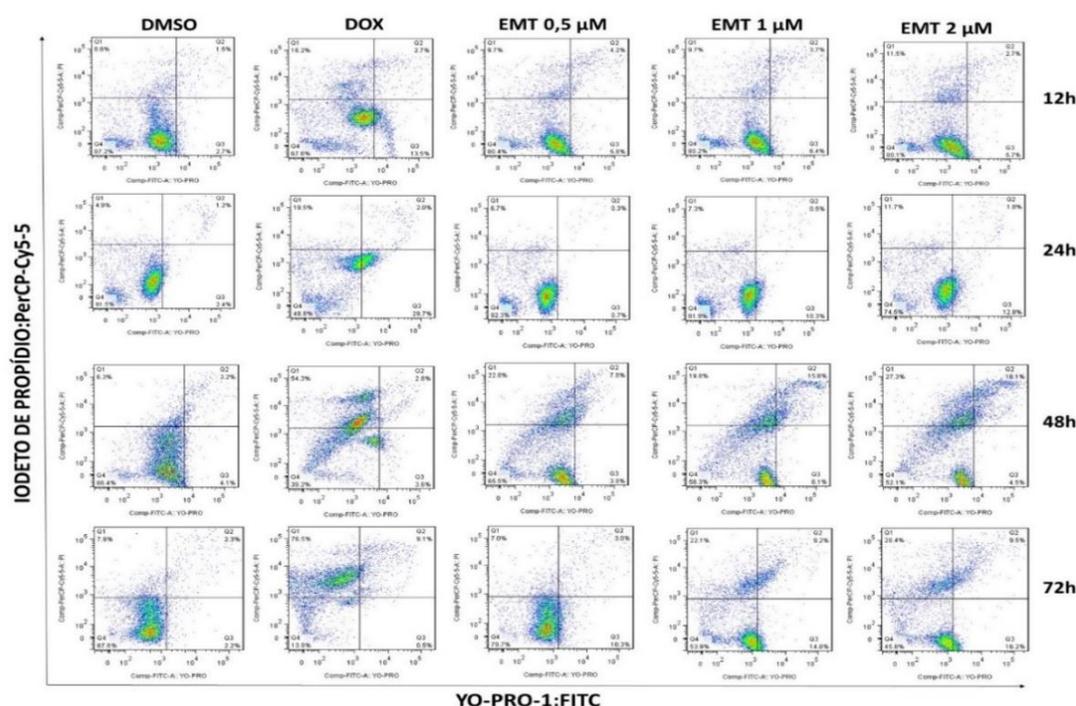


Figura 11. Dotplots representativos da marcação com YO-PRO + IP nos diferentes tempos testados. O DMSO 0,2%, foi utilizado como controle negativo. Doxorubicina (DOX) 1 μ M foi utilizada como controle positivo.

Com o objetivo de compreender os mecanismos de apoptose induzidos pelo tratamento com EMT em células KG-1a, realizamos a quantificação da caspase-3 clivada por meio da citometria de fluxo após 24 horas de incubação. A caspase-3 é uma caspase efetora que é ativada para desencadear o processo de apoptose. Na figura 12A, observamos um aumento de mais de duas vezes na ativação da caspase-3 após o tratamento com EMT 2 μ M, passando de 78,35 para 166,77 em comparação com o grupo controle negativo. Ainda podemos confirmar o aumento da clivagem da caspase-3 pelo aumento da banda tratada com EMT em comparação com o controle negativo no blot da figura 12C.

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 e é um dos principais alvos de clivagem da caspase-3. A clivagem da PARP serve como um marcador de células em apoptose. Na figura 12B, é possível observar

um aumento de quase três vezes na clivagem da PARP-1 após o tratamento com EMT 2 μ M, passando de 310,97 para 833,43 em comparação com o grupo controle negativo. Ainda podemos confirmar o aumento da clivagem de PARP-1 pelo aumento da banda tratada com EMT em comparação com o controle negativo no blot da figura 12C.

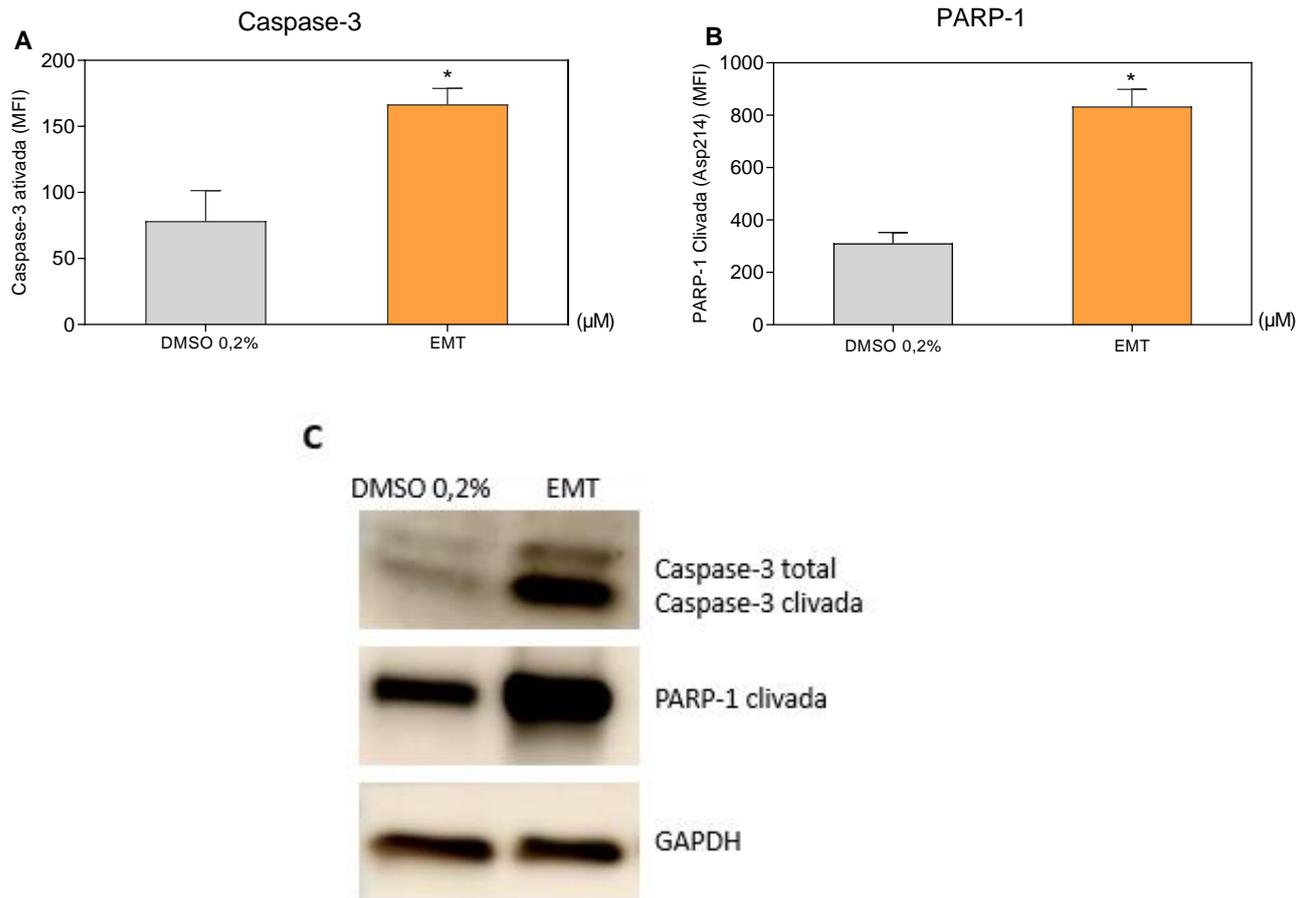


Figura 12. Ativação de caspase-3 e clivagem de PARP-1 após o tratamento de células KG-1a com EMT 2 μ M. A) Caspase-3 ativada determinada por citometria de fluxo após 24h de incubação. B) PARP-1 clivada determinada por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. C) Imagens de western blot após 17h de tratamento. 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.

Ao realizar o pré-tratamento das células com um PAN inibidor de caspases (Z-VAD-(OMe)-FMK) por 2 horas, observamos que ele preveniu o aumento de células apoptóticas causado pela EMT. A porcentagem de células apoptóticas foi reduzida de 38,36% para 22,45% (conforme mostrado na figura 13). Isso indica que a apoptose induzida pelo composto tem a participação de caspases. Além disso, o inibidor também preveniu a morte celular por apoptose em células tratadas com doxorrubicina, reduzindo a porcentagem de células apoptóticas de 57,4% para 32,87% após o uso do Z-VAD. A figura 14 mostra os dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP e o uso do inibidor de caspases, Z-VAD.

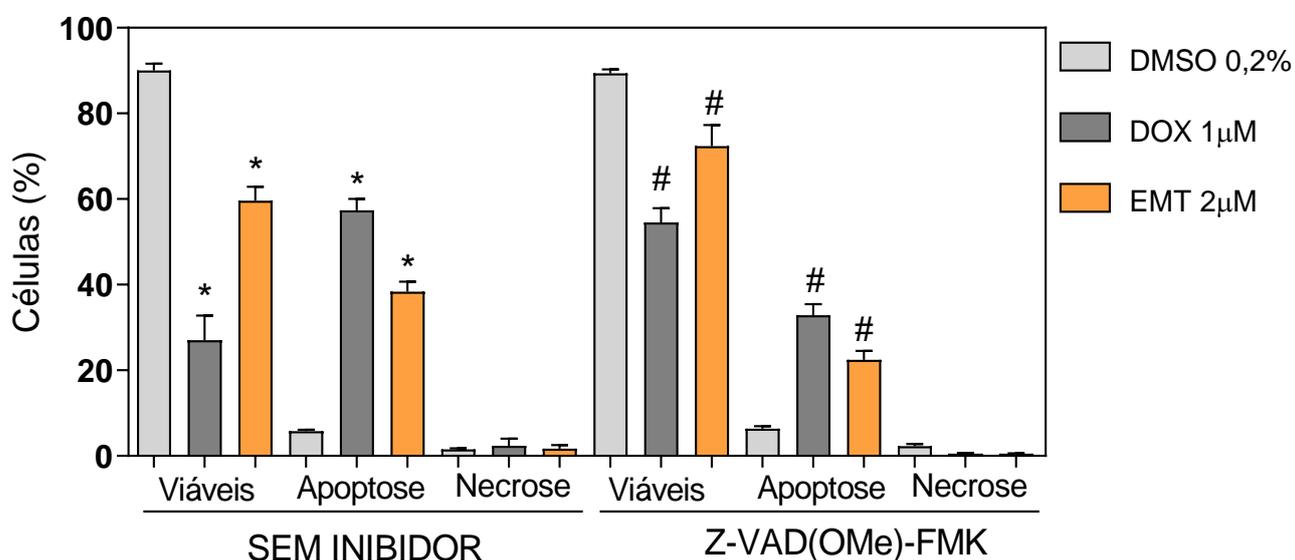


Figura 13. Efeito do inibidor de pan-caspase (Z-VAD (OMe)-FMK) na apoptose induzida pela EMT 2 µM em células KG-1a determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/IP. O DMSO 0,2%, foi utilizado como controle negativo. Doxorrubicina (DOX) 1 µM foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. * p <0,05 em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls.

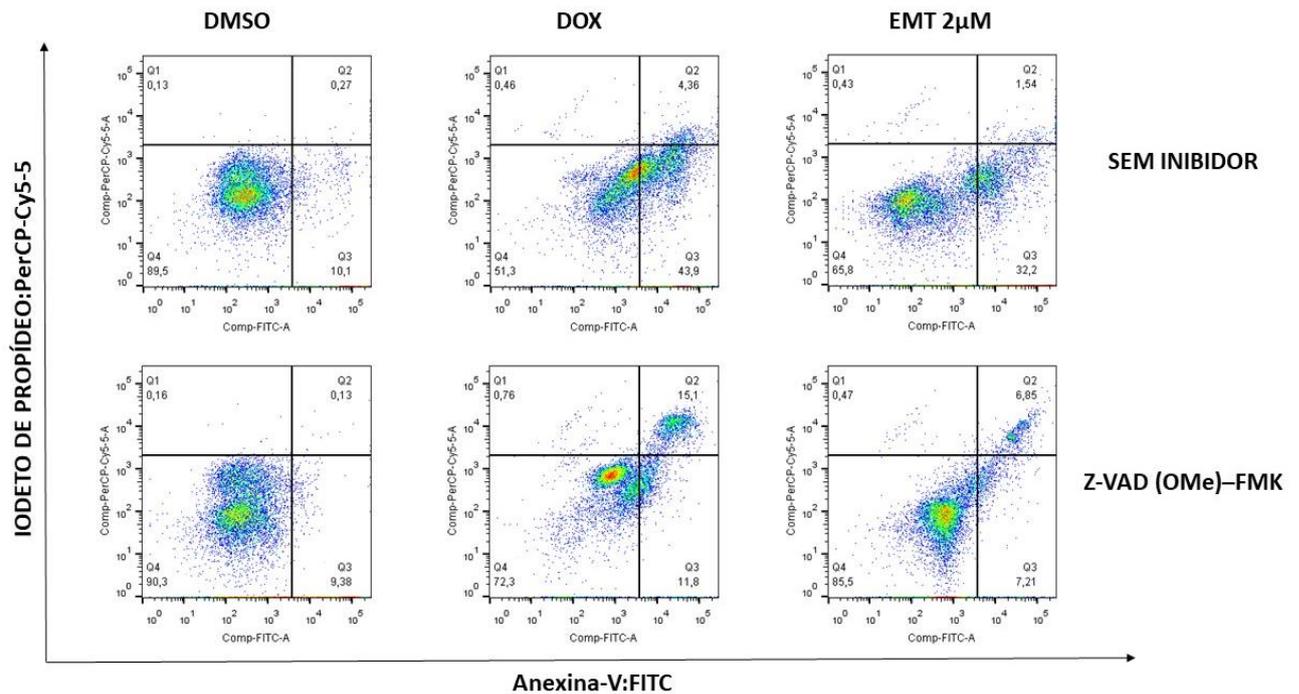


Figura 14. Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP e o uso do inibidor Z-VAD. O DMSO 0,2%, foi utilizado como controle negativo. Doxorrubicina (DOX) 1 μ M foi utilizada como controle positivo.

Afim de compreender se o tratamento com a EMT causa despolarização mitocondrial e assim alteração do potencial transmembrânico mitocondrial, foi utilizada a sonda fluorescente rodamina 123 por análise de citometria de fluxo.

Foi observado um aumento significativo na despolarização mitocondrial, e com isso a perda do potencial transmembrânico, para todas as concentrações de EMT no tempo de 24h de incubação. No grupo controle negativo, a porcentagem de células com despolarização mitocondrial foi de 6,2%. No entanto, nas células tratadas com EMT a 0,5 μ M, essa porcentagem aumentou para 21,1%. Para as concentrações de EMT de 1 μ M e 2 μ M, a porcentagem de células com despolarização mitocondrial foi de 26% e 27%, respectivamente (conforme demonstrado na figura 15).

