



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



RAFAELA GOMES ALVES COSTA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DO BORTEZOMIBE NO TRATAMENTO DE
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM AÇÃO EM CÉLULAS-TRONCO
LEUCÊMICAS**

Salvador, BA
2023

RAFAELA GOMES ALVES COSTA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DO BORTEZOMIBE NO TRATAMENTO DE
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM AÇÃO EM CÉLULAS-TRONCO
LEUCÊMICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra
Coorientadora: Dra. Rosane Borges Dias

Salvador, BA
2023

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

Costa, Rafaela Gomes Alves.

Estudo farmacológico do bortezomibe no tratamento de leucemia mieloide aguda com ação em células-tronco leucêmicas / Rafaela Gomes Alves Costa. - 2023.
93 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra.

Coorientadora: Profa. Dra. Rosane Borges Dias.

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

1. Farmacologia. 2. Leucemia mieloide aguda. 3. Leucemia mieloide aguda - Tratamento. 5. Leucemia mieloide aguda - Terapêutica química. 6. Células-tronco. I. Bezerra, Daniel Pereira. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 615.5
CDU - 615.015



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



TERMO DE APROVAÇÃO

Rafaela Gomes Alves Costa

**“ESTUDO FARMACOLÓGICO DO BORTEZOMIBE NO
TRATAMENTO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM
AÇÃO EM CÉLULAS-TRONCO LEUCÊMICAS”**

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 31 julho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Daniel Pereira Bezerra

Dr. Daniel Pereira Bezerra
Fundação Oswaldo Cruz
PPGFAR
Orientador

Documento assinado digitalmente



ANA JERSIA ARAUJO

Data: 01/08/2023 08:09:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Ana Jérsia Araújo
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Documento assinado digitalmente



DALILA LUCIOLA ZANETTE

Data: 01/08/2023 11:05:22-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Dalila Lucíola Zanette
FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente



ELISANGELA VITORIA ADORNO

Data: 03/08/2023 21:40:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Elisângela Vitória Adorno
Universidade Federal da Bahia

J.N.

Dr. Jean Nunes dos Santos
Universidade Federal da Bahia

FONTE DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

*Dedico esse trabalho a todos
aqueles que enfrentaram ou
ainda enfrentam a extensa
batalha contra o câncer.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, Senhor e Criador de todas as coisas, sem ele eu não estaria aqui presente e tantas coisas boas não teriam acontecido em minha vida.

Ao Mestre Meishu - Sama por toda proteção e alimento espiritual, que me ergue em cada batalha da vida.

À minha mãe por todo apoio e incentivo desde sempre, pelo seu amor incondicional, carinho e conforto.

Ao meu pai (*in memoriam*) por estar sempre ao meu lado, nos melhores e piores momentos de minha vida.

Ao meu esposo Paulo Davi por sempre me apoiar nas diferentes fases de minha vida, pelo seu companheirismo, amizade, dedicação e compreensão. Por sempre me incentivar em meus estudos, principalmente nos momentos em que me estresso e penso em desistir.

À minha filha amada Maria Giulia por ser a minha maior inspiração no momento e me dá forças para crescer e buscar sempre o melhor para nós.

As minhas avós pelo imensurável amor e carinho que me fortalecem.

À minha sogra (*in memoriam*) por sempre me apoiar, acreditar e se orgulhar de mim. Essa conquista é nossa!

A todos os meus familiares que de uma certa forma contribuem para a minha formação e aperfeiçoamento pessoal, principalmente por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pereira Bezerra, pela oportunidade, apoio, incentivo e compreensão. Por ser generoso e paciente comigo. Obrigada por todos os conhecimentos passados. É muito gratificante ser sua aluna!

À minha coorientadora e amiga Dra. Rosane Borges Dias por seu apoio, orientação, incentivo e amizade desde o primeiro momento em que entrei na Fiocruz e pensei em fazer pesquisa. Sua presença em minha vida foi fundamental nessa etapa.

Ao grupo de pesquisa do Câncer (Carol, Suellen Ingrid, Maiara, Valdenízia, Luciano, Gabriela, Sara, Larissa, Sheila, Mateus, Felipe, Alexandre, Maria, Amanda e Sabrine), e a todos os colegas do LETI pelo companheirismo e por tornarem o trabalho mais tranquilo e agradável.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESB, por financiar este projeto.

Ao curso de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal da Bahia e toda a equipe.

As plataformas tecnológicas do IGM, em especial a de citometria, microscopia e histologia.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para contribuição deste trabalho.

Por fim à todas as pessoas que fazem parte de minha vida que involuntariamente contribuíram e contribuem para a minha jornada, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leucemia mieloide aguda (LMA) se caracteriza pelo crescimento descontrolado de blastos imaturos na medula óssea e corresponde a um dos tipos de cânceres mais frequentes no mundo. A taxa de sobrevivência relativa de 5 anos é relativamente baixa e a maioria dos pacientes acabam apresentando recidiva. Acredita-se que um dos principais fatores responsáveis pela baixa taxa de remissão completa da doença esteja associado às células-tronco leucêmicas (CTL). Estudos sugerem que a LMA é originada e mantida por essa população de CTLs. A via de sinalização NF- κ B, atua na progressão do câncer após a formação tumoral sendo constitutivamente ativa nas CTLs e por essa razão se torna um importante alvo terapêutico. Nesse contexto, o bortezomibe (BTZ) já é descrito como um potente inibidor da via NF- κ B e vem sendo estudado para o tratamento de algumas doenças hematológicas.

OBJETIVO: Avaliar o potencial antileucêmico do BTZ como estratégia terapêutica para eliminar CTLs de LMA humana em modelo *in vitro* e *in vivo*.

METODOLOGIA: A citotoxicidade do BTZ foi testada em um painel de linhagens cancerosas e não cancerosas. As CTLs foram identificadas utilizando os anticorpos CD34, CD38, CD133, CD13 e CD123. A linhagem KG-1a foi utilizada para realização dos ensaios de mecanismo de ação do BTZ a fim de avaliar a viabilidade através da análise do ciclo celular, detecção de morte celular por apoptose, avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela técnica de citometria de fluxo. Análises da expressão gênica e de vias de sinalização associadas ao câncer através de qPCR em células tratadas com o BTZ também foram realizadas, além de ensaios para avaliação antitumoral em modelo *in vivo*. **RESULTADOS:** O BTZ foi citotóxico para diferentes linhagens testadas com valores de CI_{50} que variaram de 0,01 e 1,83 μ M para células de melanoma A375 e linhas celulares SCC-9 de carcinoma espinocelular oral, respectivamente. Em células de malignidades hematológicas, BTZ apresentou valores de IC_{50} variando de 0,05 a 0,33 μ M para linhagens celulares de leucemia linfóide de células T Jurkat e leucemia monocítica THP-1, respectivamente. Além disso, o BTZ reduziu a população de CTLs viáveis, induziu morte celular apoptótica, aumentou a expressão de caspase-3 ativa e PARP-1 clivada, induziu alterações no potencial transmembrânico mitocondrial, aumentou os níveis de ERO, induziu fragmentação do DNA em células KG-1a e alterou a expressão gênica de células KG-1a, além de inibir o crescimento de células KG-1a em modelo *in vivo*.

CONCLUSÃO: A atividade antileucêmica desempenhada pelo BTZ surge como um novo caminho promissor para o tratamento de LMA, tendo como alvo principal as CTLs.

Palavras-chave: Bortezomibe; Células-tronco leucêmicas; Leucemia mieloide aguda; NF- κ B.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by the uncontrolled growth of immature blasts in the bone marrow and corresponds to one of the most common types of cancer in the world. The 5-year relative survival rate is relatively low, and most patients eventually relapse. It is believed that one of the main factors responsible for the low rate of complete remission of the disease is associated with leukemic stem cells (CTL). Studies suggest that AML is originated and maintained by this population of CTLs. The NF- κ B signaling pathway acts in the progression of cancer after tumor formation, being constitutively active in CTLs and, for this reason, it becomes an important therapeutic target. In this context, bortezomib (BTZ) is already described as a potent inhibitor of the NF- κ B pathway and has been studied for the treatment of some hematological diseases. **OBJECTIVE:** Evaluate the antileukemic potential of BTZ as a therapeutic strategy to eliminate human AML CTLs in an in vitro and in vivo model. **METHODOLOGY:** BTZ cytotoxicity was tested on a panel of cancerous and non-cancerous cell lines. CTLs were identified using antibodies CD34, CD38, CD133, CD13 and CD123. The KG-1a strain was used to carry out BTZ mechanism of action assays in order to assess viability through cell cycle analysis, detection of cell death by apoptosis, evaluation of mitochondrial transmembrane potential and production of reactive oxygen species (ROS) by the flow cytometry technique. Analyzes of gene expression and signaling pathways associated with cancer through qPCR in cells treated with BTZ were also performed, in addition to assays for antitumor evaluation in an in vivo model. **RESULTS:** BTZ was cytotoxic to different strains tested with IC50 values ranging from 0.01 and 1.83 μ M for A375 melanoma cells and SCC-9 oral squamous cell carcinoma cell lines, respectively. In hematological malignancy cells, BTZ showed IC50 values ranging from 0.05 to 0.33 μ M for Jurkat T-cell lymphocytic leukemia and THP-1 monocytic leukemia cell lines, respectively. Furthermore, BTZ reduced the population of viable CTLs, induced apoptotic cell death, increased expression of Caspase-3 activity and cleaved PARP-1, induced changes in mitochondrial transmembrane potential, increased ROS levels, induced DNA fragmentation in KG-1a cells and caused effects on the gene expression of KG-1a cells, in addition to inhibiting the growth of KG-1a cells in an in vivo model. **CONCLUSION:** The antileukemic activity performed by BITZ emerges as a promising new path for the treatment of AML, with CTLs as the main target.