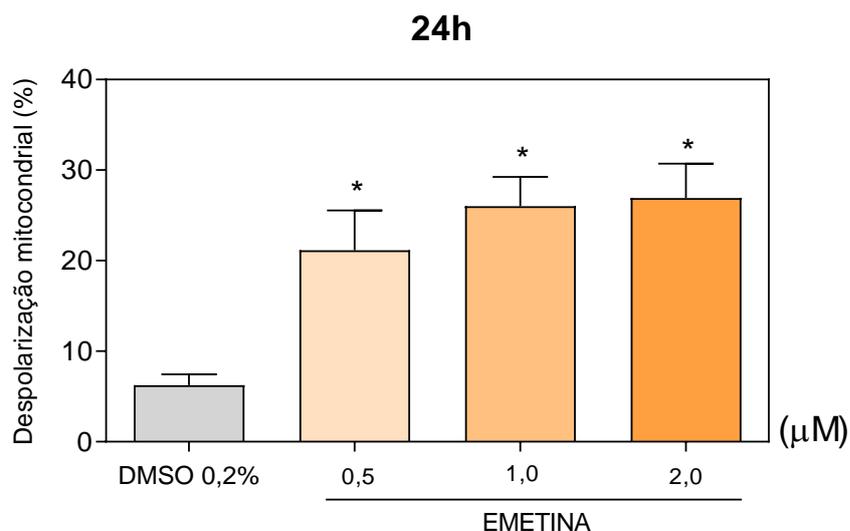


Figura 15. Efeito da EMT na despolarização da membrana mitocondrial. O DMSO 0,2% foi utilizado como controle. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student-Newman-Keuls.

Conduzimos experimentos adicionais para investigar o papel da proteína BAD (agonista da morte celular associada ao BCL-2) na morte celular apoptótica induzida pela EMT. 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 pela EMT, 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). Observamos que a EMT apresentou citotoxicidade em ambas as linhagens, reduzindo a viabilidade celular. As CI_{50} foram muito semelhantes, sendo de $0,80 \mu\text{M}$ para WT-MEF e $0,73 \mu\text{M}$ para BAD-MEF. Esses resultados indicam que o gene BAD não é essencial para a citotoxicidade da EMT (figura 16).

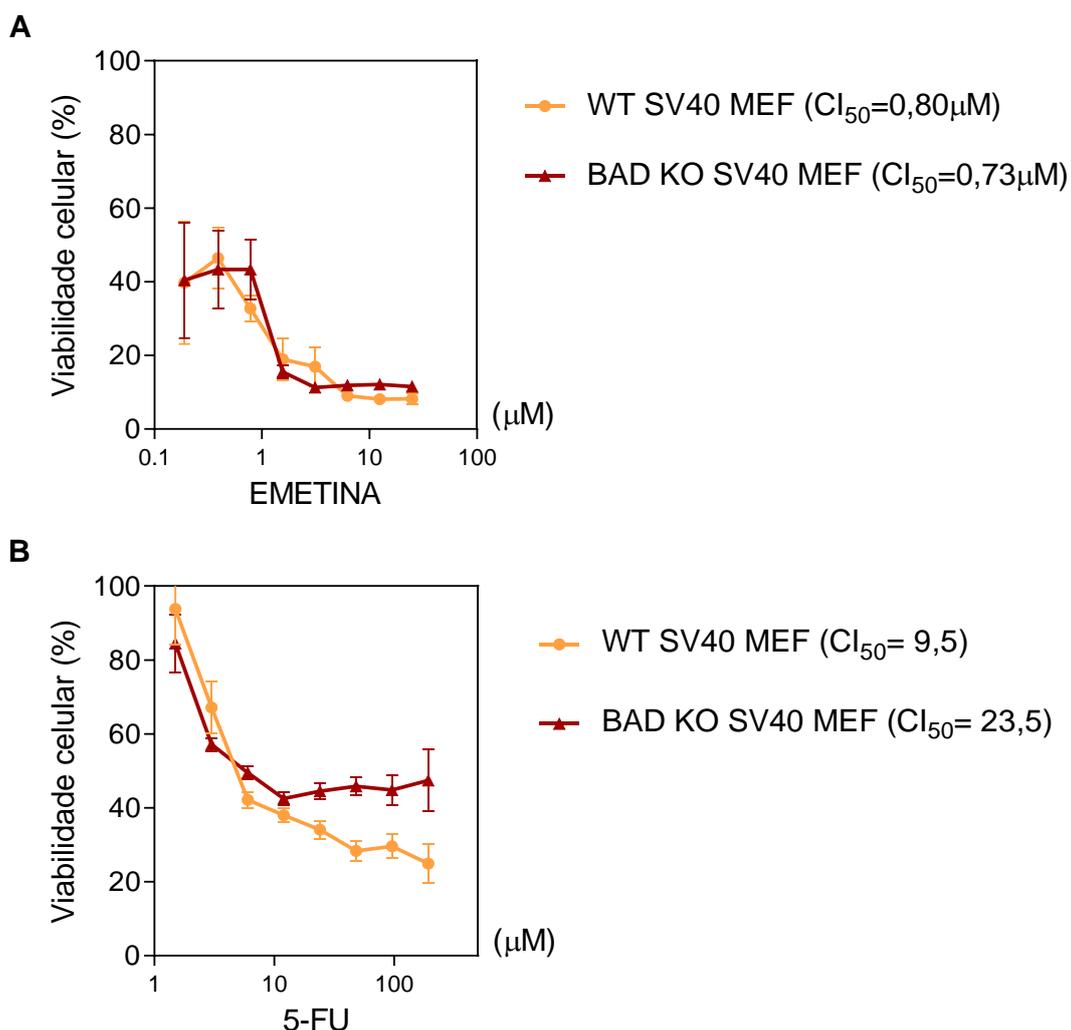


Figura 16. Efeito da EMT e 5-FU na sobrevivência de células WT-MEF e BAD-MEF pelo método alamar blue após 72h de incubação.

Além disso, realizamos uma análise do perfil de morte celular induzido pela EMT nas células WT-MEF e BAD-MEF utilizando anexina V e IP por citometria de fluxo. Observamos que em ambas as linhagens houve diminuição da viabilidade celular, acompanhada de um aumento na porcentagem de células em apoptose e necrose em comparação com o controle negativo. Esses resultados corroboram o achado de que o gene BAD não desempenha um papel fundamental na morte celular apoptótica induzida pela EMT, como evidenciado na figura 17 e nos dotplots representativos da marcação com anexina V + IP da figura 18.

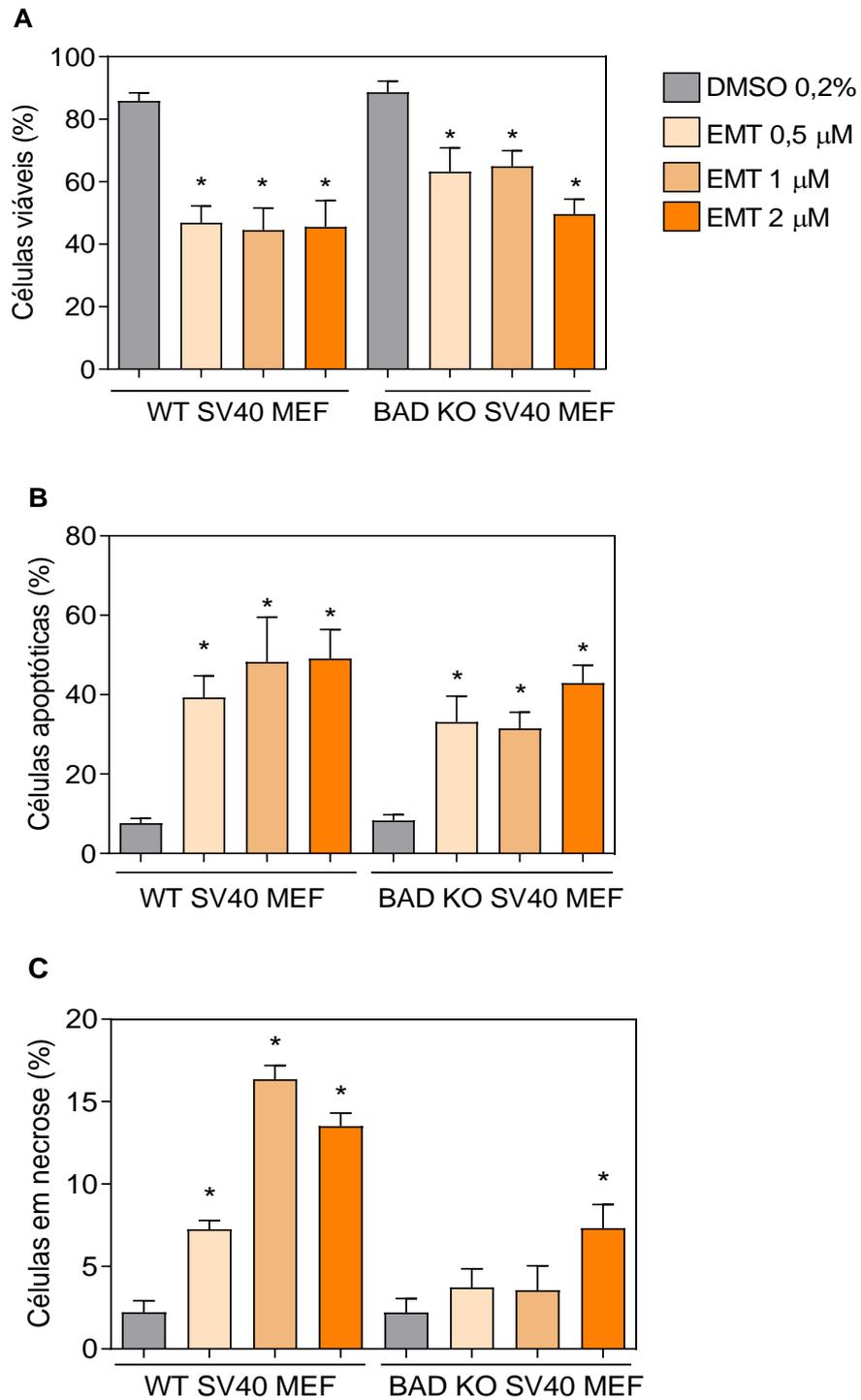


Figura 17. Efeito da EMT sobre a morte de células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF realizados por Anexina V/IP após 48h de incubação. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Os valores correspondem à % de três experimentos independentes realizados em duplicata. * p < 0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls.

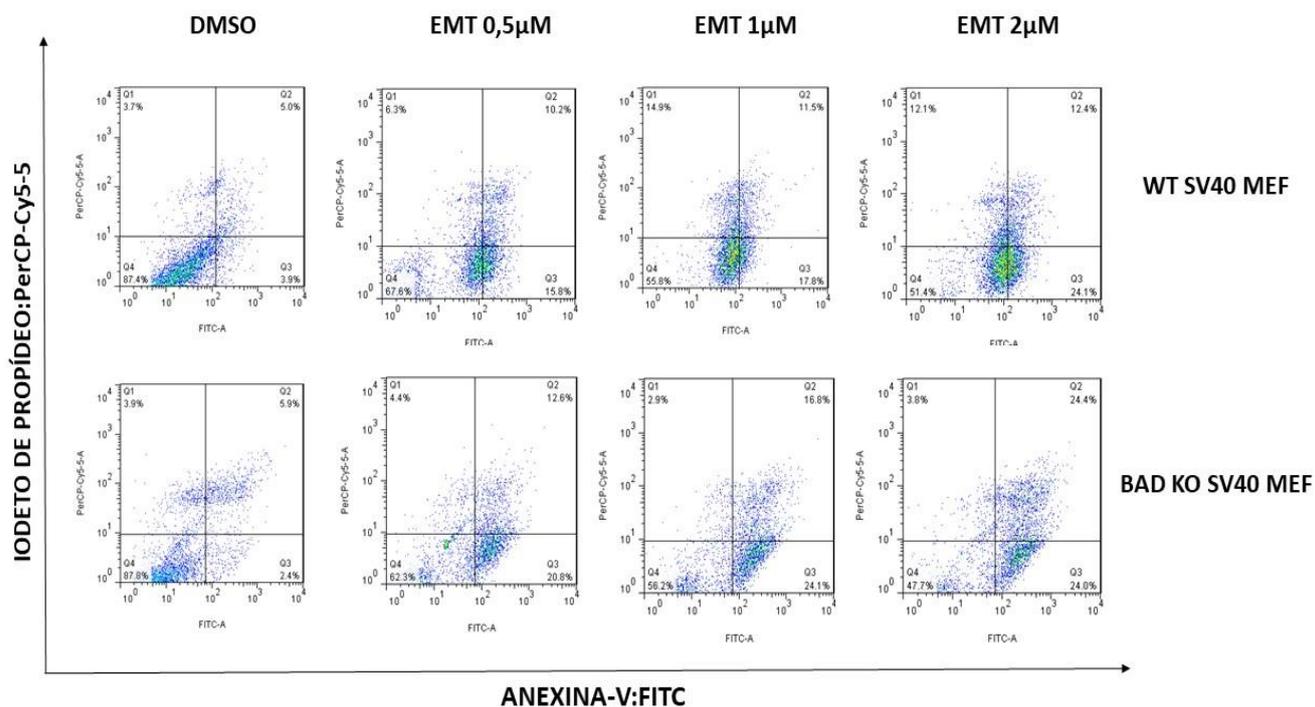


Figura 18. Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP nas células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF após o tratamento com EMT. O DMSO 0,2%, foi utilizado como controle negativo.

4.4 EMT induz estresse oxidativo em células KG-1a

Investigamos ainda, se a ação da EMT em células KG-1a pode elevar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para este fim, foi utilizado o reagente fluorescente sensível a oxidação H2-DCF-DA através da citometria de fluxo. Observou-se que o tratamento com EMT nos tempos de 1h e 3h resultou em um aumento significativo nos níveis de EROs quando comparados ao controle negativo, conforme mostrado na figura 19.

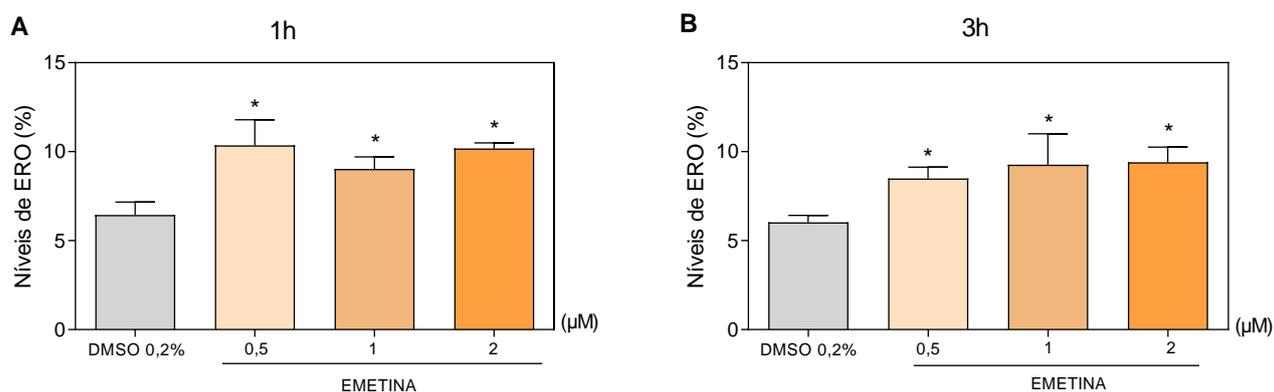


Figura 19. Efeito da EMT nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) das células KG-1a após 1 e 3 h de incubação determinada por citometria de fluxo usando coloração H2-DCF-DA. O DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos 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 Student Newman-Keuls.

Adicionalmente, foi avaliada a geração de espécies reativas de oxigênio utilizando o indicador de superóxido mitocondrial, MitoSOX™, por citometria de fluxo nos tempos de 1h e 24h. Foi possível observar que houve um aumento significativo nos níveis de EROs em ambos os tempos testados após o tratamento com a EMT (figura 20 A e B).

Para determinar se a ocorrência da morte celular estava relacionada ao aumento de EROs, foi realizado um pré-tratamento das células com N-acetil-L-cisteína (NAC), um inibidor de espécies reativas de oxigênio em combinação com o indicador de superóxido mitocondrial, MitoSOX. Foi mostrado que o NAC preveniu o aumento da apoptose induzida pela EMT. Após 1 hora de tratamento, a média de intensidade de fluorescência das células foi reduzida de 877,22 para 394,25 e após 24 horas essa MFI foi de 1324,67 para 685,6 (conforme ilustrado na figura 20 C e D).

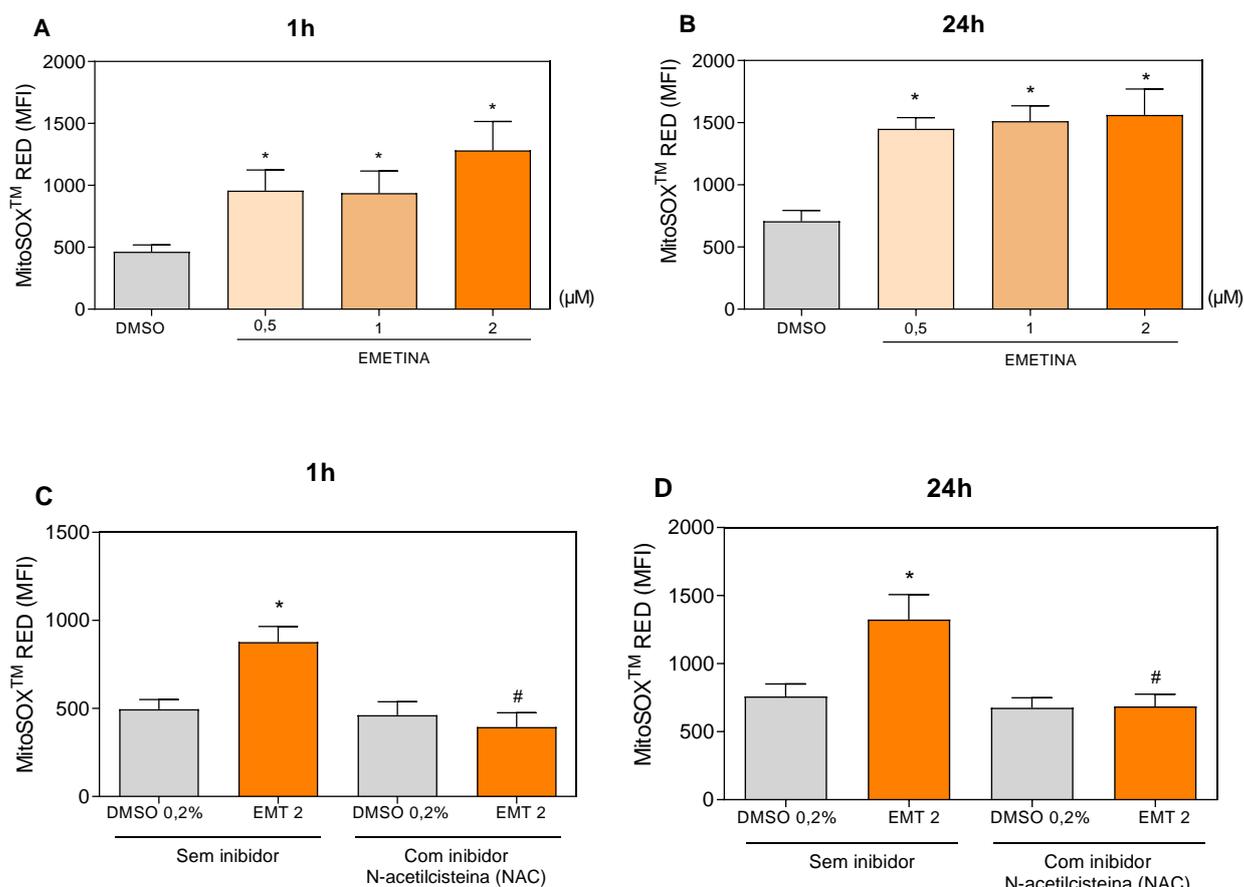


Figura 20. Efeito da EMT nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) das células KG-1a após 1 e 24 h de incubação determinada por citometria de fluxo. A-B. Quantificação do EROs com o uso da coloração MitoSOX™ (RED). O DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. C-D. Efeito do inibidor de espécies reativas de oxigênio, N-acetyl-L-cysteine (NAC), na apoptose induzida pela EMT. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média ± 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 Student Newman-Keuls ou teste t.

Além disso, ao utilizar o inibidor N-acetil-L-cisteína (NAC) em combinação com anexina V-FITC/IP para verificar o efeito sobre a morte celular, observamos uma prevenção da ocorrência de morte celular apoptótica causada pela EMT após o uso do inibidor. O número de células em apoptose foi reduzido de 38,36% para 26,34% quando o NAC foi utilizado após 24 horas de tratamento (figura 21).

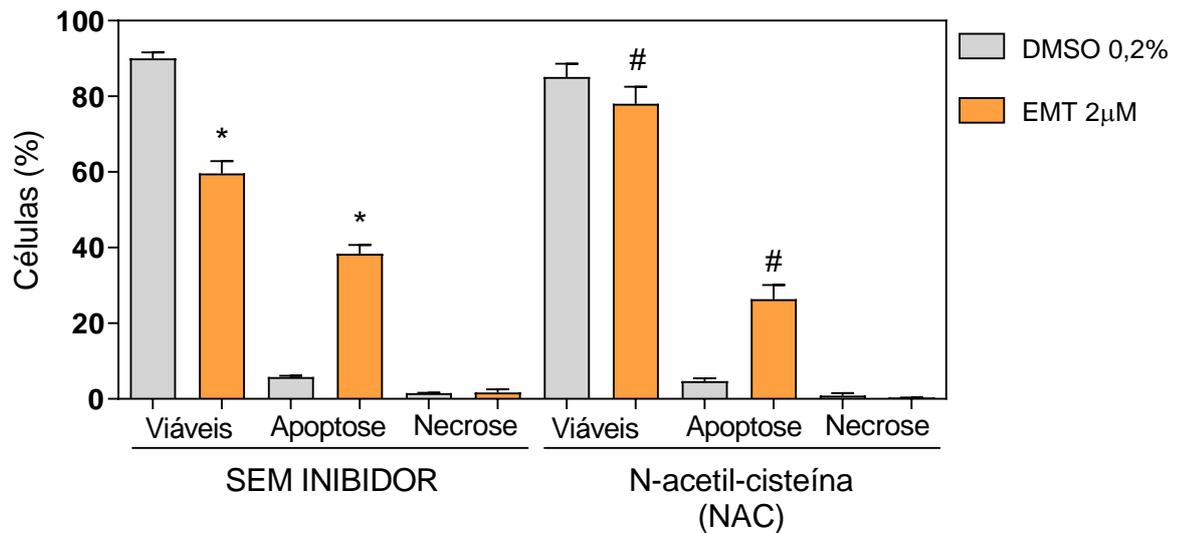


Figura 21. Efeito do inibidor de espécies reativas de oxigênio, N-acetyl-L-cysteine (NAC), na apoptose induzida pela EMT em células KG-1a determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/IP. Quantificação da porcentagem de células em apoptose inicial e apoptose tardia. Foram avaliados dez mil eventos por experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * p <0,05 em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls. # p <0,05 em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

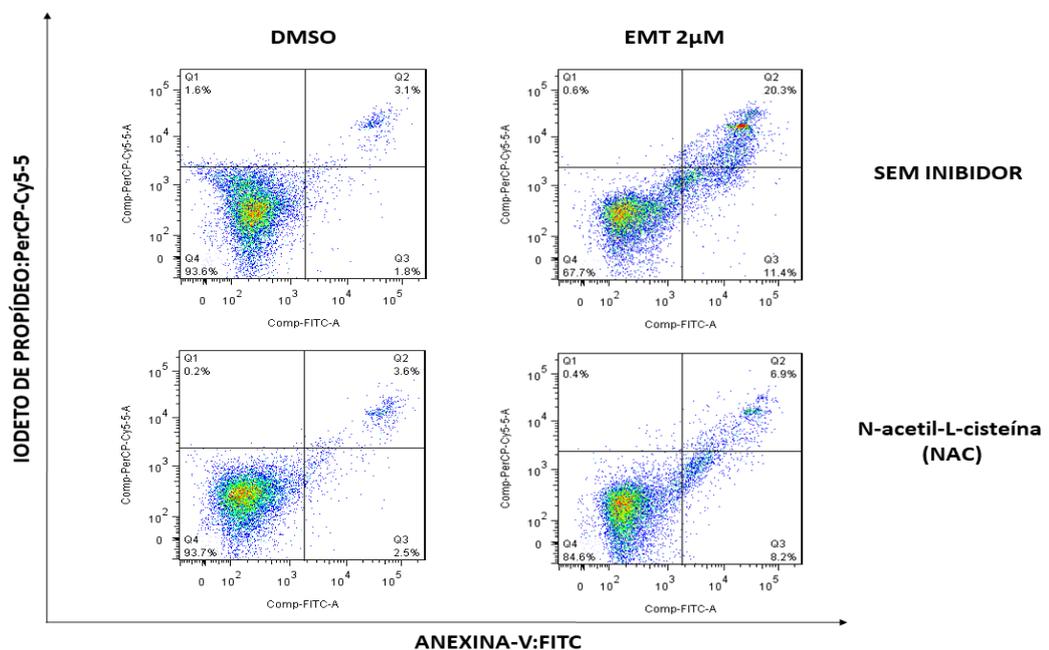


Figura 22. Dotplots representativos da marcação com Anexina-V/IP e o uso do inibidor NAC. O DMSO 0,2%, foi utilizado como controle negativo.

4.5 EMT causa fragmentação do DNA em células KG-1a

Prosseguindo com nossa investigação sobre o mecanismo de ação da EMT, realizamos a quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo a fim de mensurar a fragmentação internucleossomal do DNA e a distribuição do ciclo celular em células KG-1a tratadas com EMT por diferentes períodos de tempo (12, 24, 48 e 72 horas). Consideramos como DNA sub-diplóide (sub-G0/G1) todo o DNA fragmentado. Apresentamos os resultados da distribuição do ciclo celular na figura 23 e tabela 3.

Observamos que o tratamento com EMT provocou um aumento significativo na fragmentação do DNA internucleossomal a partir de 12 horas de tratamento, para todas as concentrações testadas, resultando em uma consequente diminuição no número de células nas outras fases do ciclo celular. Para a concentração mais alta de EMT testada (2 μ M), observamos um aumento no número de células com fragmentação internucleossomal de 11,97% em relação ao controle negativo para 34,23% após 12 horas de tratamento, de 10,48% para 46,21% após 24 horas, de 14,57% para 71,67% após 48 horas e de 13,46% para 85,80% após 72 horas de tratamento. Além disso, a doxorrubicina também provocou fragmentação do DNA a partir de 12 horas de incubação.

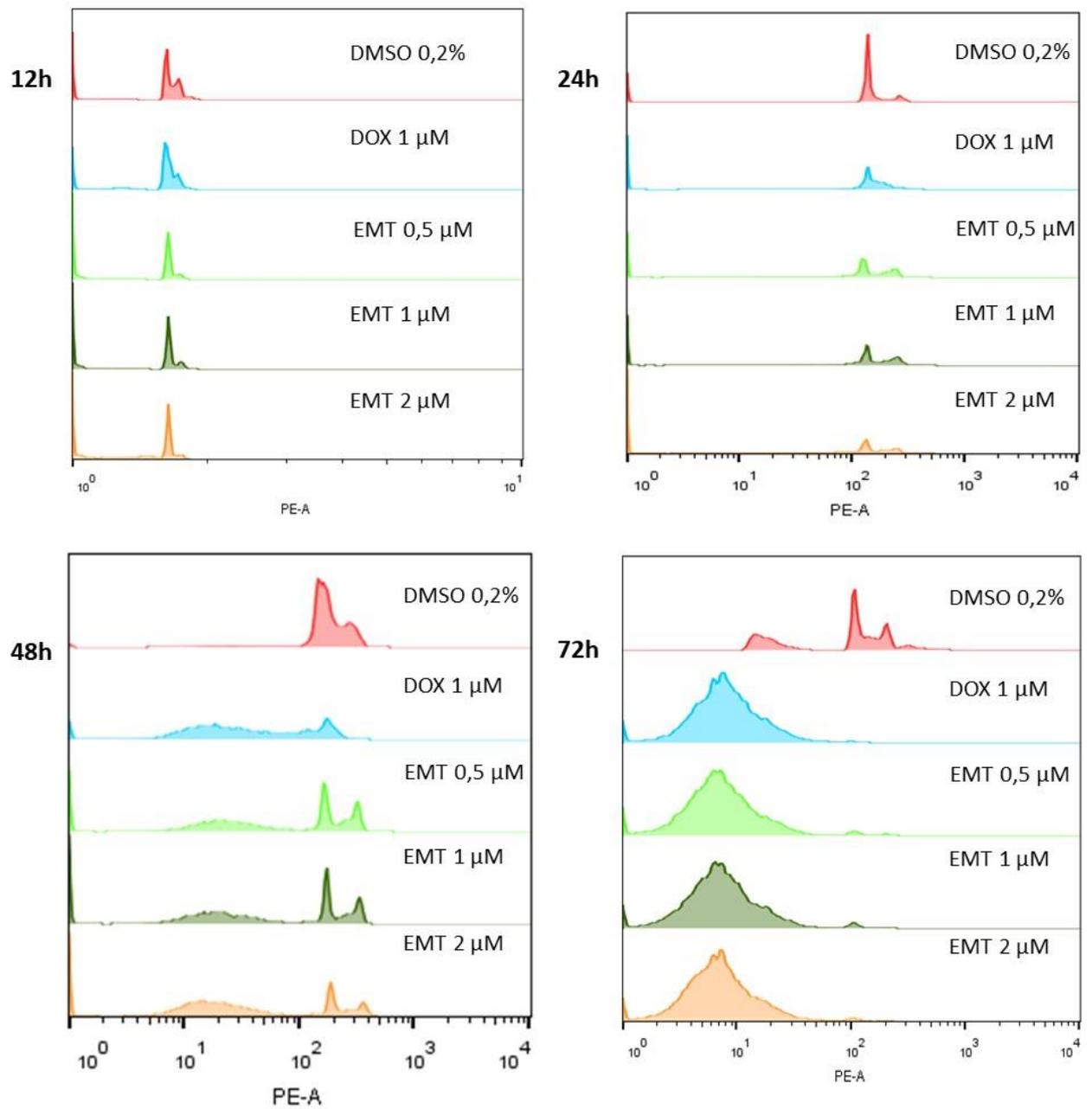


Figura 23. Histogramas representativos da análise do conteúdo de DNA de células KG-1a após o tratamento com EMT.