Keywords: Bortezomib; Leukemic stem cells; Acute myeloid leukemia; NF- κ B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado dos tipos de leucemias.....	19
Figura 2. Via de sinalização de NF- κ B	31
Figura 3. Efeito do BTZ sobre a viabilidade de KG-1a.....	51
Figura 4. Efeito do BTZ sobre a viabilidade de células KG-1a.....	52
Figura 5. Efeito do BTZ sobre a morte de células KG-1a.....	53
Figura 6. Efeito do BTZ sobre a morte de células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40MEF	54
Figura 7. Efeito do BTZ sobre a atividade de caspase-3	55
Figura 8. Efeito do BTZ no ensaio de reversão com inibidor de apoptose ZVAD.....	56
Figura 9. Efeito do BTZ da despolarização da membrana mitocondrial.....	57
Figura 10. Efeito do BTZ sobre os níveis de ERO	58
Figura 11. Efeito do BTZ no ensaio de reversão com inibidor de ERO (NAC)	59
Figura 12. Efeito do BTZ na expressão gênica de célula KG1a.....	62
Figura 13. Efeito do BTZ sobre a expressão de NF- κ B	63
Figura 14. Microscopia Confocal de células KG-1a	64
Figura 15. Efeito da atividade do BTZ em modelo in vivo	65
Figura 16. Fotomicrografias representativas dos órgãos de camundongos.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel de linhagem de células cancerosas e não cancerosas.....	37
Tabela 2. Citotoxicidade do BTZ em diferentes tipos histológicos	48
Tabela 3. Efeito do BTZ sobre o ciclo celular de KG-1a.....	60
Tabela 4. Efeito do BTZ no peso dos camundongos NSG	66
Tabela 5. Efeito do BTZ no peso dos órgãos dos camundongos NSG.....	66

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de variância)
ATCC	American Type Culture Collection
BCLX	Proteína anti-apoptótica
BTZ	Bortezomibe
CI ₅₀	Concentração inibitória média
Citocromo C	Proteína heme associada à membrana externa da mitocôndria
CTH	Células Tronco Hematopoiéticas
CTL	Células Tronco leucêmicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro padrão da média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H2-DCF-DA	Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfoblástica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
mg	Miligrama
MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula Óssea
NAC	N-acetil-L-cisteína
NF-κB	Fator nuclear kappa B
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de Propídio
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares do

sangue periférico)

SMD

Síndrome Mielodisplásica

UPS

Sistema Ubiquitina-Proteassoma

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
1.1. Leucemias	17
1.2. Leucemia Mieloide Aguda	20
1.3. Células-tronco-leucêmicas	23
1.4. Terapias convencionais para o tratamento das LMA	27
1.5. Via de sinalização NF- κ B	30
1.6. BTZ	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Obtenção do composto	39
4.2. Obtenção e manutenção das células em cultura	39
4.3. Ensaio do Alamar Blue	42
4.4. Ensaio Azul de tripam	43
4.5. Ensaio de identificação de células-tronco leucêmicas	43
4.6. Avaliação <i>in vitro</i> do padrão de morte celular e mecanismo de ação do BTZ	43
4.6.1. Avaliação de morte celular apoptótica	44
4.6.2. Marcação para Caspase 3 e PARP-1	44
4.6.3. Ensaio de reversão com inibidores farmacológicos	45
4.6.4. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial	45
4.6.5. Quantificação das ERO intracelular	46
4.6.6. Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA	46
4.6.7. Análise da expressão gênica por qPCR	47
4.6.8. Marcação NF- κ B	48
4.7. Ensaios <i>in vivo</i>	48
4.8. Análises estatísticas	49
5. Resultados	51
5.1. Efeito do BTZ sobre a viabilidade de células cancerosas e não cancerosas	

	51
5.3. BTZ induz morte celular apoptótica em células KG-1a	56
5.4. BTZ aumenta a expressão da atividade de Caspase-3 e PARP-1 clivada em células KG1a	57
5.5. BTZ causa alterações no potencial transmembrânico mitocondrial	59
5.6. BTZ aumenta os níveis de ERO	60
5.7. BTZ induz a fragmentação do DNA em células KG-1a.	62
5.8. BTZ causa efeitos na expressão gênica de células KG-1a	64
5.9. BTZ reduziu a expressão de NF-κB p65 (pS536) em células KG1a	65
5.10. BTZ inibe o crescimento de células KG-1a em modelo <i>in vivo</i>	67
6. DISCUSSÃO	72

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Leucemias

A leucemia é uma doença maligna, normalmente de origem desconhecida, caracterizada pelo acúmulo de células jovens anormais na medula óssea. Essas células imaturas são capazes de se dividir rapidamente, aumentando sua taxa de proliferação e substituindo as células normais (INCA, 2022).

A etiologia específica das leucemias ainda permanece indefinida embora saiba que seu desenvolvimento está associado a possíveis anormalidades genéticas e epigenéticas. Alterações como translocações cromossômicas ou algumas deleções podem interferir na maturação das células-tronco em diferentes estágios da hematopoese e, por sua vez, acarretar uma grande quantidade de células imaturas (BISPO et al., 2020). Além dos fatores genéticos, os fatores de risco ambientais também são responsáveis em uma pequena proporção pelo desenvolvimento da leucemia (INCA, 2023).

A maioria das células sanguíneas se desenvolvem na hematopoese a partir de células da medula óssea chamadas células-tronco. O sistema hematopoiético é muito eficiente na produção de células maduras sendo regulado pelas células-tronco hematopoiéticas (CTHs), por microambientes específicos chamados nichos na medula óssea (MO), onde essas células residem. Essas células são extremamente quiescentes e muito raramente entram no ciclo celular. Devido ao fato dessas células estarem em quiescência, a hematopoese homeostática é realizada, na maioria das vezes, por meio da expansão de células progênes mais diferenciadas, tendenciosas ou comprometidas com determinadas linhagens hematopoiéticas. Tais células possuem uma capacidade de renovação limitada (KANDARAKOV et al., 2022).

Na hematopoese normal, as CTHs encontram-se em estado de quiescência do ciclo celular com o intuito de preservar a sua capacidade de auto-renovação e manutenção a longo prazo, garantindo assim a homeostase do sistema hematopoiético. Uma vez desregulada a quiescência das células acarretará a disfunção das CTHs podendo resultar em uma hematopoiese aberrante o que conseqüentemente favorece o surgimento das leucemias

(CHEN et al.,2022).

Nas leucemias, os blastos imaturos que se acumulam na medula possuem uma capacidade de proliferação elevada, podendo se diferenciar rapidamente e levar ao acúmulo de uma população clonal de células leucêmicas. Assim, a leucemia refere-se a uma doença de expansão clonal de células leucêmicas na medula óssea (BISPO et al., 2020). Ao contrário das células sanguíneas normais, as células leucêmicas não morrem quando deveriam e podem substituir os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos, e as plaquetas, dificultando o trabalho das células normais (NCI, 2023).

As células leucêmicas possuem características bastante heterogêneas, por esta razão, as leucemias são consideradas como uma doença de caráter multifatorial, visto que, algumas infecções podem estar associadas com a causa da doença, além das possíveis alterações genéticas. Essas células apresentam genes que quando alterados podem atuar como fatores de iniciação e progressão da doença. Levando em consideração que a presença de assinaturas genéticas ditas como “pré-leucêmicas” podem indicar um possível desenvolvimento da leucemia, pressupõe-se que tais alterações podem surgir até mesmo antes do nascimento do indivíduo (WHITEHEAD et al., 2016).

Trata-se do tipo de câncer mais comum em crianças e adultos com menos de 35 anos de idade, e é uma das principais doenças que levam à morte de adolescentes (SHI et al., 2018). Normalmente a incidência aumenta com a idade, no entanto, acredita-se que, a doença pode acometer o paciente em qualquer época da vida com subtipos dominantes dependendo da idade (WILD et al., 2020).

Considerada o quarto tipo de câncer mais incidente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), a Sociedade Americana de Câncer estima a ocorrência de aproximadamente 59.610 novos casos de leucemias e 23.710 mortes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). Para o Brasil, o número estimado de novos casos de leucemia para cada ano do triênio 2023 -2025, é de 11.540 novos casos correspondendo a um risco estimado de 5,33 por 100 mil habitantes, sendo dentre estes 6.250 em homens e 5.290 em mulheres. Tais valores equivalem a um risco estimado de 5,90 casos novos a cada 100 mil homens e 4,78 a cada 100 mil mulheres. Em relação à mortalidade, no Brasil, foram registrados cerca de 6.738 óbitos por leucemia no ano de 2020

(INCA,2023).

Atualmente são conhecidos e descritos mais de 12 tipos de leucemias sendo classificadas em linfóides ou mielóides de acordo com a linhagem hematopoiética predominantemente envolvida no processo, e em agudas ou crônicas levando em consideração o grau de maturidade das células leucêmicas. Desse modo, as leucemias compreendem subgrupos distintos que são classificados baseando-se nas características morfológicas e bioquímicas da célula leucêmica e na evolução da doença e origem ou tipos de glóbulos brancos que são afetados (CLOOS et al., 2017; INCA, 2022). Assim, as leucemias são classificadas em leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfóide crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC). As LLA são mais comuns em crianças menores de 15 anos, enquanto as LLC e LMA são mais incidentes em pessoas com idades mais avançadas (WILD et al., 2020). A **figura 1** demonstra um esquema simplificado da classificação das leucemias de acordo com sua linhagem.

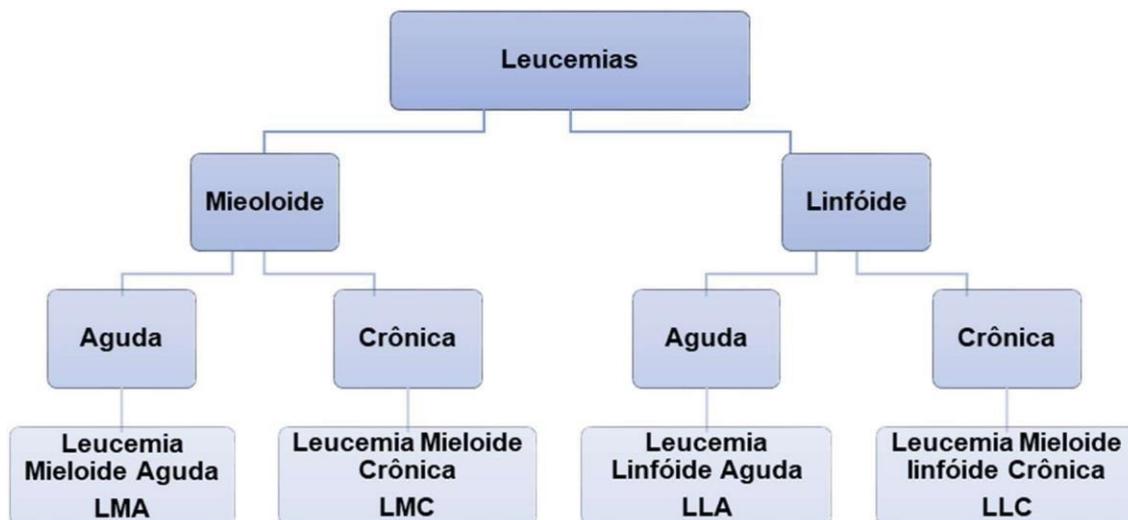


Figura 1. Esquema simplificado dos tipos de leucemias

1.2. Leucemia Mieloide Aguda

A LMA é uma neoplasia maligna de origem hematopoiética, complexa, de prognóstico ruim e associada a uma série de possíveis aberrações cromossômicas ou citogenéticas (ZHAO et al., 2022). Nesse tipo de leucemia, os blastos imaturos que se acumulam na medula óssea expandem-se

rapidamente, ocorrendo assim a proliferação e diferenciação anormal de uma população clonal de células-tronco mieloide (LEE et al., 2019).

Essas células são capazes de alterar a produção dos glóbulos vermelhos, das plaquetas e dos glóbulos brancos normais. A LMA é uma doença de grande complexidade e bastante heterogênea geneticamente, com anormalidades genéticas recorrentes, o que resulta na perda de função de fatores de transcrição específicos de linhagem, ativação de vias de transdução de sinal, além da desregulação de modificadores epigenéticos. Essa heterogeneidade da LMA representa um grande desafio clínico, pois dificulta que o tratamento seja efetivamente bem-sucedido. Além disso, uma outra característica muito comum da doença é a sua rápida progressão para um estágio avançado, o que em um curto espaço de tempo pode ser fatal (BOSSHARD et al., 2018; AUSTIN et al., 2023).

Estima-se cerca de 20.380 novos casos de LMA sendo a maioria em adultos com cerca de 11.310 mortes em relação às taxas de sobrevida relativa geral de cinco anos para LMA foi estimado apenas 31,7% (NCI, 2023). Dentre os fatores de risco da LMA, o hábito de fumar, a exposição a produtos químicos como o benzeno, formaldeído e agentes alquilantes, a exposição à radiação, alguns distúrbios sanguíneos, o tratamento prévio com radioterapia ou alguns quimioterápicos e algumas doenças hereditárias são os que mais se destacam. Além destes, algumas pessoas com síndrome mielodisplásica (SMD) podem desenvolver LMA, isto porque, esses pacientes possuem contagens baixas de células sanguíneas e células anormais no sangue e na medula óssea, por esse motivo, podem evoluir ao longo do tempo para LMA. Infelizmente a LMA que se desenvolve após a SMD é mais difícil de tratar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023).

Os pacientes com LMA por terem a produção de glóbulos vermelhos, plaquetas e glóbulos brancos drasticamente afetada, podem apresentar anemia e trombocitopenia, com isso, alguns sinais e sintomas podem ser observados nesses pacientes como febre, sangramentos ou hematomas, fadiga, anorexia, perda de peso e infecções bacterianas (BOSSHARD et al., 2018; DE KOUCHKOVSKY, & ABDUL-HAY, 2016).

Um dos fatores prognósticos mais importantes para as LMAs é a idade. Normalmente os adultos mais velhos correspondem ao grupo de indivíduos que

são mais afetados por esse tipo de neoplasia, o que reduz o sucesso nas alternativas terapêuticas devido à idade. Neste caso, a doença apresenta um prognóstico ruim, quando se comparado aos indivíduos mais jovens acometidos pela LMA (BOSSHARD et al., 2018). Além da idade e das comorbidades, o prognóstico dos pacientes com LMA também se associa com a característica biológica da doença. Mutações nos genes *FLT3*, *NPM1*, *KIT*, *CEBPA* e *TP53* carregam informações que definem os subtipos de LMA e associam-se a características clínico-patológicas distintas, o que consequentemente podem definir o prognóstico da doença (KAYSER & LEVIS 2023).

Pacientes com anormalidades cromossômicas, como por exemplo, as translocações t (8; 21) e t (15; 17) e inversão 16 e translocação t (16;16) em blastos mieloides podem desenvolver LMA. Tais anormalidades estão relacionadas a genes de fusão que tem como principais alvos os genes que são responsáveis por codificar reguladores epigenéticos (tais como MLL, NSD1, nCREBBP), componentes do complexo de poro nuclear (incluindo, NUP98, NUP214) e principalmente fatores de transcrição hematopoiéticos (RARA, RUNX1 ou CFBF) (KUYKENDALL et al., 2018; YUSUF, 2016; INFANTE & HERNÁNDEZ-RIVAS, 2018).

Conforme citado anteriormente, anormalidades genéticas e mutações específicas estão associadas à predisposição de o indivíduo desenvolver LMA. Estudos recentes vêm demonstrando que uma característica comum dessa doença são as mutações que ativam a sinalização de quinase, principalmente nos genes que são responsáveis por codificar os receptores transmembranares de tirosina quinase KIT (tyrosine-protein kinase) e FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3), além dos genes que fazem parte da família RAS (KUYKENDALL et al, 2018).

Atualmente sabe-se que translocações cromossômicas e alterações moleculares que induzem mutações em genes envolvidos na proliferação e diferenciação hematopoiética, estão associadas com o acúmulo de células mieloides pouco diferenciadas (DE KOUCHKOVSKY & ABDUL-HA 2016).

Dentre as mutações mais frequentemente identificadas na LMA é a mutação de FLT3 (ZHAO et al., 2022). Alterações genéticas em FLT3 acontecem aproximadamente em 30% de todos os casos de LMA. Essas mutações de FLT3 podem ser rearranjadas com TKD ou com ITD e ambas induzem à ativação do

receptor, porém, as implicações prognósticas são diferentes, pois enquanto FLT3-TKD, mutação menos comum, está associada a uma melhor sobrevida, FLT3-ITD que é a mutação mais comum, corresponde a aproximadamente 25% de todos os casos de LMA e se relaciona a uma maior taxa de recidiva e pior sobrevida. Alguns estudos consideram que o valor prognóstico de uma mutação FLT3-TKD ainda permanece incerto. No entanto, já é bem elucidado que o status mutacional do FLT3 evolui ao longo do tempo e permanecem com a doença (INFANTE & HERNÁNDEZ-RIVAS, 2018; DAVER et al., 2019).

Estudos demonstram que cerca de 25% dos pacientes adultos com LMA terão duplicação interna em FLT3 (FLT3-ITD) e 10% terão mutações ou deleções pontuais no domínio tirosina quinase FLT3 (FLT3-TKD) (KELLY et al., 2002). As mutações de FLT3 são consideradas uma das lesões genéticas mais complicadas para um tratamento de sucesso, isso porque esse tipo de mutação está associado à leucocitose e a uma taxa de recaída muito elevada o que pode acarretar a redução da sobrevivência global (REFE, 2017). Além disso, já é compreendido que as alterações em FLT3-ITD conduzem a uma elevada carga leucêmica o que conseqüentemente acarreta um prognóstico ruim nos pacientes com LMA (DAVER et al., 2019).

Levando em consideração que genes mutados na LMA podem servir como importantes marcadores prognósticos, atualmente triagens para mutações genéticas têm sido amplamente realizadas na prática clínica com o intuito de nortear possíveis intervenções terapêuticas a serem utilizadas (WAKITA et al., 2022). Diante disso, detectar possíveis mutações genéticas que induziram ao desenvolvimento de LMA é de grande importância para a previsão do prognóstico e a identificação de potenciais alvos terapêuticos a fim de alcançar uma resposta eficaz ao tratamento. Ressalta-se que a identificação de tais mutações genéticas pode contribuir para o tratamento da LMA principalmente no sentido de fazer com os pacientes possam atingir remissão completa.

1.3. Células-tronco-leucêmicas

As células-tronco-hematopoéticas (CTHs) são células responsáveis pela produção das linhagens de células sanguíneas. Devido a sua capacidade de auto-renovação essas células podem diferenciar-se em células especializadas

do tecido sanguíneo e do sistema imune. Além disso, essas células podem exercer atividade regenerativa acarretando a sua passagem de estado quiescente para um estado ativo (LEE et al., 2019).