Tabela 4. Efeito da EMT sobre a distribuição do conteúdo de DNA celular.

Tratamento	Concentração ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	Distribuição do Conteúdo de DNA (%)			
		Sub G_0/G_1	G_0/G_1	S	G_2/M
12 h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	11,97 \pm 1,65	37,95 \pm 4,18	14,56 \pm 0,81	15,71 \pm 2,40
Doxorrubicina	1	26,16 \pm 3,53*	27,86 \pm 2,26	13,28 \pm 1,40	14,12 \pm 1,56
EMT	0,5	26,41 \pm 3,61*	30,52 \pm 6,97	6,44 \pm 2,13*	5,07 \pm 1,54*
EMT	1	28,54 \pm 3,42*	30,86 \pm 7,11	5,61 \pm 1,37*	5,18 \pm 1,00*
EMT	2	34,23 \pm 3,31*	30,56 \pm 3,77	3,89 \pm 1,66*	4,52 \pm 0,98*
24 h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	10,48 \pm 3,24	47,61 \pm 6,36*	13,26 \pm 0,41	12,16 \pm 1,70
Doxorrubicina	1	37,31 \pm 10,41*	19,17 \pm 3,16*	5,58 \pm 1,23*	7,57 \pm 2,65
EMT	0,5	32,31 \pm 4,07*	29,13 \pm 3,82*	8,14 \pm 1,94*	10,93 \pm 1,75
EMT	1	34,05 \pm 4,50*	25,67 \pm 4,30*	5,34 \pm 1,16*	10,03 \pm 1,39
EMT	2	46,21 \pm 8,35*	17,66 \pm 2,06*	6,32 \pm 0,94*	6,33 \pm 0,94
48 h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	14,57 \pm 2,85	46,54 \pm 3,09	14,02 \pm 0,93	12,9 \pm 0,65
Doxorrubicina	1	76,3 \pm 3,12*	8,17 \pm 2,24*	1,52 \pm 0,23*	3,13 \pm 1,18*
EMT	0,5	62,31 \pm 5,23*	15,22 \pm 3,72*	5,18 \pm 2,01*	5,21 \pm 1,80*
EMT	1	69,28 \pm 4,56*	13,01 \pm 1,89*	3,63 \pm 1,51*	3,77 \pm 1,36*
EMT	2	71,67 \pm 3,04*	8,58 \pm 0,78*	3,84 \pm 1,08*	2,75 \pm 0,83*
72 h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	13,46 \pm 1,08	49,25 \pm 1,69	13,19 \pm 0,84	12,78 \pm 2,60
Doxorrubicina	1	89,59 \pm 2,74*	1,71 \pm 0,58*	1,03 \pm 0,28	0,92 \pm 0,26*
EMT	0,5	84,26 \pm 4,28*	3,27 \pm 1,60*	1,25 \pm 0,87	1,59 \pm 0,76*
EMT	1	82,91 \pm 4,41*	3,91 \pm 1,75*	1,84 \pm 1,08	1,39 \pm 0,50*
EMT	2	85,80 \pm 3,86*	3,64 \pm 1,90*	0,73 \pm 0,35	1,16 \pm 0,21*

Os valores correspondentes a média \pm E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. DMSO 0,2% foi utilizado 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 Student Newman-Keuls.

4.6 A EMT inibe a via NF- κ B nas células KG-1a

A subunidade p65 é uma componente do fator de transcrição NF- κ B, 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 a jusante. A figura 24 mostra a marcação de células KG-1a por citometria de fluxo utilizando anticorpo monoclonal específico para a subunidade p65 de NF- κ B fosforilada em serina 529. Observou-se uma redução significativa na expressão de NF- κ B p65 (pS529) após o tratamento com EMT em comparação com o controle negativo. Adicionalmente, a redução NF- κ B fosforilada em serina 536 foi observada no blot tratado com EMT (figura 24 B). Em conjunto com os resultados da citometria de fluxo sugerem uma possível inibição da ativação da via NF- κ B pelo composto.

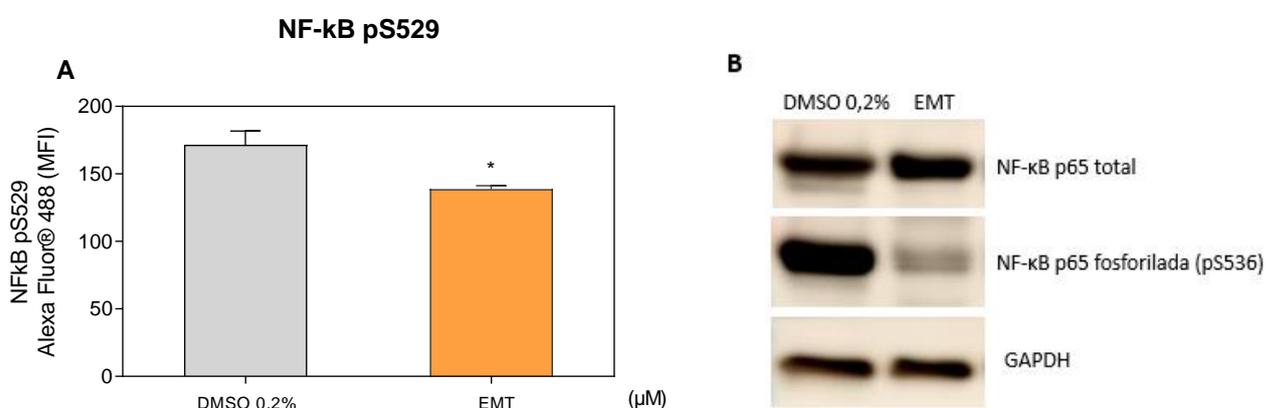


Figura 24. Expressão de NF- κ B em células KG-1a após o tratamento com EMT por 24h. A) Expressão de NF- κ B pS529 determinada por citometria de fluxo. B) Imagens de western blot. O DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos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

Utilizamos também a microscopia confocal para analisar a influência do tratamento com EMT na via NF- κ B em células KG-1a. Para isso foi utilizado o anticorpo anti-NF- κ B p65 PE observado através da microscopia confocal. Na figura 25, é possível notar uma redução na ativação de NF- κ B após o tratamento com EMT 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%.

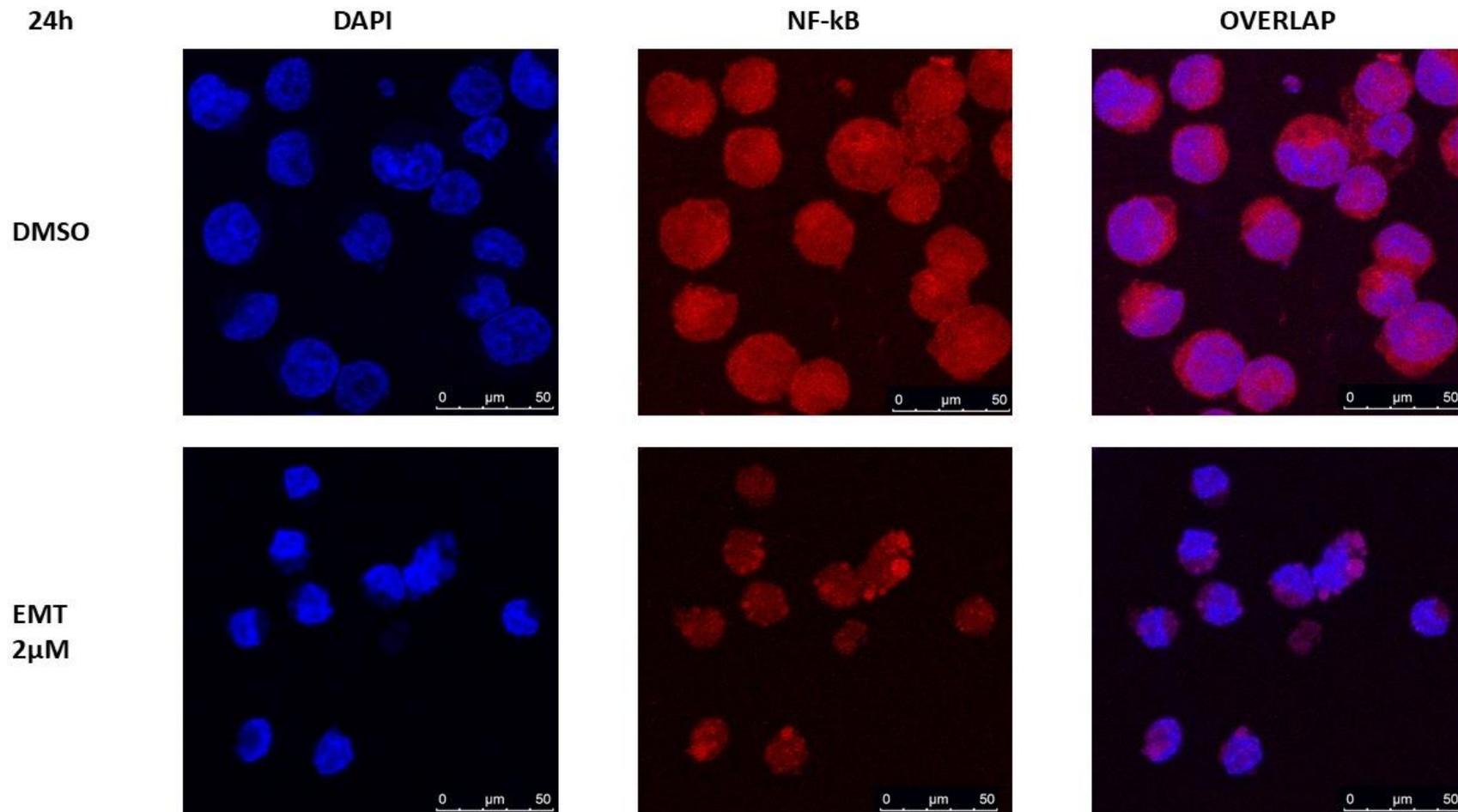


Figura 25. Microscopia Confocal de células KG-1a marcadas com anticorpo anti-NF-κB p65 PE marcando em vermelho e DAPI (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific) marcando em azul. Imagem obtida através do microscópio confocal Zeiss na objetiva de 63x.

4.7 A EMT afeta a regulação de diversos genes

A análise da regulação gênica induzida pela EMT foi realizada em células KG-1a através de qPCR após 12 h de tratamento com 2 μ M do composto. Foi considerada a ocorrência de regulação positiva quando o valor da quantificação relativa (QR) era igual ou superior a 2, e regulação negativa quando o valor de QR era igual ou inferior a 0,5. Foi analisado um painel contendo 92 genes relacionados a apoptose, sobrevivência, estresse oxidativo entre outras vias de interesse nas CTLs, conforme mostrado na tabela 1S.

Observou-se que a EMT aumentou a regulação de 54 dos genes analisados. Entre eles, destacam-se os genes NFKBIA e NFKBIB, que são inibidores do fator de transcrição NF- κ B, e os genes que codificam as caspases 3 e 7, ambos envolvidos no processo de apoptose. Além disso, identificamos a regulação negativa de 5 genes, incluindo Twist 1, Wnt-10b, PARP-1, PPARG co-ativador 1 β e BCL-2. Esses genes possuem conhecido papel antiapoptótico (Figura 26).

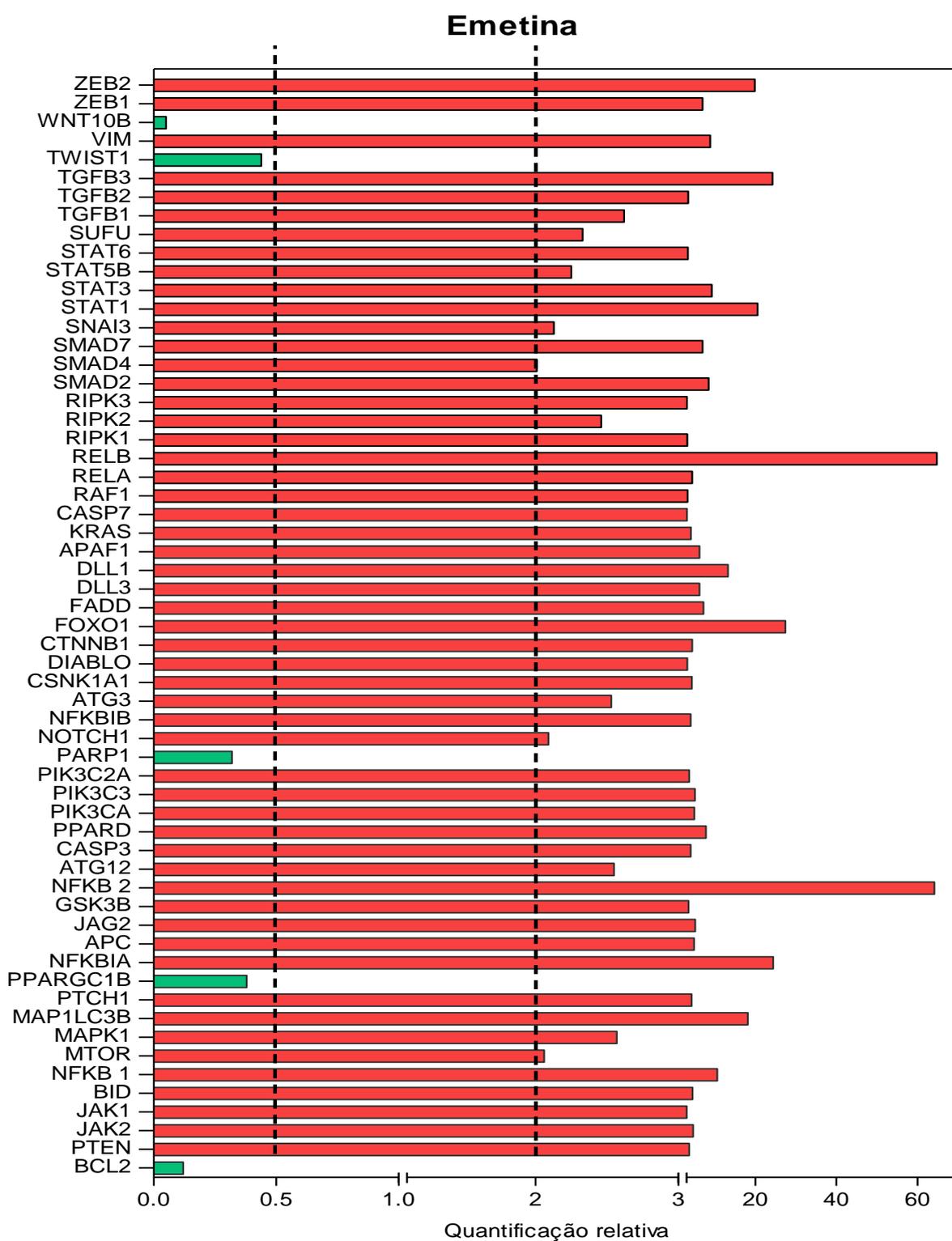


Figura 26. Análise de qPCR para vários genes em células KG-1a após 12 h de tratamento com EMT 2 μ M. Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo - DMSO 0,2%). Os genes foram considerados regulados positivamente se QR \geq 2 e foram considerados regulados negativamente se QR \leq 0,5.