A hematopoiese clonal é uma condição pré-maligna comum caracterizada pela rápida expansão anormal de CTHs que transportam mutações somáticas em genes relacionados à leucemia (RELATION, et al. 2017; PARK & BEJAR, 2020).

Um dos grandes desafios enfrentados na terapia da LMA é a doença refratária ou a recidiva após o paciente atingir a remissão. Isso decorre de algumas células resistentes ao tratamento. Essas células possuem uma elevada capacidade de auto-renovação e impulsionam o crescimento clonal a longo prazo (STELMACH & TRUMPP 2023). Assim, as LMA têm origem nas células iniciadoras de leucemia que apresentam propriedades de células-tronco e por esta razão são denominadas de células-tronco leucêmicas (CTLs) (MOSHAVER et al., 2019). A presença de células-tronco nas LMA foi evidenciada pela primeira vez há vinte anos através da identificação de subpopulações de células raras em ensaio de xenotransplantes (THOMAS, & MAJETI, 2017).

O microambiente da medula óssea funciona como um nicho de células-tronco que regula o destino celular tanto das CTH quanto das CTLs, servindo como um ambiente de enxerto primário para CTLs que podem assim iniciar o processo da leucemogênese. Em outras palavras, pode-se dizer que, biologicamente as CTLs apresentam características bem semelhantes com as CTHs, o que permite com que elas acabem utilizando os mecanismos moleculares semelhantes para sua auto-renovação e manutenção de um estado indiferenciado que possibilite a sua diferenciação em células progenitoras mais desenvolvidas (LEE et al., 2019).

Além da sua capacidade de auto-renovação ilimitada, as CTLs são caracterizadas pelo seu elevado potencial de repovoamento e longa residência em um estado quiescente da fase G_0 / G_1 (SIVEEN et al., 2017).

Um dos principais desafios no tratamento dos pacientes com LMA é a falha terapêutica que pode acontecer precocemente ou alguns anos após o término do tratamento. As taxas de sobrevida em 5 anos chegam em torno de 30%, o que é relativamente baixa, e supõe que o principal motivo está associado à resistência em subclones da doença com alta capacidade de regeneração da

leucemia, o que supera a reconstituição da hematopoese normal. Em um estudo *in vivo*, Naldini e colaboradores demonstraram que a senescência celular contribuiu ativamente para a resistência da doença, visto que, células tumorais residuais diferenciadas foram reprogramadas em direção a um estado de células-tronco elevando a capacidade de propagação após o escape do bloqueio proliferativo induzido pela senescência. Assim, as CTLs exibem um papel fundamental na recidiva e na refratariedade da LMA (NALDINI et al., 2023).

As CTLs correspondem a uma pequena população de células residuais raras que permanecem em um estado de dormência e podem ser reativadas precocemente espalhando-se e induzindo a recidiva da doença após o tratamento do tumor primário. Essas células são quimiorresistentes e quiescentes e, por isso, elas são capazes de dar origem a um novo clone leucêmico. Deste modo, essas células já são descritas por sustentar a propagação da doença, e possivelmente são responsáveis por conduzir o paciente à recidiva (NALDINI et al., 2023).

Nesse sentido, muitos trabalhos já vêm destacando as CTLs como as principais responsáveis pela recidiva e resistência quimioterápica dos pacientes com LMA, devido às suas propriedades de dormência e auto-renovação, o que pode ser o principal motivo pelo qual muitos pacientes não atingem a remissão completa da doença e acabam tendo recaídas (SÁNCHEZ-AGUILERA & MÉNDEZ-FERRER, 2017; PHAN, & CROUCHER, 2020).

Alguns ensaios clínicos também já relatam CTLs como células resistentes à quimioterapia e como principais responsáveis pela recidiva da LMA (PARK et al., 2019). Acredita-se que o estado de quiescência pode ser um fator importante para a resistência a medicamentos que caracteriza as células leucêmicas primitivas (POLLYEA & JORDAN 2017). Embora a terapia comumente empregada nos casos de LMA baseie-se em um tratamento citotóxico intenso, presume-se que a quimiorresistência das CTLs sustenta a doença e por essa razão cerca de 70% das LMA são refratárias à terapia inicial ou eventual recidiva (LAVERDIÈRE et al., 2018). Nesse aspecto, as CTL são vistas como principais responsáveis pela falha do tratamento devido às propriedades quimiorresistentes e subsequente recidiva apresentada pela maioria dos pacientes com LMA (DUPLOYEZ et al., 2018).

Como citado anteriormente, a similaridade entre essas células-tronco

normais e as CTLs conseqüentemente acaba dificultando o desenvolvimento de fármacos que sejam seletivos para CTLs e não prejudique as CTLs normais. Por isso, torna-se necessário o estudo e desenvolvimento de novas terapias anti-CTL altamente seletivas a fim de conseqüentemente reduzir as altas taxas de recaídas da doença melhorando a sobrevivência dos pacientes (LAVERDIÈRE, et al., 2018).

Diversos trabalhos têm avaliado os níveis de expressão antigênica das CTLs, com isso o fenótipo das CTLs de LMA humanas já foi caracterizado de acordo com o padrão de expressão de vários marcadores de superfície. Estudos já demonstraram que as CTLs expressam o perfil CD34+/CD38- ou CD34+/CD38+ ou ainda CD34-/CD38+, e o compartimento CD34+/CD38- pode ser o mais importante na LMA positiva para CD34 (MOSHAVER et al., 2019). Já foi observado uma maior resistência ao tratamento em ensaios *in vitro* e *in vivo* em populações de CTLs que continham todas as permutações de expressão de CD34 e CD38 (POLLYEA & JORDAN 2017). Outros estudos também já apontam para a expressão de antígeno de CD33, CD123, em CTLs de LMA no diagnóstico inicial e em pacientes com recidiva da doença (HAUBNER et al., 2019).

A descoberta da expressão desses marcadores representa uma grande relevância no estudo das CTLs, tendo em vista que possibilita acompanhar as populações CTLs durante o curso da patogênese e terapia da doença, abrangendo assim a possibilidade de novas estratégias terapêuticas, além disso, possibilita separar as populações de células enriquecidas com os antígenos específicos para análise experimentais posteriores (POLLYEA, & JORDAN 2017).

Já é evidenciado que apesar das atuais estratégias terapêuticas comumente empregadas para o tratamento do câncer diminuírem com sucesso a carga tumoral, a recidiva do tumor provavelmente ocorrerá se as CTLs não forem efetivamente eliminadas. Isso porque os componentes do microambiente tumoral trabalham em conjunto para proteger as CTLs da imunidade anticâncer intrínseca do corpo e de intervenções farmacêuticas com a finalidade de manter o crescimento tumoral. Em outras palavras, pode-se dizer que o microambiente tumoral confere uma proteção às CTLs, funcionando como uma barreira terapêutica por intermédio de ações imunossupressoras que conseqüentemente acabam auxiliando no processo de promoção de tumores. Esse mecanismo

constitui um grande desafio para a erradicação da doença. Por esse motivo, as terapias voltadas para o microambiente tumoral, que visam atingir as CTLs, podem ser promissoras (RELATION, et al. 2017). Assim, pode-se presumir que uma variedade de componentes de nichos específicos favorece para que subpopulações de células leucêmicas adquiram um fenótipo resistente a quimioterápicos bem como a ativação de vias moleculares críticas para a leucemogênese (TABE & KONOPLEVA, 2017). Partindo desses pressupostos, o estudo de alvos moleculares específicos para CTL são necessários para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas a fim de aumentar a eficácia de potenciais alvos terapêuticos específicos para as CTLs, visando reduzir as chances de recidiva da doença nos pacientes com LMA.

1.4. Terapias convencionais para o tratamento das LMA

O objetivo do tratamento da LMA é que o paciente alcance a remissão completa da doença, ou seja, que a medula óssea e as contagens de células sanguíneas se estabeleçam. Cerca de 2 em cada 3 pacientes com LMA que são submetidos ao tratamento padrão entram em remissão o que quer dizer que a medula óssea desse paciente contém menos de 5% de células blásticas, a contagem de células sanguíneas retorna aos limites normais e não há sinais ou sintomas da doença. O tratamento comumente empregado tem como objetivo eliminar todas as células leucêmicas para que a medula óssea volte a produzir células normais. Esse tratamento envolve a quimioterapia e em alguns casos o transplante de medula óssea faz-se necessário (INCA, 2023; NCI, 2023).

Dentre as diferentes intervenções terapêuticas, o transplante alogênico de células hematopoiéticas ainda é o mais eficaz para pacientes adultos que possuem LMA de risco alto e intermediário. Porém, infelizmente a recidiva da doença mesmo após o transplante ainda permanece relativamente alta sendo considerada como a principal falha do tratamento e causa de óbito pós transplante (LEE et al., 2019).

No tratamento da LMA, primeiramente, o paciente é submetido a terapia de indução com o objetivo de atingir a remissão completa, sendo necessário destruir todas as células leucêmicas do indivíduo. Infelizmente, apesar da obtenção da remissão para a maioria dos pacientes, em muitos casos a doença

residual mínima permanece e conseqüentemente poderá culminar na recidiva da doença com a interrupção do tratamento. Nesse contexto, estima-se que até 70% dos adultos e 30% das crianças não sobrevivem além de 5 anos após o início da resposta clínica em consequência da recorrência da doença. Desse modo, apesar de existir formas de tratamento e a utilização de quimioterápicos ser amplamente utilizados, atualmente a LMA ainda apresenta uma alta taxa de recidiva e baixa sobrevida global (DE KOUCHKOVSKY & ABDUL-HA 2016; DARWISH et al., 2019; LAVERDIÈRE et al., 2018).

Há quase 40 anos, o protocolo padrão da quimioterapia de indução para o tratamento da LMA consiste na combinação de antraciclina e citarabina, denominada de terapia 7+3, associada ou não ao transplante de células-tronco halogênicas. Esse tratamento envolve a infusão contínua de citarabina por 7 dias mais 3 dias de uma antraciclina, geralmente daunorrubicina ou idarrubicina. Entretanto, apesar de todos os esforços, o tratamento ainda não é considerado ideal, pois um dos grandes problemas enfrentados é que a maioria dos pacientes não conseguem atingir a remissão completa da doença. As taxas de remissão completa dificilmente conseguem atingir a 70% em pacientes mais jovens e 50% em pacientes mais velhos (O'Donnell MR et al., 2017; ISHII & YANO, 2022). Por esse motivo, apesar das quimioterapias citotóxicas convencionais e do transplante alogênico, uma variedade de novos agentes como estratégias de tratamento tem surgido.

Visando melhorar esse cenário, após muitos estudos, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou alguns medicamentos que passaram a ser empregadas para a terapia antileucêmica dentre os quais se destacam o CPX-351, gemtuzumab, ozogamicina, e os medicamentos que envolvem terapia de alvo genético utilizando inibidores de FLT3 (midostaurina, gilteritinibe, quizartinibe) ou inibidores de IDH (ivosidenib, enasidenib), além de terapia-alvo não genética utilizando o inibidor de BCL-2 venetoclax (ISHII & YANO, 2022).

É importante destacar que a possibilidade de remissão depende em grande parte dos fatores prognósticos específicos do paciente, como por exemplo, a idade e a presença de certas alterações genéticas ou cromossômicas nas células leucêmicas. Os pacientes idosos normalmente não avançam tanto sucesso quanto os mais jovens principalmente devido ao fato de apresentarem problemas para tolerar o tratamento intensivo e possuírem alterações genéticas

associadas a perspectivas ruins (NCI, 2023).

Como exposto anteriormente, o tratamento para a LMA continua sendo um grande desafio na oncologia hematológica e seus vários subtipos acabam repercutindo para o desenvolvimento de uma terapia direcionada abrangente. Apesar de vários estudos contribuírem para uma maior compreensão da genética molecular da LMA, muitos têm buscado encontrar terapias aprovadas para LMA nos últimos 40 anos (JIANG et. al., 2018).

Estudos já demonstraram que mesmo após a quimioterapia ainda pode ser encontrado no organismo uma considerável população de células leucêmicas, o que é conhecido como doença residual. Nesse caso, é indispensável o acompanhamento com exames específicos e a continuidade do tratamento visando reduzir as possibilidades de recaídas da doença.

Na leucemia promielocítica aguda, um subtipo especial de LMA, por exemplo, exames da medula óssea ajudam a detectar mutações genéticas específicas e compatíveis com a doença, nesse caso, o tratamento quimioterápico conduzirá a taxas de cura bastante elevadas (INCA, 2020).

A boa resposta aos tratamentos quimioterápicos também depende da composição do microambiente imunológico. Estudos já demonstraram que pacientes com LMA possuem alterações imunológicas graves como disfunção mieloide e função anormal das células NK. A regulação negativa dos receptores de superfície de citotoxicidade NK apresentam uma depuração NK defeituosa dos blastos leucêmicos. Além disso, a secreção de moléculas supressoras e regulação positiva de ligantes imunossupressores em células de LMA passa ser um sério problema visto que a recuperação dos linfócitos após a quimioterapia está associada à melhora da sobrevida do paciente (AUSTIN et al., 2023).

Desse modo, compreender a biologia e o mecanismo de sobrevivência das CTLs é fundamental para conseguir erradicar qualquer doença residual possibilitando assim o alcance de uma alta taxa de remissão completa da doença, o que infelizmente ainda constitui um dos maiores desafios encontrados na clínica para o tratamento de LMA.

Atualmente a combinação de venetoclax e azacitidina é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da LMA alvejando as CTLs. Entretanto, ainda não foi estabelecido o total benefício conferido aos pacientes submetidos a essa quimioterapia padrão além disso, os mecanismos de resistência ainda

precisam ser descobertos e superados. No momento, testes clínicos estão em andamento visando avaliar a sensibilidade das CTLs e esse tipo de tratamento (STELMACH & TRUMPP 2023). Diante disso, novos estudos que busquem investigar possíveis alvos terapêuticos que garantam o tratamento eficaz destruindo as CTLs de LMA se faz necessário.

1.5. Via de sinalização NF-κB

A carcinogênese e a resposta imune-inflamatória no câncer requerem a participação de algumas vias de sinalização que promovem a expressão de citocinas em resposta às endotoxinas. Assim, o processo da carcinogênese resulta da ativação aberrante de diferentes vias de sinalização que conduzem à proliferação descontrolada das células que sofreram mutação. Dentre as vias que atuam na resposta inflamatória desencadeada pelo desenvolvimento tumoral inclui a NF-κB (BAYAT et al., 2018).

O fator nuclear kappa B (NF-κB) é um fator de transcrição de proteínas que atua regulando diferentes respostas biológicas dentre as quais incluem a diferenciação, proliferação celular e respostas imunológicas (WEI et al., 2017). Ele é constituído por cinco subunidades diferentes, que atuam como homodímeros ou heterodímeros com a finalidade de controlar alguns genes relacionados a inflamação, ao sistema imunológico, ao crescimento e à sobrevivência celular. Sua ativação pode ser decorrente de possíveis mutações genéticas em células que promovem a sua sinalização por duas diferentes vias denominadas de canônica e não canônica resultando em proliferação, sobrevivência e resistência a fármacos de células neoplásicas (O'DONNELL et al., 2023).

Cinco proteínas da família Rel influenciam a atividade de NF-κB e dividem-se em duas classes: p50 que surge da proteína precursora de p105 (NF-κB 1) e p52 que surge da proteína precursora p100 (NF-κB 2) a partir de uma região C-terminal contendo repetições de anquirina (AnkR) e clivada pós-tradução. As proteínas Rel A, Rel B e c-Rel são produzidas como proteínas maduras com domínios de transativação da transcrição (TADs). Os heterodímeros contendo TAD são ativadores transcricionais, já os homodímeros p50 ou p52 se não estiverem conectados a proteínas secundárias exercem função de repressores.

Este conjunto de proteínas podem gerar padrões regulatórios de uma variedade de genes (ZHANG et.al., 2017).

Como dito anteriormente, a ativação da via NF- κ B pode ser iniciada por intermédio de duas vias de sinalização principais, que são a via canônicas a não canônica. A via canônica envolve a ativação de I κ B quinase (IKK), a fosforilação de I κ B α , seguindo da degradação de I κ B α e da translocação nuclear dos membros canônicos de NF- κ B, dentre os quais se incluem RELA, c-REL, p50 e p65. Por outro lado, a via não canônica que envolve a ativação da quinase indutora de NF- κ B (NIK), fosforilação de p100 mediada por NIK, o processamento de p100 além da translocação nuclear de membros NF- κ B não canônicos como o p52 e RELB. A via não canônica atua respondendo aos sinais do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) e é estritamente controlada pela degradação dependente da ubiquitina de NIK. Nesse sentido, a ativação de NF- κ B não canônico requer a degradação de TRAF3 e do acúmulo de NIK que consequentemente irá culminar na interrupção induzida por sinal do complexo cIAP E3 (SUN, 2017).

Já é descrito que os reguladores transcricionais da família NF- κ B / I κ B exercem um papel importante na expressão de uma variedade de genes alvos incluindo aqueles que estão associados a fatores de crescimento, produção de citocinas e proto-oncogenes. Assim, o NF- κ B participa de várias etapas durante Estudos recentes já apontam oferecem fortes evidências de que ativação aberrante de NF- κ B exerce um papel em diferentes tipos de câncer sendo considerado um fator de mau prognóstico (DARWISH et al., 2019).

O I κ B exerce uma ação inibitória ao NF- κ B, tornando-o inativo e translocando-se para o citoplasma das células. Nesse caso, o NF- κ B fica impossibilitado de ativar os genes-alvo. Quando algumas proteínas específicas fosforilam o I κ B, este é degradado pelo proteassoma e, consequentemente, NF- κ B é translocado para o núcleo das células possibilitando assim a ativação dos genes alvo (RODRIGUES et al., 2021). A **figura 2** demonstra o esquema das vias de sinalização, canônica e não-canônica de NF- κ B.