4.8 EMT inibe o desenvolvimento *in vivo* de células KG-1a

A atividade antileucêmica *in vivo* da EMT foi investigada em camundongos NSG. Os animais foram tratados com bulsufano (25 mg/kg) um dia antes do transplante das células KG-1a, seguido pelo tratamento com EMT na dose de 10 mg/kg, administrado por via intraperitoneal, uma vez por dia, durante 15 dias consecutivos. Afim de identificar e diferenciar a presença de células leucêmicas humanas na medula óssea, sangue e baço dos animais, foram utilizados anticorpos específicos anti-CD45-PE humano e anti-CD45-FITC de camundongo (Becton Dickinson).

O tratamento com a EMT foi capaz de reduzir a quantidade de células marcadas com CD45 humano, indicando uma redução das células leucêmicas presentes na medula óssea e no sangue dos camundongos, quando comparado ao grupo controle negativo. Isso indica o potencial antileucêmico *in vivo* desse composto. Não houve redução estatisticamente significativa nas células presentes no baço dos animais (figura 27).

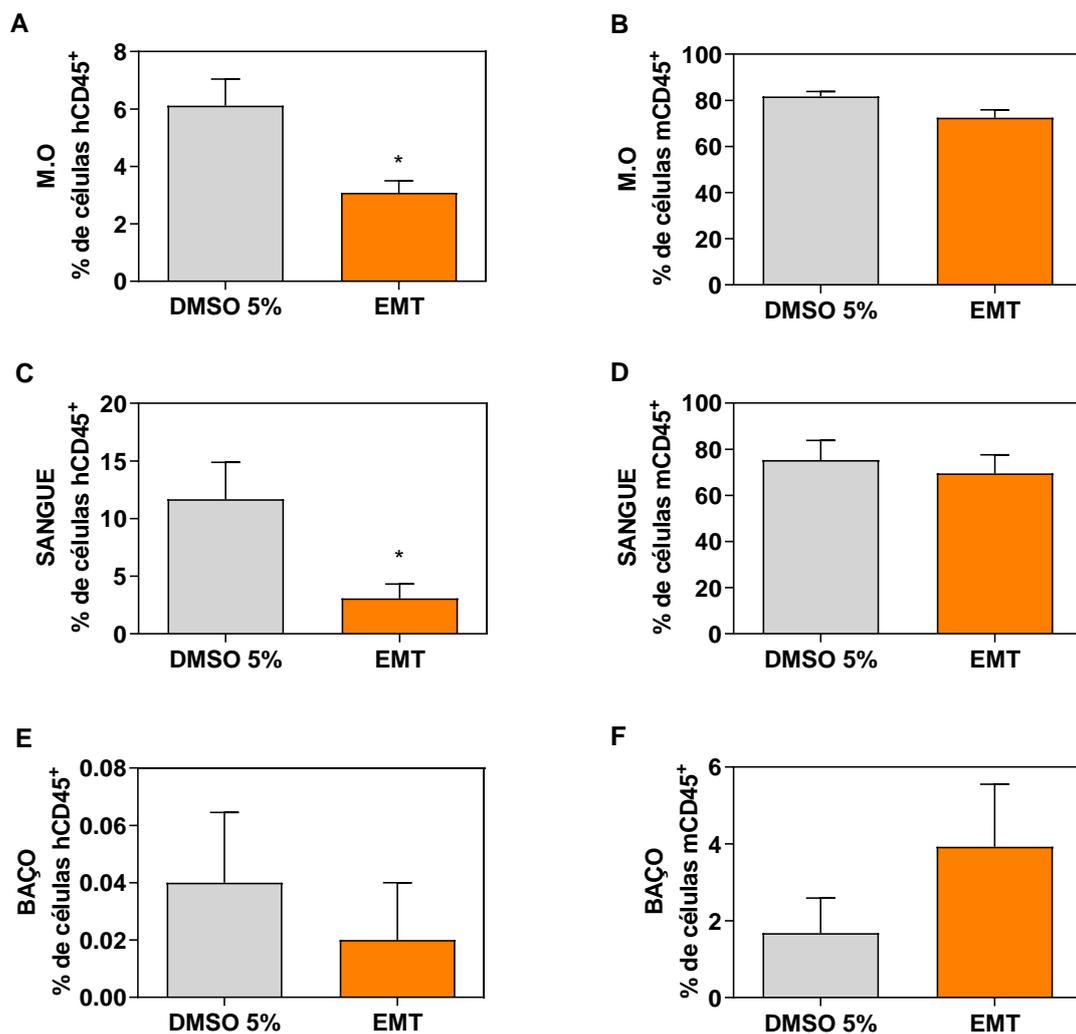


Figura 27. Efeito *in vivo* da EMT sobre células KG-1a inoculadas em camundongos NSG. As amostras foram marcadas com anticorpo anti-CD45-PE humano e anti-CD45-FITC de camundongo. As figuras A e B mostram as marcações dos anticorpos anti-CD45 humano e de camundongo na medula óssea dos animais. A figura 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.

Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros toxicológicos nos animais tratados com EMT. Não foi observada redução no peso corporal dos camundongos após 15 dias de tratamento com EMT, em comparação com o controle negativo (tabela 4). Além disso, não foram observadas diferenças significativas de peso nos órgãos (fígado, pulmão, coração, rins) dos animais tratados com o composto em relação ao grupo de controle negativo, com exceção do baço que apresentou uma redução de tamanho, conforme verificado na tabela 5.

Tabela 5. Efeito da EMT no peso e sobrevivência dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a.

Média de peso dos animais (g)		
Grupos	DMSO 5%	EMT 10 mg/kg
Inicial	22,00 ± 0,52	24,83 ± 1,32
Final	20,68 ± 1,00	24,10 ± 1,32
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.

Tabela 6. Efeito da EMT no peso dos órgãos dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a.

Média de peso (g/100g de massa corpórea)		
Órgãos	DMSO 5%	EMT 10 mg/kg
Coração	0,46 ± 0,04	0,50 ± 0,04
Pulmão	0,81 ± 0,07	0,73 ± 0,07
Fígado	5,01 ± 0,34	5,07 ± 0,31
Rins	1,25 ± 0,16	1,31 ± 0,17
Baço	0,29 ± 0,02	0,19 ± 0,01 *

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.

Quanto às análises histopatológicas dos órgãos, mostrada na figura 28, os corações dos grupos experimentais não apresentaram alterações arquiteturais e morfológicas. Nos fígados, as arquiteturas do parênquima hepático e do sistema porta variaram de preservada a parcialmente alterada nos grupos CTL e EMT. As alterações histopatológicas observadas foram hiperemia vascular, degeneração hidrópica e inflamação tecidual mista. Essas alterações variaram de discretas a intensas, contudo, os eventos foram mais evidentes no grupo tratado com EMT. Além disso, áreas pontuais de necrose de coagulação foram observadas em hepatócitos, principalmente em regiões próximas da veia centrolobular.

Nos pulmões, a arquitetura do parênquima pulmonar estava parcialmente preservada em todos os animais dos grupos CTL e EMT. O espessamento dos septos alveolares com atelectasia do espaço aéreo foi observado em todos os animais, variando de discreto a intenso. Outras alterações histológicas foram observadas nesse órgão, como hiperemia vascular, edema e inflamação com infiltrado predominantemente de polimorfonucleares. Ainda, áreas focais de hemorragia foram observadas nos pulmões dos animais. E nos rins, a arquitetura renal estava mantida em todos os grupos experimentais. De forma geral, as alterações histopatológicas observadas neste órgão foram hiperemia vascular moderada e hialinização glomerular discreta com diminuição do espaço urinário em todos os grupos. Ainda, áreas focais de necrose de coagulação nos túbulos do córtex renal e fibrose foram observadas. Algumas características histopatológicas encontradas, como degeneração hidrópica, congestão vascular e áreas focais de inflamação são respostas celulares agudas ao estímulo relacionado ao tratamento e as células lesadas podem retornar à homeostase quando a agressão terminar.

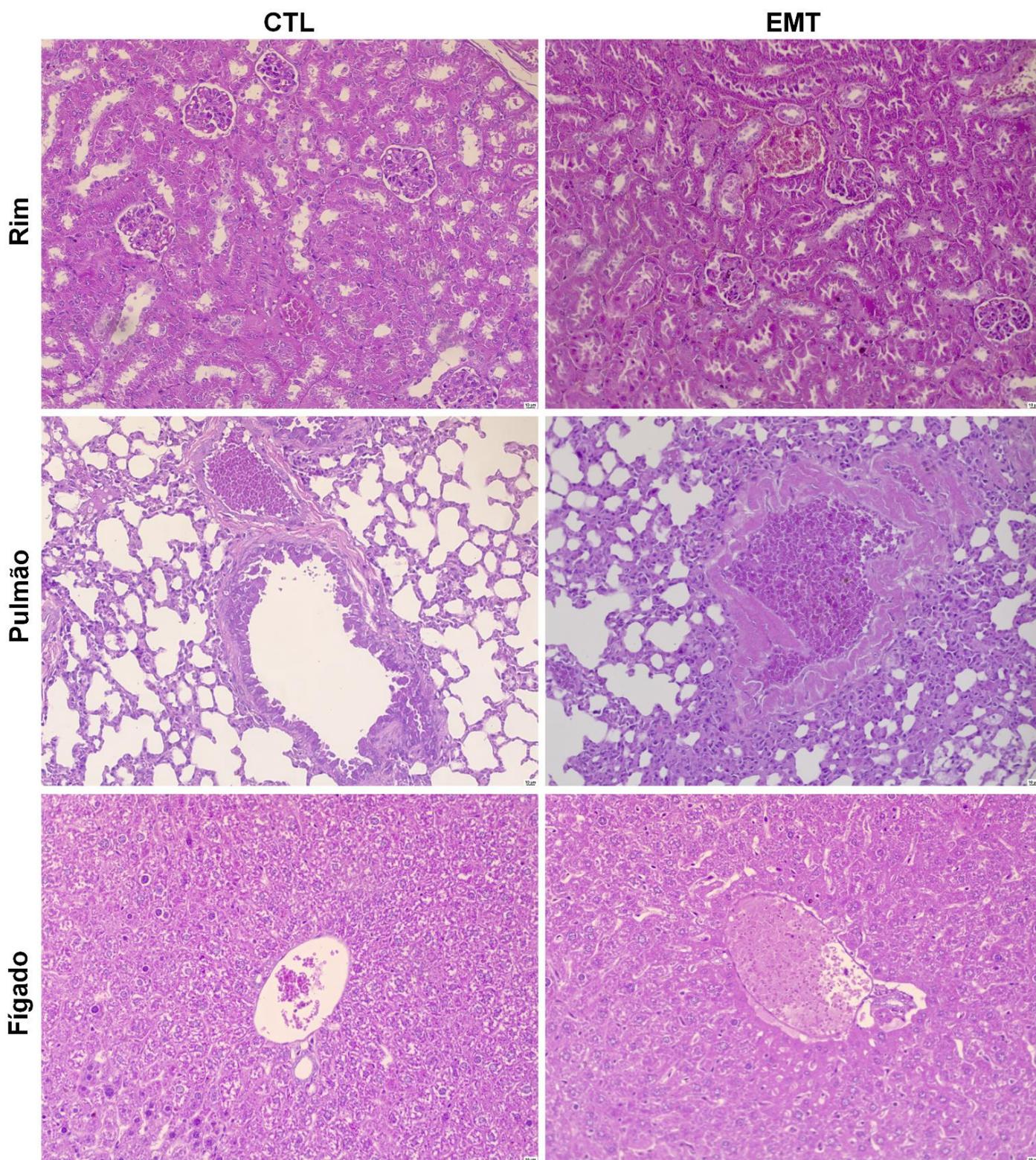


Figura 28. Fotomicrografias representativas dos órgãos de camundongos NSG transplantados com células de LMA (KG-1a) tratados com EMT. DMSO 5% foi utilizado com controle negativo. Os animais foram tratados através da via intraperitoneal durante duas semanas.

5 DISCUSSÃO

A atividade citotóxica da EMT foi descrita pela primeira vez em 1918. Desde então, foi sua eficácia tem sido demonstrada em diversos tipos de neoplasias, como linfoblastos U937, câncer de pulmão, hepatócitos murinos, câncer de ovário, câncer de bexiga, leucemia, entre outros. Essa citotoxicidade é atribuída à inibição da biossíntese de proteínas e à interação com o DNA, além da regulação de fatores pró-apoptóticos, desencadeando a apoptose (Möller et al., 2007; Alam et al., 2020).

Para uma melhor compreensão da ação citotóxica da EMT, realizamos a avaliação do seu potencial citotóxico frente a diferentes linhagens de células cancerosas e não cancerosas. Nossos resultados evidenciaram que esse composto apresenta uma potente citotoxicidade em todas as linhagens testadas, corroborando os dados existentes na literatura que apontam sua proeminente atividade citotóxica em diversas linhagens de câncer (Uzor, 2016).

Em relação às células de LMA, KG-1a, o CI_{50} foi de 0,74 μ M. Esse valor de CI_{50} se mostrou promissor, uma vez que, segundo a referência clássica do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, compostos puros com valores de CI_{50} inferiores a 4 μ g/ml são considerados promissores e devem ser investigados tanto do ponto de vista químico quanto biológico (Suffness; Pezzuto, 1990; Boik, 2001). A redução da viabilidade celular após o tratamento com EMT já foi mostrada em um estudo realizado por Cornet-Masana e colaboradores (2016), que avaliou um painel de 5 linhagens celulares de LMA, incluindo a KG-1a.

No que diz respeito às células não cancerosas, como fibroblasto de pulmão humano, fibroblasto de prepúcio humano e células mononucleares do sangue periférico, a EMT apresentou CI_{50} de 3,79 μ M, 3,73 μ M e 2,44 μ M respectivamente. O índice de seletividade para as células normais em relação às células KG-1a é em média superior a 3,2x. Esse índice indica o quão ativo um composto é sem causar danos às células saudáveis e é calculado seguindo a fórmula: $IS = CI_{50} [\text{células não tumorais}] / CI_{50} [\text{células tumorais}]$ (Callacondo-Riva et al., 2008). Foi descrito que o

valor de IS é considerado significativo quando é igual ou maior a 3, sendo que muitas vezes esse índice é maior ou igual a 1 para medicamentos anticâncer (Suffness; Pezzuto, 1990; Indrayanto et al., 2021). Portanto, a EMT pode ser um agente citotóxico promissor para a terapia do câncer, especialmente no tratamento da LMA.