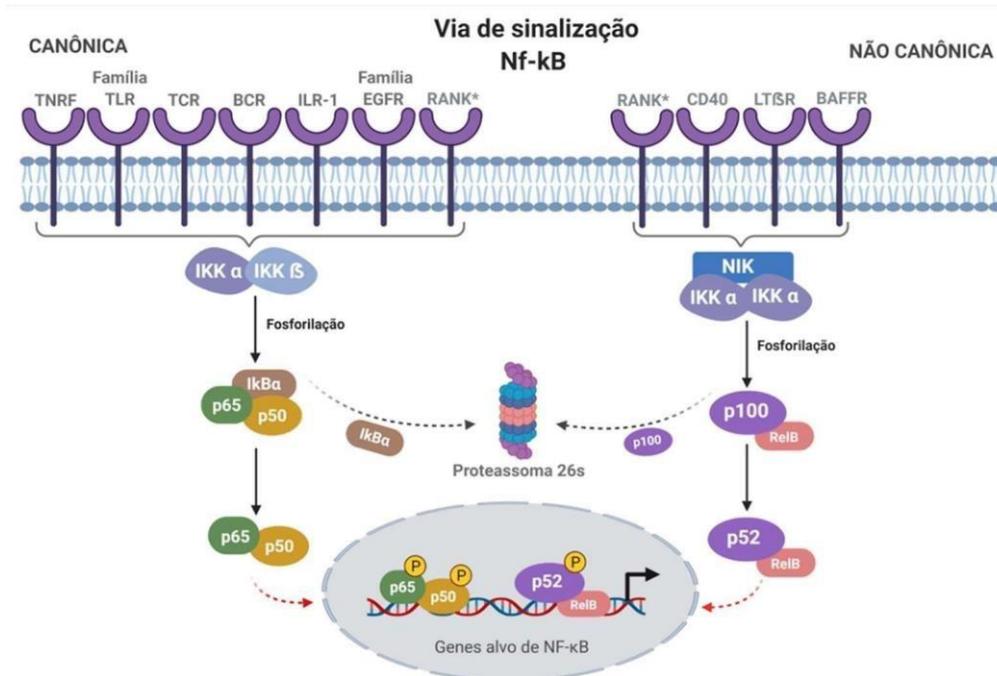


Figura 2. Via de sinalização canônica e não canônica de NF-κB. Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al., 2021. Criado com BioRender.com

Juntamente com o NF-κB, o IκB ao mesmo tempo é capaz de sofrer translocação nuclear, o que se sugere que haja uma interação com o NF-κB ligado ao DNA, isso conseqüentemente, pode resultar na indução de exportações nucleares (KALTSCHMIDT et al., 2022).

Outro papel desempenhado pela via NF-κB na progressão do câncer é que após a formação tumoral, o NF-κB se torna ativo e conseqüentemente prolonga a progressão tumoral ao aumentar os genes anti-apoptóticos ou a proliferação celular. Nesse sentido, a via de sinalização NF-κB desempenha um papel importante na progressão do câncer e por esse motivo vem se tornando uma via importante a ser estudada (BAYAT et al., 2018). Um estudo já demonstrou a expressão aumentada de NF-κB em amostras de medula óssea de 103 pacientes com LMA, constatando que a expressão estava aumentada em 80,5% (83 de 103) desses pacientes com LMA sugerindo assim que esse fator nuclear desempenha um papel fundamental na sobrevivência de células leucêmicas. O NF-κB é constitutivamente ativo na LMA e já foi detectado em mais de 50% dos casos (DARWISH et al., 2019).

Relata-se ainda que o NF-κB permite com que as células leucêmicas se tornem resistentes à apoptose e assim estimula a sua proliferação descontrolada (WEI et al., 2017). Já foi descrito que NF-κB ativado constitutivamente pode

ativar transcricionalmente os genes Bcl-2 e Bcl-XL (fatores anti-apoptóticos/pró-sobrevivência), e assim proteger as células neoplásicas de estímulos apoptóticos associados a vários agentes quimioterápicos (DARWISH et al., 2019).

Tendo em vista que o fator de transcrição NF- κ B, está presente em todos os tipos de células, incluindo CTLs a sua inibição seus alvos com fármacos específicos pode ser uma promissora estratégia para eliminar CTLs (KALTSCHMIDT et al., 2022).

Diante desses pressupostos identificar e entender os mecanismos moleculares que atuam regulando a proliferação e a sobrevivência das CTLs é de grande importância. Tendo em vista que NF- κ B é constitutivamente ativo nas CTLs de LMA, muitos trabalhos têm se voltado para o estudo dessa via de sinalização buscando estratégias terapêuticas para essa via a fim de desenvolver terapias direcionadas específicas para CTLs que sejam capazes de reduzir atividade proliferativa e a auto-renovação das CTLs.

1.6. BTZ

BTZ de nome comercial Velcade® é um dipeptídeo análogo do ácido borônico, que atua na via do proteassoma 26S da homeostase da proteína celular inibindo reversivelmente o complexo enzimático proteassoma. Para o tratamento do Mieloma Múltiplo (MM) recém-diagnosticado ou recidivante, esse inibidor proteassoma é utilizado com várias combinações de fármacos e destaca-se pela sua elevada eficácia. Já é conhecido a ação do BTZ mediada pela inibição de NF- κ B induzindo a morte celular apoptótica bem como a inibição a adesão das células tumorais ao estroma (APALLA et al., 2020; MIGKOU et al., 2018).

Os inibidores de proteassoma surgem como uma importante classe de medicamentos para o tratamento de MM e linfoma de células do manto, e estão sendo investigados para outras anomalias. O BTZ foi o primeiro inibidor de proteassoma a ser aprovado pela FDA, para uso clínico no tratamento de MM em 2003 e cerca de um terço dos pacientes apresentaram uma boa resposta, sendo assim, foi descrito como o primeiro inibidor de proteassoma com efeito anti-mieloma significativo. A partir de então, os resultados promissores

observados fizeram com que o BTZ passasse a ser estudado e posteriormente utilizado como uma importante ferramenta terapêutica em combinação com outros fármacos para o tratamento de uma variedade de cânceres (FRICKER, 2020 & MIGKOU et al., 2018).

Conforme já exposto as células leucêmicas possuem uma variedade de alterações moleculares, o que pode culminar em muitas isoformas de proteínas diferentes e, por conseguinte induzir a expressão de proteína aberrante, que impõe uma carga inerente pesada no sistema ubiquitina-proteassoma (UPS). Em células normais, a homeostase da proteína é mantida principalmente pelo UPS. Sendo assim, células aberrantes podem acabar alterando toda a conformidade do UPS, o que por sua vez facilita o rápido crescimento celular anormal. Nesse sentido, intervenções terapêuticas com direcionamento de UPS com inibidores de proteassoma surgem como uma importante estratégia para o tratamento de leucemias (CLOOS et. al., 2017; LEE et al, 2019).

O proteassoma 26S é uma protease intracelular que exerce papel na identificação e degradação de proteínas-chave ubiquitiladas que são importantes para o crescimento celular, progressão do ciclo celular, reparo e apoptose. Como o BTZ tem como alvo o proteassoma, a inibição do proteassoma resultante pode resultar em apoptose celular (MIGKOU et al., 2018; CLOOS et. al., 2017; LEE et al, 2019).

Já foi demonstrado que a atividade do proteassoma é de fundamental importância para a sobrevivência das células cancerosas. Na LLA por exemplo, trabalhos sugerem que inibir o proteassoma a partir da quimioterapia pode ser uma estratégia eficiente para melhorar as taxas de resposta de recidiva da LLA (HORTON, et al., 2019). Estudo sugere o BTZ em combinação com outros fármacos como vincristina, dexametasona, pegylated L-asparaginase, e doxorubicina (VXLD) como um fármaco com toxicidade aceitável em pacientes pediátricos com LLA recidivante sendo eficiente por aumentar as taxas de remissão completa de pacientes com recidiva (MESSINGER et al, 2012).

O sucesso dos inibidores de proteassoma como o BTZ no MM tem sido amplamente traduzido para outras doenças hematológicas. As células leucêmicas produzem uma grande quantidade de imunoglobulinas e possuem níveis mais elevados da atividade do proteassoma em comparação com as células normais. Além disso, as células leucêmicas possuem uma abundância

de imunoproteassomas (IP) e, por essa razão, o direcionamento seletivo passa ser uma opção de tratamento bastante atraente. Assim, a inibição do proteassoma é hoje reconhecida como uma nova modalidade de tratamento em doenças hematológicas (NIEWERTH, et al., 2013; CLOOS et al., 2017).

Já é descrito que as células de LMA apresentam proteassomas aumentados, sendo mais sensíveis à apoptose quando mediadas por inibidor de proteassoma, e que as células-tronco de LMA têm a expressão de NF- κ B aumentada sendo seletivamente direcionada com inibidores de proteassoma (APLENC et al., 2020). Além disso, tendo em vista que grande parte dos medicamentos antileucêmico tem como alvo a replicação do DNA para interferir na proliferação celular, o inibidor de proteassoma BTZ pode ser um composto promissor na quimioterapia da LMA, devido às suas propriedades farmacológicas e sua capacidade de aumentar as taxas de resposta completa, diminuindo as recidivas e aumentando a sobrevida dos pacientes (CLOOS et al., 2017; LEE et al, 2019).

Já é compreendido basicamente sobre o principal mecanismo de ação dos inibidores proteassomais, entretanto, o entendimento sobre os eventos a jusante que induzem à morte celular ainda não foram bem estabelecidos. Estudos já identificaram que os inibidores de proteassoma afetam o turnover proteico, porém em concentrações mais elevadas do que as alcançadas clinicamente, o que leva a crer que existe a possibilidade de que alguns dos efeitos dos inibidores de proteassoma possam ser conduzidos por outros mecanismos ainda desconhecidos (FRICKER, 2020).

Embora o BTZ tenha sido amplamente estudado para o tratamento de alguns cânceres, outros estudos são necessários para uma melhor compreensão e determinação de uma terapia ideal com o BTZ sozinho ou em combinação com outros fármacos. Nesse aspecto, levando em consideração que o BTZ é um inibidor de proteassoma já descrito e que a interrupção da atividade do proteassoma resulta na diminuição da progressão de processo tumoral por induzir a apoptose das células cancerosas e parada do crescimento celular, este pode ser melhor estudado como uma perspectiva futura para intervenções terapêuticas promissoras para pacientes com LMA.