Para confirmar a citotoxicidade da EMT nas células KG-1a, foi realizado o ensaio de exclusão por azul de tripan utilizando o composto nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μM . Os resultados demonstram que EMT reduziu a viabilidade celular em todos os tempos testados, confirmando sua citotoxicidade. Esses achados estão em concordância com os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade por alamar blue, fortalecendo a evidência de que a EMT é um agente citotóxico promissor.

É sabido que as CTLs expressam marcadores de superfície CD34+/CD38-, assim como CD123, CD99 e CD97 (Iwasaki et al., 2015; Chung et al., 2017; Martin et al., 2019). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com EMT resultou em uma redução significativa na população de células marcadas para CD13, CD34, CD38 e CD123 em comparação com o controle negativo após 48 horas de tratamento. Esses marcadores são característicos de células mielóides e imaturas, além disso, as CTLs apresentam uma expressão elevada de CD123 em comparação com suas contrapartes normais (Lamble et al., 2022; Pelosi et al., 2023). A expressão de CD123 se destaca desde o diagnóstico até a recidiva, tornando esse marcador um alvo terapêutico para a LMA (Pelosi et al., 2023).

O CD97 promove a proliferação e a sobrevivência das células leucêmicas, fazendo a manutenção do estado indiferenciado, sendo necessário CTLs. Esse, correlaciona-se com mau prognóstico e pode ser um alvo importante para o futuro desenvolvimento terapêutico. No nosso trabalho, não apenas o CD97 mas também o CD99, que é um marcador expresso na superfície de células-tronco leucêmicas, mas não em células-tronco hematopoiéticas normais (Chung et al., 2017; Martin et al., 2019), apresentaram uma redução significativa na marcação após o tratamento com o composto. Portanto, a redução desses marcadores após o tratamento sugere a eliminação das CTLs de LMA.

Além de eliminar as CTLs, o tratamento também causou um aumento significativo de CD14 que é um antígeno de diferenciação de monócitos humanos, indicando que o composto induziu a diferenciação monocítica. Esse receptor aumenta as respostas imunes inatas. Estudos mostraram que a ativação do CD14 diminuiu a viabilidade celular e induziu a apoptose no carcinoma adrenocortical e nas células epiteliais colorretais. Além disso, ativação de CD14 em células imunes infiltradas no tumor não apenas promove a inflamação relacionada ao câncer, como induz a imunovigilância do câncer (Silveira et al., 2008; Wu et al., 2019).

Estudos anteriores também relataram os efeitos da EMT em outras células-tronco cancerosas (CTCs). Por exemplo, foi demonstrado que o uso de EMT sensibilizou as células de carcinoma mucoepidermoide (MEC) à irradiação, resultando em uma redução significativa das CTCs das linhagens UM-HMC3A e UM-HMC3B MEC (Wagner et al., 2016). Além disso, EMT foi capaz de bloquear a autorrenovação das células-tronco de glioblastoma e inibir a via de sinalização do hedgehog, que é importante para as CTCs (Sun et al., 2019). Esses estudos destacam o potencial da EMT como um agente terapêutico direcionado às células-tronco cancerosas em diferentes tipos de câncer.

Dada a atividade citotóxica promissora da EMT e a sua capacidade de eliminar CTLs, iniciamos os estudos do seu mecanismo de ação na linhagem KG-1a. Inicialmente foi avaliado se o tratamento de células KG-1a com EMT induz morte celular por apoptose. Para isso foi realizado o ensaio de marcação com YO-PRO e IP para identificar células em apoptose e morte celular. Verificou-se um aumento significativo no número de células em apoptose e morte celular após o tratamento com EMT. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que indicaram que a EMT induz apoptose, como demonstrado por Cornet-Masana et al. (2016) em LMA, Yosifov et al. (2020) na leucemia linfocítica crônica e Möller et al. (2006) na leucemia linfoide.

A caspase-3 está envolvida na via apoptótica mitocondrial e é uma caspase efetora pertencente à família das cisteína proteases. Sua ativação desempenha um

papel central no mecanismo de apoptose, clivando vários componentes celulares envolvidos no reparo e controle do DNA (Pan et al., 2011). Para confirmar a indução da apoptose pela EMT, realizamos a quantificação da ativação da caspase-3 nas células KG-1a tratadas com o composto.

Observamos um aumento significativo na ativação da caspase-3 após 24 horas de incubação com EMT. A clivagem da caspase-3 praticamente dobrou em relação ao controle negativo. Esses resultados estão em concordância com estudos encontrados na literatura, como o trabalho de Miller e colegas (2010), que indicou que EMT é capaz de ativar as caspases-3/7 e induzir citotoxicidade em células de câncer cervical. Outros estudos também revelaram que EMT induz despolarização mitocondrial dependente de caspase em células Jurkat (Möller et al., 2006 e 2007). Além disso, a EMT demonstrou atividade antitumoral e ativação da caspase-3, induzindo apoptose em cânceres pancreáticos e brônquicos (Larsson et al., 2012). Para confirmar a importância das caspases na apoptose induzida pela EMT, realizamos experimentos utilizando um inibidor de caspase, ZVAD, que foi capaz de reduzir a morte celular causada pelo composto. Esses resultados corroboram os achados de Möller et al. (2006) e confirmam que a EMT induz apoptose mediada por caspases.

Outra proteína envolvida no processo apoptótico é a poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), que atua como um sensor de quebra da fita de DNA e está envolvida em seu reparo. Geralmente, os níveis de PARP-1 aumentam em resposta ao estresse para reparar o DNA danificado. A clivagem da PARP-1 pela caspase-3 resulta em um fragmento de 85 kDa, inativando a PARP-1 e impedindo seu papel no reparo do DNA, desencadeando a apoptose (Haykal et al., 2021).

Uma vez que observamos a ativação da caspase-3 após o tratamento com a EMT, investigamos também se esse composto era capaz de elevar os níveis de clivagem de PARP-1. Verificou-se que a EMT foi capaz de aumentar os níveis de clivagem dessa proteína em aproximadamente 3x quando comparado com o grupo controle negativo tratado com DMSO 0,2%. Esses resultados reforçam a indicação de

que EMT induz a apoptose, uma vez que a clivagem da PARP-1 é considerada um marcador de células em processo apoptótico (Wu et al., 2021). Além disso, esses dados corroboram resultados encontrados de que a EMT causa morte celular mediada por caspases. A clivagem de PARP-1 também foi relatada em células KG-1a tratadas com outros compostos (Haykal et al., 2021).

A via intrínseca da apoptose é regulada por caspases e membros da família Bcl-2, incluindo tanto os membros anti-apoptóticos, como BCL-2 e BCL-XL, quanto os membros pró-apoptóticos, como BAX, BAK, BAD, BID, BIK, BIM, Puma e Noxa (Galluzzi et al., 2012). A proteína BAD desempenha um papel importante na inativação dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, levando à indução da apoptose (Doerflinger et al., 2015).

Com o objetivo de investigar se o gene BAD é essencial para a apoptose mitocondrial induzida pela EMT, realizamos um ensaio de citotoxicidade utilizando o ensaio de alamar blue após 72 horas de incubação. Foram utilizadas as linhagens celulares BAD KO SV40 MEF (fibroblastos embrionários de rato imortalizados com o gene BAD knockout) e sua linhagem parental WT SV40 MEF (fibroblastos embrionários de rato imortalizados com o gene BAD tipo selvagem). Os valores de Cl_{50} para a EMT foram de 0,73 μ M para as células BAD-MEF e 0,8 μ M para as células WT-MEF, o que indica que o gene BAD não é essencial para a citotoxicidade de EMT, uma vez que não houve diferenças significativas na sensibilidade das células na presença ou ausência desse gene. Além disso, avaliamos a morte celular induzida pelo composto nessas células utilizando a marcação com anexina V e IP por citometria de fluxo. Observamos uma diminuição na viabilidade celular, bem como um aumento no número de células em apoptose e necrose em ambas as linhagens, o que corrobora os achados anteriores de que o gene BAD não é fundamental para o mecanismo de ação da EMT.

As células-tronco hematopoéticas e CTLs, em um estado dormente, estão localizadas em nichos com baixos níveis de oxigênio na medula óssea, utilizando um metabolismo especial para sobreviver nesse ambiente (Tan et al., 2020). Essas

células utilizam diferentes mecanismos adaptativos para evitar o estresse oxidativo e manter baixos níveis de EROs, entre esses mecanismos está a redução da carga oxidativa por meio do uso preferencial de glicose para produzir ATP. As CTLs apresentam altos níveis de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) e baixos níveis intracelulares de EROs em comparação com as células leucêmicas. Essa é uma estratégia utilizada por elas para manter suas funções e evitar a ativação da via intrínseca da apoptose, que pode ser desencadeada pela produção excessiva de EROs (Mattes et al., 2019; Stelmach & Trumpp 2023).

A mitocôndria desempenha diversos papéis cruciais na célula, fornecendo ATP através da cadeia de fosforilação oxidativa, modulando a concentração de cálcio intracelular e regulando a apoptose (Chen et al., 2013). Levando em consideração a importância da mitocôndria para a sobrevivência celular e os mecanismos de sobrevivência utilizados pelas CTLs, investigamos se o tratamento com EMT é capaz de induzir a despolarização mitocondrial. Observamos uma perda do potencial transmembrânico mitocondrial após 24 horas de tratamento.

Adicionalmente, foi observada a geração de EROs após 1 ou 3 horas de incubação com o composto, através do uso da sonda H₂-DCF-DA em análise por citometria de fluxo. Além da presença aumentada de superóxido mitocondrial, como observado após 24 horas de incubação, com utilização do MitoSOX. No estudo realizado por Yosifov et al. (2020), a EMT também induziu alterações pró-oxidativas que perturbaram a homeostase redox das células de leucemia linfocítica crônica (LLC). Esses resultados sugerem que a EMT afeta a função mitocondrial e leva à geração de EROs, contribuindo para a indução da apoptose nas células KG-1a. A disfunção mitocondrial e a geração excessiva de EROs podem comprometer a sobrevivência das células leucêmicas, que dependem de um metabolismo especializado e baixos níveis de estresse oxidativo para manter suas funções (Yosifov et al., 2020; Stelmach & Trumpp 2023).

A modulação da produção de EROs, causando sua superprodução, pode ser uma estratégia promissora para eliminar seletivamente CTLs de LMA. Alguns agentes,

como o partenólídeo, foram relatados por induzir estresse oxidativo e promover a apoptose seletiva nas CTLs (O'Brien et al., 2012; Ding et al., 2017). Em nossos estudos demonstramos que o uso do inibidor de EROs, NAC, foi capaz de reduzir a morte celular induzida pela EMT, o que está em concordância com a ideia de que a apoptose mediada pela EMT é mediada pela geração de EROs. A ocorrência de EROs pode causar danos ao DNA e interferir em várias vias de sinalização celular (Verbon et al., 2012). Essas espécies reativas são produtos do metabolismo celular e estão envolvidas na apoptose tanto pela via extrínseca do receptor de morte celular como na via intrínseca mitocondrial (Tan et al., 2020). Portanto, ao induzir estresse oxidativo e gerar um aumento na produção de EROs, a EMT pode desencadear a apoptose nas CTLs de LMA. A capacidade da EMT de gerar EROs e afetar a homeostase redox das células leucêmicas pode ser explorada como uma abordagem terapêutica potencial no tratamento da LMA.

A produção de EROs, pode ter um impacto significativo na progressão do ciclo celular. Essas EROs têm a capacidade de ativar receptores de fator de crescimento e também de induzir fosforilação e ubiquitinação nos reguladores do ciclo celular (Verbon et al., 2012). Esses efeitos combinados podem desregular o equilíbrio do ciclo celular e interferir na sua correta progressão. Assim, o entendimento dos efeitos do tratamento com EMT sobre o ciclo celular é importante para melhor compreender seu mecanismo de ação.

Dessa maneira, analisamos a distribuição do conteúdo do ciclo celular em células KG-1a tratadas com a EMT. Foi evidenciado que o tratamento causou fragmentação do DNA internucleossomal a partir de 12h para todas as concentrações testadas, com uma conseqüente diminuição no número de células que se encontram nas outras fases do ciclo celular. Essa fragmentação do DNA internucleossomal observada é consistente com a ocorrência do processo apoptótico. Durante a apoptose, ocorre a quebra do DNA em pequenos fragmentos devido à ação de endonucleases. Essa degradação do DNA é incompleta nas regiões internucleossomais, resultando em fragmentos de baixo conteúdo de DNA, aproximadamente 200 pares de base. Esses fragmentos de DNA aparecem na fração

sub-G1 do histograma na análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (Wyllie et al., 1980; Saraste & Pulkki, 2000).

Estudos anteriores realizados por Möller et al. (2006, 2007) com células Jurkat também mostraram que a EMT induziu a fragmentação do DNA em padrões internucleossomais, resultando no acúmulo de células na fase sub G0/G1. Além disso, a fragmentação do DNA causado por EMT já tinha sido descrita em células de linfoma U937. Esses achados são consistentes com nossos resultados e apoiam a ideia de que o tratamento com EMT promove a fragmentação do DNA e afeta a distribuição do conteúdo do ciclo celular nas células KG-1a, o que é consistente com a indução da apoptose e interrupção da progressão do ciclo celular.

A via NF- κ B desempenha um papel crucial na quimiorresistência, sobrevivência e proliferação das CTLs, especialmente na LMA, onde sua ativação constitutiva foi observada em pelo menos 40% dos casos, representando um desafio para o tratamento eficaz dessa neoplasia hematológica (Zhou et al., 2015; Guzman et al., 2001). Neste estudo, investigamos se o tratamento com EMT poderia inibir essa sinalização em células KG-1a. Observamos uma redução significativa na ativação do NF- κ B após o tratamento com o composto em comparação com o controle negativo, sugerindo uma possível inibição dessa via por EMT. Além disso, a análise de microscopia confocal revelou uma menor marcação de NF- κ B no núcleo após tratamento com EMT, indicando uma redução na ativação do NF- κ B p65 uma vez que a translocação dos dímeros de NF- κ B para o núcleo é necessária para a transcrição dos genes relacionados a essa via (Bilajac et al., 2022).

Estudos anteriores demonstraram que a inibição de NF- κ B pode aumentar a apoptose em linhagens de células leucêmicas e em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (Khosravi et al., 2018). Além disso, a EMT tem sido associada à sensibilização de células de carcinoma de células escamosas à radioterapia, através da modulação da via NF- κ B (Wagner et al., 2016). O screening realizado pelo NIH também revelou que a EMT inibe a via NF- κ B e a fosforilação de I κ B α (Miller et al., 2010), corroborando nossos achados. Estudos adicionais demonstraram que a

inibição farmacológica da sinalização de NF- κ B altera a expressão de genes associados às CTLs, sugerindo que esse poderia ser um alvo terapêutico promissor para o tratamento da LMA, inclusive com potencial eliminação das CTLs (Skelding et al., 2022).