2. JUSTIFICATIVA

Conforme já descrito acima, a LMA é um câncer que ainda apresenta uma incidência muito alta e um dos maiores desafios para um tratamento eficaz é atingir as CTLs, que são as principais responsáveis pelas altas taxas de recaída nos pacientes. Os pacientes com LMA não conseguem atingir a remissão completa da doença e a recidiva ocorre pela proliferação dessa pequena população de células residuais.

Alguns estudos já demonstraram que a inibição da via NF- κ B é um importante alvo para mediar a morte de CTLs de LMA e por esse motivo alguns compostos bioativos que tenham ação nesta via têm despertado bastante interesse. Já foi relatado também que via ubiquitina-proteassoma desempenha um papel crítico na degradação regulada de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e no crescimento tumoral.

Nesse sentido, pesquisadores do NIH Chemical Genomics Center (EUA), realizaram uma triagem com aproximadamente 2.800 medicamentos clinicamente aprovados e compostos bioativos da NIH Chemical Genomics Center Pharmaceutical Collection (NPC) para identificar pequenas moléculas inibidoras da sinalização de NF- κ B. Nesta triagem inicial, foram identificados 19 fármacos que inibiram a sinalização desta via, dentre estes, o BTZ se destacou como um potente inibidor proteassomal (MILLER et al., 2010). A partir de então esse composto passou a ser testado e identificado por ser um potente inibidor da via NF- κ B em alguns tipos de cânceres, no entanto, estudos com o BTZ focando nas CTLs de LMA ainda carecem.

Diante do exposto, levando em consideração que o BTZ é um potente inibidor de proteassoma e que em alguns estudos pré-clínicos esse composto demonstrou atividade contra uma variedade de malignidades de células B, o presente trabalho visa identificar novos fármacos para eliminar CTLs de LMA utilizando o BTZ como inibidor de NF- κ B, visando inibir a expressão aberrante da CTLs ou sensibilizá-las, o que vem a ser de grande relevância para subsidiar possíveis ensaios clínicos com o BTZ como um fármaco promissor para o tratamento de LMA. Assim, a hipótese deste trabalho é que o BTZ é capaz de eliminar CTLs de LMA via inibição da via NF- κ B.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antileucêmico do BTZ e sua capacidade em eliminar CTLs em modelo *in vitro* e *in vivo* de LMA.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do BTZ em diferentes linhagens celulares cancerosas e não cancerosas;
- Avaliar a capacidade do BTZ em eliminar CTLs em células LMA humana KG-1a;
- Analisar as alterações sobre o ciclo celular de células KG-1a após o tratamento com BTZ;
- Analisar as alterações sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células KG-1a após o tratamento com BTZ;
- Analisar a atividade de caspase-3 e PARP-1 em células KG-1a após o tratamento com o BTZ;
- Avaliar a capacidade do BTZ em induzir estresse oxidativo em células KG-1a;
- Verificar o efeito do BTZ sobre a expressão de genes relacionados ao câncer em células KG 1a;
- Avaliar o efeito do BTZ nas vias de sinalização NF-κB em células KG-1a;
- Determinar o efeito antileucêmico do BTZ em modelo xenoenxerto com células KG-1a.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do composto

O BTZ (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) foi obtido comercialmente e dissolvido em dimetilsulfóxido estéril (DMSO, Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) em uma solução estoque de 5 mg/mL e diluídos com meio de cultura em diferentes concentrações para os experimentos deste estudo.

4.2. Obtenção e manutenção das células em cultura

Foram utilizadas células de linhagens cancerosas e não cancerosas humanas (tabela 1). As linhagens foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) cultivadas seguindo as instruções do guia de cultura de células animais ATCC (**Tabela 1**). Testes para micoplasma foram realizados utilizando um kit de coloração de micoplasma (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) para validar o uso de células livres de micoplasma.

Tabela 1 Painel de linhagem de células cancerosas e não cancerosas.

Células Cancerosas	Tipo Histológico	Propriedades de crescimento
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	Células aderentes
HCT116	Carcinoma de cólon humano	Células aderentes
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	Células aderentes
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosas humano	Células aderentes
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano	Células aderentes
CAL27	Carcinoma oral de células escamosas humano	Células aderentes
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humano	Células em suspensão
NB4	Leucemia promielocítica aguda humana	Células em suspensão
KG-1a	Leucemia mieloide aguda humana	Células em suspensão

THP-1	Leucemia monocítica aguda	Células em suspensão
Jurkat	Leucemia linfóide de células T humana	Células em suspensão
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana	Células em suspensão
B16-F10	Melanoma murino	Células aderentes
4T1	Carcinoma de mama (triplo negativo) murino	Células aderentes
SCC9	Carcinoma de células escamosas de língua humana	Células aderentes
SCC25	Carcinoma de células escamosas de língua humana	Células aderentes
MDA-MB 231	Adenocarcinoma de mama	Células aderentes
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário	Células aderentes
U-87	Glioblastoma humano	Células aderentes
A549	Carcinoma de pulmão	Células aderentes
PANC-1	Carcinoma de pâncreas	Células aderentes
DU-145	Carcinoma de próstata	Células aderentes
A375	Melanoma	Células aderentes
Células Não Cancerosas	Tipo Histológico	Células aderentes
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano	Células aderentes
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico	Células aderentes
BJ	Fibroblasto de prepúcio humano	Células aderentes
WT SV40 MEF	Fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado de tipo selvagem	Células aderentes
BAD KO SV40 MEF	Fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado com gene BAD	Células aderentes

A tabela apresenta as linhagens de células cancerosas e não cancerosas utilizadas, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA).

As linhagens celulares foram mantidas em garrafas de polipropileno (75 cm³, volume de 250 mL) em meio de cultura DMEM-F12 (Gibco®), suplementado

com 10% de soro bovino fetal (SFB, Gibco®), com exceção da linhagem KG-1a que foi suplementada com 20% (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA), acondicionadas em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂ e acompanhadas diariamente através do microscópio óptico invertido. As linhagens celulares foram cultivadas e todos os experimentos foram realizados com células em fase exponencial de crescimento.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram adquiridas por gradiente de densidade Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Helthcare Biosciences AB, Suécia) de sangue heparinizado coletado de doadores saudáveis com consentimento informado (CEP 031019/2013). A separação das PBMC foi realizada e posteriormente as células foram lavadas por duas vezes consecutivas com solução salina e ressuspensas ($0,3 \times 10^6$ células/ mL) em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 2 mM de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina. Concanavalina-A (ConA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente mitógeno a fim de induzir a divisão celular de linfócitos T.

4.3 Ensaio do Alamar Blue

A metodologia empregada para avaliar a citotoxicidade do BTZ em células cancerosas e não cancerosas foi através da redução da resazurina (Alamar Blue, Sigma-Aldrich Co), o que permitiu também determinar os valores de CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da proliferação das células).

A resazurina é um indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade redox. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) (RIBEIRO et al., 2004). Nesse contexto, o ensaio alamar blue incorpora um indicador de crescimento fluorimétrico / colorimétrico com base na detecção da atividade metabólica. Especificamente, o sistema incorpora um indicador de óxido-redução (REDOX) fluorescente e muda de cor em resposta à redução química do meio de crescimento resultante do crescimento celular (GUPTA et al., 2010). Trata-se de um corante solúvel em água, extremamente estável e não tóxico para as células, que é utilizado para quantificar a viabilidade das células (AHMED; GOGAL JR; WALSH, 1994).

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL para as células em suspensão ou $0,7 \times 10^5$ células/mL para as células aderentes. O BTZ, dissolvido em DMSO, foi adicionado em cada poço e incubado por 72 h. Foi utilizado como controle positivo a doxorrubicina (pureza $\geq 95\%$, cloridrato de doxorrubicina, Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina). Os poços não tratados receberam apenas o veículo utilizado para solubilizar as substâncias testadas (0,5% de DMSO, Sigma Chemical, Co).

O controle negativo recebeu a mesma quantidade do veículo (DMSO 0,5%). Antes do final do período de incubação (4 h para linhagens celulares e 24 h para o PBMC), foram adicionadas 20 μ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co.) em cada poço das linhagens plaqueadas, com exceção dos poços controles. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda a 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado) utilizando o leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A partir da leitura foram obtidos os valores de CI_{50} para as células tumorais e não tumorais.

4.4. Ensaio Azul de tripan

A fim de confirmar os resultados encontrados no ensaio do alamar blue, avaliamos a viabilidade celular, após o tratamento com o BTZ sobre as células KG-1a nos tempos de 12, 24, 48 e 72h pelo ensaio azul de tripan.

O princípio deste ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis expulsarem o corante do interior da célula, enquanto que as células não viáveis, por apresentarem membranas não íntegras, retêm o corante, corando-se de azul. A quantidade de células viáveis e não viáveis foi analisada na câmara de Neubauer através de microscópio óptico (Olympus BX41, Tóquio, Japão). Foram realizados três experimentos independentes em duplicatas.

4.5. Ensaio de identificação e quantificação de células-tronco leucêmicas

Os ensaios de identificação e quantificação de CTLs foram realizados por citometria de fluxo. Utilizamos moléculas de superfície com anticorpos anti-CD34-(PE), anti-CD38-(BV421), anti-CD13-(PE-CF594), anti-CD33-(BV510) e anti-CD123-(BV605) (BD Biosciences). As células KG1-a foram tratadas com o

BTZ por 48 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas e ressuspensas em 100 µL de uma mistura de anticorpos previamente, preparados em PBS com 0,5% de BSA (PBS/BSA) na diluição conforme determinado por titulação e incubadas por 40 minutos na ausência de luz. Posteriormente a essas células foram coradas com o YO-PRO-1 (1 µL) e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes. Cinquenta mil eventos foram analisados em cada amostra e os doublets e debris celulares foram omitidos nas aquisições e análises.