Realizamos uma triagem gênica por qPCR para avaliar os efeitos do tratamento com EMT sobre a expressão de genes relevantes para a sobrevivência, proliferação e resistência de CTLs na LMA, utilizando células KG-1a. Analisamos um total de 92 genes e observamos a regulação negativa de cinco deles: PARP-1, Twist 1, PPARG co-ativador 1 β , Wnt-10b e BCL-2, ambos relatados na literatura como oncogênicos, com exceção da PARP-1 que é reparador do DNA e sua ausência ou diminuição da expressão leva ao acúmulo de mutações e indução da apoptose nas células.

O gene Twist 1 está envolvido no processo de transição epitélio-mesenquimal e é frequentemente encontrado superexpresso em cânceres metastáticos (Khan et al., 2013). PARP-1, como mencionado anteriormente, desempenha um papel no reparo do DNA, e a sua degradação ou redução da expressão pode levar à apoptose celular (Haykal et al., 2021). PPARG e Wnt estão associados à sobrevivência, proliferação e autorrenovação das CTLs na LMA (Rodrigues et al., 2021). Estudos anteriores demonstraram que a EMT é capaz de reduzir a sinalização da via Wnt/ β -catenina em câncer de pulmão de células não pequenas (Wu et al., 2019). Além disso, o gene BCL-2, conhecido por seu papel antiapoptótico, teve sua expressão reduzida após o tratamento com EMT. Fármacos que inibem a atividade de BCL-2, como o venetoclax, são de grande interesse no tratamento do câncer, pois promovem a ocorrência de morte celular programada (Hafezi e Rahmani, 2021).

A análise da expressão gênica após o tratamento com EMT revelou ainda um aumento na expressão de 54 dos 92 genes analisados. Entre os genes que apresentaram aumento na expressão, destacam-se as caspases-7 e caspase-3, o que indica a indução de apoptose pelo composto, corroborando nossos achados anteriores que mostraram o aumento da ativação dessas caspases em ensaios com anticorpos específicos. Além disso, observamos um aumento significativo na

expressão dos genes NFκBIA e NFκBIB, que codificam os inibidores da via NF-κB, sugerindo a inibição dessa via. Esses resultados estão em concordância com os dados obtidos em nossos experimentos anteriores, que demonstraram uma redução na ativação da via NF-κB. Outros genes que foram regulados positivamente são mostrados na figura 29 e tabela 1S. Esses genes incluem membros adicionais da via NF-κB, componentes de vias de sinalização relacionadas à apoptose, como BIB e DIABLO, e genes envolvidos na necroptose, como RIPK1-3. Estudos anteriores também relataram que a EMT regula positivamente genes pró-apoptóticos e genes anti-sobrevivência, enquanto regula negativamente genes anti-apoptóticos e genes pró-sobrevivência (Yosifov et al., 2020).

É importante ressaltar que a regulação positiva de um gene não indica necessariamente uma maior ativação desse gene, uma vez que múltiplas etapas estão envolvidas desde a expressão até a ativação efetiva de um gene. Além disso, a eliminação de CTLs de LMA pode ocorrer mesmo quando há um aumento na regulação de genes-alvo da via NF-κB, como NF-κB1, NF-κB2, NF-κBIA e RELA/B (Bystrom et al., 2019).

Uma vez que o caminho de um novo quimioterápico passa por testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*, realizamos a avaliação da atividade antileucêmica *in vivo* da EMT em camundongos NSG inoculados com células KG-1a. Observamos que o tratamento com EMT foi capaz de reduzir a quantidade de células leucêmicas na medula óssea e no sangue dos camundongos, indicando seu potencial antileucêmico *in vivo*. Além disso, não foram observadas alterações significativas no peso final e nem no peso dos órgãos dos animais controle e tratado com EMT, sugerindo que a dose testada não produziu toxicidade.

Estudos anteriores também demonstraram a atividade da EMT *in vivo*. Em um trabalho conduzido por Cornet-Masana (2016), o tratamento com EMT reduziu significativamente a presença de células de LMA na medula óssea de camundongos transplantados, bem como diminuiu sua capacidade de autorrenovação. Em outro

estudo utilizando um modelo murino de LLC em camundongos C57BL/6, a EMT nas doses de 8-24mg/kg resultou em perda de peso, porém prolongou significativamente a sobrevivência dos animais e reduziu o número de linfócitos no sangue, restaurando a hematopoiese normal (Yosifov et al., 2020). Esses resultados corroboram nossos achados, indicando que a EMT possui potencial como um agente antileucêmico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ressaltam a promissora atividade do composto como uma possível opção terapêutica no tratamento da LMA, e são encorajadoras para o desenvolvimento de estudos adicionais visando melhor compreender os mecanismos de ação desse composto, sua eficácia em diferentes subtipos de LMA e sua segurança para uma possível aplicação clínica.

6 CONCLUSÃO

EMT apresentou-se como um composto citotóxico promissor sendo capaz de eliminar CTLs de LMA *in vitro* e *in vivo*. Esse fármaco exerce seus efeitos citotóxicos por meio de vários mecanismos como por exemplo, ativação da caspase-3, clivagem de PARP-1, além de levar a despolarização mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio, fragmentação do DNA internucleossomal e inibição da via NF- κ B em células KG-1a. Sendo assim, a EMT apresenta-se como uma alternativa promissora no tratamento da LMA.

O mecanismo de ação da emetina demonstrado nesse estudo em células KG-1a é resumido na figura 29.

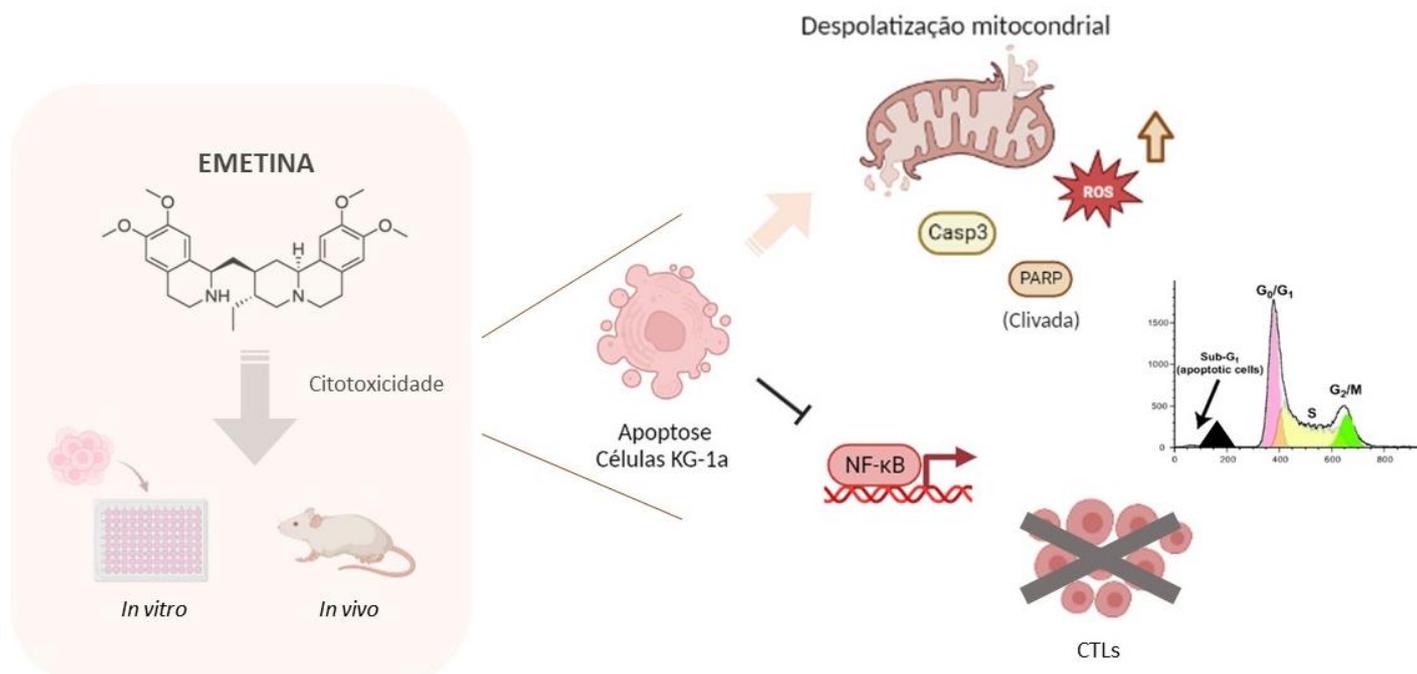


Figura 29. Mecanismo de ação resumido da emetina em células KG-1a. Fonte: elaborado pela autora.

7 REFERÊNCIAS

ALAM, MN; YU, JQ; BEALE, P; HUQ, F. Dose and sequence dependent synergism from the combination of oxaliplatin with emetine and patulin against colorectal cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2020; 20(2):264-273. doi:10.2174/1871520619666191021112042.

ALTMAN, JK; SASSANO, A; PLATANIAS, LC. Targeting mTOR for the treatment of LMA. *New agents and new directions. Oncotarget,* 2011;2, 510–517.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2020.* American Cancer Society, 2020, Atlanta.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer A-Z. Leukemia.* Atlanta: American Cancer Society, 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia.html>. Acesso em: 17 dezembro 2022. American Cancer Society. Cancer Statistics Center. Accessed on March 12, 2023.

ARBER, DA; ORAZI, A; HASSERJIAN, R; et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.

ATLAS DE MORTALIDADE POR CÂNCER. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>, acessado em 28 de janeiro de 2021.

BILAJAC E, MAHMUTOVIĆ L, GLAMOČLIJA U, et al. Curcumin Decreases Viability and Inhibits Proliferation of Imatinib-Sensitive and Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines. *Metabolites.* 2022;13(1):58. Published 2022 Dec 30. doi:10.3390/metabo13010058.

BIRKENKAMP, KU; GEUGIEN, M; et al. Constitutive NF-κB DNA-binding activity in LMA is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Leukemia,* 2004;18, 103–112.

BISPO, JAB; PINHEIRO, PS; KOBETZ, EK. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020;Jun 01;10(6).

BONNET, D; DICK, JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 1997;3, 730-737. doi:10.1038/nm0797-730.

BOON-UNGE, K; YU, Q; ZOU, T; et al. Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chemistry & Biology*, 2007;14, 1386–92.

BRASIL, T. R. Ação in vitro da atividade antineoplásica de diterpenos isolados do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa*. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.

BYSTROM, LM; BEZERRA, DP; et al. Cranberry A-type proanthocyanidins selectively target acute myeloid leukemia cells. *Blood Adv.* 2019;3(21):3261-3265. doi:10.1182/bloodadvances.2018026633.

CAO, Y; et al. Cancer research: past, present and future. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; v. 11, p. 749–754.

CALLACONDO-RIVA, David; et al. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *gnaphalium spicatum* "keto keto" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev. perú. med. exp. salud publica*, Lima, v. 25, n. 4, p. 380-385, oct. 2008.

CARROLL D, ST CLAIR DK. Hematopoietic Stem Cells: Normal Versus Malignant. *Sinal antioxidante Redox.* 2018;29(16): 1612-1632. doi: 10.1089/ars.2017.7326.

CHUNG, S; KLIMEK, V; PARK, C. CD99 is a therapeutic target on disease stem cells in acute myeloid leukemia and the myelodysplastic syndromes. *Exp. Hematol.* 2014;42, S20.

CHUNG, SS; ENG, WS; HU, W; et al. CD99 is a therapeutic target on disease stem cells in myeloid malignancies. *Sci. Transl. Med.* 2017;9(374), eaaj2025. doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj2025.

CORCES-ZIMMERMAN, MR; HONG, WJ; et al. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(7):2548–53.

CORNET-MASANA, JM; MORENO-MARTÍNEZ, D; et al. Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget.* 2016; 7(17):23239-23250. doi:10.18632/oncotarget.8096.

DEMCHENKO, YN; KUEHL, WM. A critical role for the NFκB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2010;1(1):59-68. doi:10.18632/oncotarget.109.

DING, Y; GAO, H; ZHANG, Q. The biomarkers of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Stem Cell Investig.* 2017;4:19. doi:10.21037/sci.2017.02.10.

DÖHNER, H; WEISDORF, DJ; BLOOMFIELD, CD. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(12):1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184.

GOWDA, C; SONG, C; DING, Y; et al. Cellular signaling and epigenetic regulation of gene expression in leukemia. *Adv Biol Regul.* 2020;75:100665. doi:10.1016/j.jbior.2019.100665.

GRANROTH G, KHERA N, ARANA YI C. Progress and Challenges in Survivorship After Acute Myeloid Leukemia in Adults. *Curr Hematol Malig Rep.* 2022;17(6):243-253. doi:10.1007/s11899-022-00680-6.

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

GURSKA, LM; AMES, K; GRITSMAN, K. Signaling Pathways in Leukemic Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1143: 1-39. doi: 10.1007 / 978-981-13-7342-8_1.

GUZMAN, ML; NEERING, SJ; et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood,* 2001;98, 2301-2307.

HAFEZI, S e RAHMANI, M. TARGETING. BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. *Cancers (Basel).* 2021;13(6):1292. doi:10.3390/cancers13061292.

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

HANAHAN; D; WEINBERG, RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011;v. 100, p. 57-70.

HAYKAL, T; YOUNES, M; et al. The pro-apoptotic properties of a phytonutrient rich infusion of *A. cherimola* leaf extract on AM. *Biomed Pharmacother*. 2021;111592. doi:10.1016/j.biopha.2021.111592.

HOESEL, B; SCHMID, JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 2013; 12, 86.

INDRAYANTO, G; PUTRA, G.S.; SUHUD, F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2021;46:273-307. doi: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer. Tipos de câncer. Leucemia. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>. Acesso em: 12 dezembro 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Atlas on-line de mortalidade. [Rio de Janeiro: INCA, 2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb>. Acesso em: 13 dezembro 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

IWASAKI, M; LIEDTKE, M; et al. CD93 marks a non-quiescent human leukemia stem cell population and is required for development of MLLRearranged acute myeloid leukemia. *Cell Stem Cell*, 2015;17 (4), 412–421. Doi:10.1016/j.stem.2015.08.008.

JORDAN, CT; GUZMAN, ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene*, 2004;23, 7178-7187.

JULIUSSON, G; HOUGH, R. Leukemia. *Progress in Tumor Research*, 2016;43, 87-100.

KHAN, MA; CHEN, HC; et al. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumor Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013;34(5):2497-2506. doi:10.1007/s13277-013-1002-x.

KHOSRAVI, A; ALIZADEH, S; et al. The impact of Mir-9 regulation in normal and malignant hematopoiesis. *Oncol Rev*. 2018;12(1):348. Doi:10.4081/oncol.2018.348.

KHOURY, JD, SOLARY, E., ABLA, O. et al. A 5ª edição da Classificação da Organização Mundial da Saúde de Tumores Hematolinfóides: Neoplasias Mielóides e Histiocíticas/Dendríticas. *Leucemia*, 2022, 36, 1703-1719.

LAMBLE AJ, EIDENSCHINK BRODERSEN L, ALONZO TA, ET AL. CD123 Expression Is Associated With High-Risk Disease Characteristics in Childhood Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2022;40(3):252-261. doi:10.1200/JCO.21.01595.

LANE, SW; GILLILAND, DG. Leukemia stem cells. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(2):71-76. doi:10.1016/j.semcancer.2009.12.001.

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

LARSSON, DE; HASSAN, SB; et al. The cytotoxic effect of emetine and CGP-74514A studied with the hollow fiber model and ArrayScan assay in neuroendocrine tumors in vitro. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(7):783-790. doi:10.2174/187152012802650147.

LIU, G; DAVID, BT; et al. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applicationwqas. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(1):3-32. doi:10.1007/s12015-019-09935-x.

LYENGAR, V; SHIMANOVSKY, A. Leukemia. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 10, 2020.

MARCHETTI, P; CASTEDO, M; SUSIN, SA; et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;v.184, p.1155 – 1160.

MARTELLI, AM; CHIARINI, F; et al. Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment. *Oncotarget*, 2012;3, 371–394.

MARTIN, G.H.; ROY, N.; CHAKRABORTY, S.; et al. CD97 is a critical regulator of acute myeloid leukemia stem cell function. *J Exp Med*. 2019;216(10):2362-2377. doi: 10.1084/jem.20190598.

MASTROGAMVRAKI, N; ZARAVINOS, A. Signatures of co-deregulated genes and their transcriptional regulators in colorectal cancer. *NPJ. Syst. Biol. Appl*. 2020;6(1):23. doi:10.1038/s41540-020-00144-8.

MATTES, K; VELLENGA, E; SCHEPERS, H. Differential redox-regulation and mitochondrial dynamics in normal and leukemic hematopoietic stem cells: A potential window for leukemia therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019; 144:102814. doi:10.1016/j.critrevonc.2019.102814.

MILLER, SC; HUANG, R; et al. Identification of Known Drugs that Act as Inhibitors of NF- κ B Signaling and their Mechanism of Action. *Biochemical Pharmacology*, 2010;79, 1272–1280.

MÖLLER, M; HERZER, K; WENGER, T; HERR, I; WINK, M. The alkaloid emetine as a promising agent for the induction and enhancement of drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Oncol Rep*. 2007;18(3):737-744.

MÖLLER, M; WEISS, J; WINK, M. Reduction of cytotoxicity of the alkaloid emetine through P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) in human Caco-2 cells and leukemia cell lines. *Planta Med*. 2006;72(12):1121-1126. doi:10.1055/s-2006-941546.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Stat Facts: Leukemia. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>. Acessado em 23 de janeiro de 2021.

O'BRIEN, JA; RIZZIERI, DA. Leukemic stem cells: a review. *Cancer Invest.* 2013;31(4):215-220. doi:10.3109/07357907.2012.700986.

OLIVEIRA, PFD.; ALVES, J.M.; et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2):183-188. 2015.

PAN, D; BOON-UNGE, K; et al. Emetine regulates the alternative splicing of caspase 9 in tumor cells. *Oncol Lett.* 2011;2(6):1309-1312. doi:10.3892/ol.2011.395.

PELOSI E, CASTELLI G, TESTA U. CD123 a Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia and Blastic Plasmocytoid Dendritic Neoplasm. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2718. Published 2023 Feb 1. doi:10.3390/ijms24032718.

PIRES, B; SILVA, R; FERREIRA, GM; ABDELHAY, E. NF-kappaB: two sides of the same coin. *Genes* 2018;9 (1), 24. doi.org/10.3390/genes9010024.

POLLYEA, DA; GUTMAN, JA; GORE, L; SMITH, CA; JORDAN CT. Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials. *Haematologica.* 2014;99(8):1277-1284. doi:10.3324/haematol.2013.085209.

POPHALI, PA; PATNAIK, MM. The Role of New Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer J.* 2016;22(1):40-50.

QUÍMICA NOVA INTERATIVA. Emetina. Disponível em: http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=ZwU-dxySC7-fUZZ5YhKDqyhVam2tdOzj1t5q5ltViJkaO4qYYr3xYYwiRU06he0HgVRQJDYietsxcTVKWKJhAA. Acessado em maio de 2021.

RADPOUR, R; RIETHER, C; SIMILLION, C; et al. CD8+ T cells expand stem and progenitor cells in favorable but not adverse risk acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2019;33 (10), 2379–2392. doi:10.1038/s41375-019-0441-9.

REIKVAM, H; NEPSTAD, I; et al. Pharmacologic targeting of the PI3K/mTOR pathway controls release of angioregulators from primary human acute myeloid leukemia cells and their neighboring stromal cells. *Oncotarget*, 2013;4, 830–843.

RODRIGUES, ACBDC; COSTA, RGA; SILVA, SLR; et al. Cell signaling pathways as molecular targets to eliminate LMA stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;160:103277. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103277.

ROSE-INMAN, H; KUEHL, D. Acute Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(6):1011-1028. doi:10.1016/j.hoc.2017.08.006.

SILVEIRA, N.A.; ARRAES, S.M.A.A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. *Arq Mudi*. 2008;12(1):5-14.

SIVEEN, KS; UDDIN, S; MOHAMMAD, RM. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Molecular Cancer*, 2017;16, 13.

SKELDING KA, BARRY DL, THERON DZ, LINCZ LF. Bone Marrow Microenvironment as a Source of New Drug Targets for the Treatment of Acute Myeloid Leukaemia. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):563. doi:10.3390/ijms24010563.

STELMACH P, TRUMPP A. Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2023;108(2):353-366. Published 2023 Feb 1. doi:10.3324/haematol.2022.280800.

STEWART, BW; et al. World cancer report 2014. Lyon: Inter. Ag. for Res. on Can., 2014.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, JM. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, editor. *Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity*. London: Academic Press; 1990,p. 71–133.

SUN, Q; FU, Q; LI, S; et al. Emetine exhibits anticancer activity in breast cancer cells as an antagonist of Wnt/ β -catenin signaling. *Oncol Rep*. 2019;42(5):1735-1744. doi:10.3892/or.2019.7290.

SUN, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v.17, p.545, 2017.

SUNG, H; FERLAY, J; SIEGEL, RL; et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.

TAN, Y; WU, Q; ZHOU, F. Targeting acute myeloid leukemia stem cells: Current therapies in development and potential strategies with new dimensions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;152:102993. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.102993.

TERGAONKAR, V; PANDO, M; et al. p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell*, 2002;1, 493–503.

TIAN C, CHEN Z. Immune therapy: a new therapy for acute myeloid leukemia. *Blood Sci*. 2022;5(1):15-24. Published 2022 Dec 15. doi:10.1097/BS9.0000000000000140.

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

VERBON, EH; POST, JA; BOONSTRA, J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2012;p.511, p. 1–6.

WAGNER VP, MARTINS MA, MARTINS MD, et al. Overcoming adaptive resistance in mucoepidermoid carcinoma through inhibition of the IKK- β /I κ B α /NF κ B axis. *Oncotarget*. 2016;7(45):73032-73044. doi:10.18632/oncotarget.12195.

WANG, X; HUANG, S; CHEN, JL. Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Mol Cancer*. 2017;16(1):2. doi:10.1186/s12943-016-0574-7.

WHO, monographs on selected medicinal plants. Vol. 3, 2007.

WINK, MST; LATZ-BRUNING, B. Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *Journal of Chemical Ecology*, 1998;24, 1881–937.

WU, T.H.; CHANG, S.Y; SHIH, Y.L.; et al. Emetine Synergizes with Cisplatin to Enhance Anti-Cancer Efficacy against Lung Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5914. Published 2019 Nov 25. doi:10.3390/ijms20235914.

WU, Z.; ZHANG, Z.; LEI, Z.; et al. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Aug; 48:24-31. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.06.003.

XU, Q; SIMPSON, SE; SCIALLA, TJ; BAGG, A; CARROLL, M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*, 2003;102, 972–980.

XU, S.; LI, X.; ZHANG, J.; CHEN, J. Prognostic Value of CD11b Expression Level for Acute Myeloid Leukemia Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015, 26;10(8):e0135981. doi: 10.1371/journal.pone.0135981.

YANG, L; SHI, P; ZHAO, G; et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther*, 2020;5, 8. doi:10.1038/s41392-020-0110-5.

YOSIFOV DY, IDLER I, BHATTACHARYA N, et al. Oxidative stress as candidate therapeutic target to overcome microenvironmental protection of CLL. *Leukemia*. 2020;34(1):115-127. doi:10.1038/s41375-019-0513-x.

YOUSEFI, H; MASHOURI, L; et al. Repurposing existing drugs for the treatment of COVID-19/SARS-CoV-2 infection: A review describing drug mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*. 2021; 183:114296. doi:10.1016/j.bcp.2020.114296.

YU, H. et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 5, p. 209, 2020.

YUSUF, R.Z. Acute Leukemia. *Hospital Medicine Clinics*, 2016;5, 347-355.

ZAKRZEWSKI, W; DOBRZYŃSKI, M; et al. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68. doi:10.1186/s13287-019-1165-5.

ZHAO, S; KONOPLEVA, M; et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia*, 2004; 18, 267–275.

ZHANG, Y. et al. Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. *Trends in cell biology*, 2018; v. 28, n. 12, p. 976-986.

ZHOU BBS; ELLEDGE, SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000; v. 408, p. 433–9.

ZHOU, J; CHING, YQ; CHNG, WJ. Aberrant nuclear factor-kappa B activity in acute myeloid leukemia: from molecular pathogenesis to therapeutic target. *Oncotarget*. 2015;6(8):5490-5500. doi:10.18632/oncotarget.3545.

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

APÊNDICE

Tabela 1S. Expressão gênica analisada por q PCR.

FUNÇÃO / SÍMBOLO	GENE	QR	
		CTL	EMETINA
NFκB pathway			
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	1,00	10,59
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	1,00	64,18
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	1,00	24,37
NFKBIB	NFKB inhibitor beta	1,00	4,05
RELA	RELA proto-oncogene, NF-κB subunit	1,00	4,36
RELB	RELB proto-oncogene, NF-κB subunit	1,00	64,73
WNT/β-catenin pathway			
APC	APC, WNT signaling pathway regulator	1,00	4,82
CSNK1A1	Casein kinase 1 alpha 1	1,00	4,30
CTNNB1	Catenin beta 1	1,00	4,38
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	1,00	3,51
WNT10A	Wnt family member 10A	n.d.	n.d.
WNT10B	Wnt family member 10B	1,00	0,05
WNT2B	Wnt family member 2B	n.d.	n.d.
WNT6	Wnt family member 6	n.d.	n.d.
Hedgehog pathway			
DHH	Desert hedgehog	n.d.	n.d.
GLI1	GLI family zinc finger 1	1,00	1,14
GLI2	GLI family zinc finger 2	n.d.	n.d.
PTCH1	Patched 1	1,00	4,27
SHH	Sonic hedgehog	n.d.	n.d.
SMO	Smoothed, frizzled class receptor	n.d.	n.d.
SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling	1,00	2,33
NOTCH pathway			
DLL1	Delta like canonical Notch ligand 1	1,00	13,19
DLL3	Delta like canonical Notch ligand 3	1,00	6,21
JAG1	Jagged 1	1,00	1,26
JAG2	Jagged 2	1,00	5,12

NOTCH1	Notch 1	1,00	2,09
NOTCH2	Notch 2	1,00	1,65
EGFR pathway			
EGF	Epidermal growth factor	1,00	n.d.
EGFR	Epidermal growth factor receptor	n.d.	n.d.
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase	1,00	4,13
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	1,00	2,57
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	1,00	3,26
RHOB	Ras homolog family member B	n.d.	n.d.
JAK/STAT pathway			
JAK1	Janus kinase 1	1,00	3,05
JAK2	Janus kinase 2	1,00	4,63
JAK3	Janus kinase 3	n.d.	n.d.
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	1,00	20,56
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	1,00	9,20
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	1,00	2,25
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6	1,00	3,35
PI3K/AKT/MTOR pathway			
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	1,00	0,93
AKT2	AKT serine/threonine kinase 2	1,00	1,21
MTOR	Mechanistic target of rapamycin	1,00	2,06
PIK3C2A	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha	1,00	3,63
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	1,00	5,10
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	1,00	4,91
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	1,00	3,62
TGF-beta/SMAD pathway			
FOXO1	Forkhead box O1	1,00	27,41
SMAD2	SMAD family member 2	1,00	8,50
SMAD4	SMAD family member 4	1,00	2,01
SMAD7	SMAD family member 7	1,00	6,95
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	1,00	2,62

TGFB2	Transforming growth factor beta 2	1,00	3,41
TGFB3	Transforming growth factor beta 3	1,00	24,25
PPAR pathway			
PPARA	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	1,00	1,53
PPARD	Peroxisome proliferator activated receptor delta	1,00	7,78
PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	1,00	n.d.
PPARGC1A	PPARG coactivator 1 alpha	n.d.	n.d.
PPARGC1B	PPARG coactivator 1 beta	1,00	0,38
Oxidative stress			
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	1,00	0,64
OXSRI	Oxidative stress responsive 1	1,00	1,87
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	1,00	1,93
TXN	Thioredoxin	1,00	0,83
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	1,00	1,98
Apoptosis			
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	1,00	6,18
BAD	BCL2 associated agonist of cell death	1,00	1,57
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	1,00	1,77
BCL2	BCL2, apoptosis regulator	1,00	0,12
BID	BH3 interacting domain death agonist	1,00	4,46
CASP3	Caspase 3	1,00	4,00
CASP7	Caspase 7	1,00	3,09
DIABLO	Diablo IAP-binding mitochondrial protein	1,00	3,22
FADD	Fas associated via death domain	1,00	7,15
FAS	Fas cell surface death receptor	1,00	1,65
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1	1,00	0,32
Autophagy			
ATG12	Autophagy related 12	1,00	2,55
ATG3	Autophagy related 3	1,00	2,53
ATG5	Autophagy related 5	1,00	1,52
BECN1	Beclin 1	1,00	1,60
MAP1LC3A	Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha	1,00	n.d.

MAP1LC3B	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	1,00	18,09
Necroptosis			
RIPK1	Receptor interacting serine/threonine kinase 1	1,00	3,18
RIPK2	Receptor interacting serine/threonine kinase 2	1,00	2,46
RIPK3	Receptor interacting serine/threonine kinase 3	1,00	3,15
Epithelial-mesenchymal transition			
CDH1	Cadherin 1	n.d.	n.d.
SNAI1	Snail family transcriptional repressor 1	1,00	1,18
SNAI2	Snail family transcriptional repressor 2	n.d.	n.d.
SNAI3	Snail family transcriptional repressor 3	1,00	2,13
TWIST1	Twist family bhlh transcription factor 1	1,00	0,44
VIM	Vimentin	1,00	8,81
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1	1,00	6,92
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2	1,00	19,82

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).



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, Brazil

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/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, adenomatosis 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; CEBP α , 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-IC, 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 transducin; 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@fiocruz.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.



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@fioacruz.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/>).