4.6. Avaliação *in vitro* do padrão de morte celular e mecanismo de ação do BTZ

Para os ensaios de avaliação do padrão morte celular bem como o mecanismo de ação do BTZ, as células KG-1a foram adicionadas a placas de 24 poços numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL e tratadas com BTZ nas concentrações de 0,5, 1 e 2 µM (concentrações baseadas no valor de CI₅₀) e incubadas no período de 12, 24, 48 e/ou 72 horas. Estas células foram mantidas em estufa a 37° C. A doxorubicina (DOX - 1 µM) foi utilizada como controle positivo e o DMSO 0,2% (veículo utilizado para solubilizar e diluir a substância testada) foi utilizado como controle negativo.

4.6.1. Avaliação de morte celular apoptótica

Para avaliar o perfil de morte celular, células KG-1a foram plaqueadas na densidade de $0,3 \times 10^6$ /mL, tratadas com o BTZ e controles e incubadas por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente essas células foram centrifugadas, lavadas com salina, o sobrenadante foi descartado e ao pellet celular foi adicionado 100 µL de tampão de ligação e acrescentados 3 µL de iodeto de propídio (BD Biosciences) e as células foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min, posteriormente a essas células foi adicionada 0,3 µL YO-PRO-1 (Sigma-Aldrich Co.) e 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

4.6.2. Marcação para Caspase 3 e PARP-1

A análise da expressão de caspase 3 ativa e PARP clivada foi realizada por citometria de fluxo utilizando o citômetro BD LSR Fortessa usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Após 24 horas de tratamento com o BTZ na concentração de 2 μ M, as células KG1-a foram marcadas com anticorpos anti-PARP clivada-(Asp 214) -(PE) e anti-Caspase 3-ativa-(FITC) (BD Biosciences) e incubadas durante 1 hora, diluídas em tampão de incubação, centrifugadas e ressuspensas em solução de 200 μ L de PBS/BSA e analisadas no citômetro de fluxo. Os ensaios foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes. Dez mil eventos foram analisados em cada amostra e os doublets e debris celulares foram omitidos nas aquisições e análises.

4.6.3. Ensaio de reversão com inibidores farmacológicos

A fim de confirmar mecanismos de citotoxicidade induzido por compostos utilizamos alguns inibidores farmacológicos como o inibidor de caspase -3 (Z-VAD (Ome) -FMK, Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, EUA), a fim de confirmar o efeito do BTZ sobre a indução de apoptose e o antioxidante (N-acetil-cisteína, NAC, Sigma-Aldrich Co), um potente inibidor de espécies reativas de oxigênio (ERO), a fim de verificar a participação do dano oxidativo na ação do composto. Esses inibidores foram adicionados às células KG1a 1 hora antes do tratamento com BTZ e posteriormente avaliamos a morte celular 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) após marcação e incubação por 15 minutos com o YO-PRO/IP. Os ensaios foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes. Dez mil eventos foram analisados em cada amostra e debris celulares foram omitidos nas aquisições e análises.

4.6.4. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial

Para avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial, a marcação de Rodamina 123 por citometria de fluxo foi realizada. Com alteração do potencial transmembrânico, a rodamina 123 é sequestrada para dentro da mitocôndria. As células viáveis possuem uma maior incorporação a rodamina devido a ligação às cargas negativas internas elas emitem maior fluorescência verde, em contrapartida, as células em apoptose por ter menor afinidade pelo corante expressam uma fluorescência menor (BOCK & TAIT, 2020).

As células foram plaqueadas na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL com diferentes concentrações do BTZ, controle positivo e controle negativo. Uma alíquota de 2 mL foi recolhida após a incubação com a substância. As células foram diluídas com a solução de rodamina 123 (5 µg/mL, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) na ausência de luz e a 37 °C, e, após 15 minutos. Posteriormente as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspendidas em salina e reincubado por 30 minutos e analisadas por citômetro de fluxo.

4.6.4. Quantificação das ERO intracelular

Para detectar os níveis de ROS mitocondrial, após o tratamento com BTZ, nas diferentes concentrações utilizamos o reagente MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e analisamos de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de ERO mitocondriais foram detectados medindo a fluorescência de MitoSOX™ Red pela técnica de citometria de fluxo.

Pelo menos 10.000 eventos/amostra foram analisados.

MitoSOX™ é um indicador de superóxido que tem como alvo específico as mitocôndrias de células vivas. Esse método baseia-se no princípio de que quando o MitoSOX™ é oxidado por superóxido, o óxido emite fluorescência vermelha após a ligação ao ácido nucleico possibilitando medir diretamente os peróxidos gerados pelas mitocôndrias das células vivas. Dessa maneira, a fluorescência vermelha se acumula nas mitocôndrias por isso o MitoSOX™ pode ser utilizado como um biomarcador confiável para determinar a toxicidade oxidativa mitocondrial no desenvolvimento de novos medicamentos (AHN et al., 2022).

4.6.5. Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA

As diferentes fases do ciclo celular são marcadas pelas variações no seu conteúdo de DNA. Para quantificar o conteúdo de DNA celular e identificar os perfis do ciclo celular por citometria de fluxo as células devem ser marcadas com iodeto de Propídeo (IP), um marcador colorimétrico nuclear e cromossômico fluorescente vermelho. Após período de incubação com o BTZ as células foram diluídas com a solução de permeabilização (200 µL) contendo 0,1 % de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio, 2 µg/mL iodeto de propídio e 100 µg/mL RNase em água destilada, na ausência de luz e a 37°C. Após 15 minutos, as células foram analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As proporções de DNA fragmentado e as fases do ciclo celular foram obtidas utilizando o software Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os detritos celulares foram excluídos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.6.7. Análise da expressão gênica por qPCR

As células KG-1a foram incubadas com 2 µM de BTZ 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 mediante à quantidade e pureza usando um espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A transcrição reversa do RNA foi realizada usando um Superscript VILO™ Kit (Invitrogen Corporation; Waltham, MA, EUA). Para o estudo de expressão gênica por qPCR foi utilizada TaqMan® array human cancer drug targets 96-well plate, 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 (RQ) 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 (0,2% DMSO) foram usados como um calibrador. As reações foram normalizadas pela média geométrica do RQ dos genes de referência

GAPDH, HPRT1, PGK1 e RLPL0. Todos os experimentos foram realizados em condições livres de DNase/RNase. Os genes foram considerados regulados positivamente se o $RQ \geq 2$, o que significa que a expressão gênica nas células tratadas com o BTZ foi pelo menos duas vezes maior do que nas células tratadas com controle negativo. Da mesma forma, os genes foram considerados regulados negativamente se $RQ \leq 0,5$, o que significa que a expressão gênica em células tratadas com o BTZ foi pelo menos metade daquela das células tratadas com controle negativo.

4.6.8. Marcação NF- κ B

Para a análise para marcação NF- κ B utilizamos os anticorpos anti-NF- κ B p65-(pS529) - (Alexa Fluor 488) e NF- κ B p65 (pS529) em experimentos independentes. Após 24 horas de tratamento com o BTZ na concentração de 2 μ M as células KG1-a foram marcadas com os anticorpos, incubadas durante 1 hora, diluídas em tampão de incubação, centrifugadas, ressuspendidas em 200 μ L de PBS/BSA e analisadas no citômetro de fluxo. Os ensaios foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes. Dez mil eventos foram analisados em cada amostra e os doublets e debris celulares foram omitidos nas aquisições e análises.

Adicionalmente, avaliamos por imunofluorescência a expressão de NF- κ B em células KG-1a pós tratamento com o BTZ utilizando utilizado o anticorpo anti-NF- κ B p65 PE observando através da microscopia confocal.

4.7. Ensaios *in vivo* - Modelo de xenotransplante com camundongos imunodeficientes – NSG

Os testes para avaliação da atividade contra CTLs de LMA *in vivo* (modelo xenotransplante) foram realizados utilizando camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdcg Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) oriundos do biotério da Fiocruz-Bahia (CEUA 016/2018).

Os animais foram mantidos durante a experimentação no Biotério da Fiocruz-Bahia, alojados dentro de caixas de polipropileno e grades metálicas apropriada em pequenos grupos do mesmo sexo (não excedendo 5 animais por gaiola). A temperatura do local foi de $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ e a umidade relativa de 30 % a 70 %. A iluminação foi artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12

horas de obscuridade. Esses animais tiveram livre acesso a alimentação (ração específica) e água. Utilizamos animais do sexo masculino e feminino, adultos, jovens, saudáveis e que não foram anteriormente submetidos a processos experimentais.

Inicialmente, os animais foram tratados com bulsufano (25 mg/kg) um dia antes do transplante. Células KG-1a ($2,5 \times 10^6$ 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). Utilizamos um animal como controle não inoculado com célula KG-1a.

O tratamento com o BTZ e controle negativo (DMSO 0,2%) foi iniciado cinco semanas após o transplante. Antes de iniciar o tratamento o sangue de alguns animais que foram inoculados e do animal controle foi coletado e analisado por citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) utilizando anticorpos anti-mCD45 (camundongo) e anti-hCD45 (humano) a fim de verificar se as células KG-1a haviam colonizado. Tendo em vista que os animais que foram inoculados com KG-1a apresentaram marcação para hCD45, demos início ao tratamento com o BTZ por via intraperitoneal por duas semanas em dias intercalados.

Após o tratamento os animais foram eutanasiados e as células da medula óssea, baço e sangue foram coletadas e analisadas quanto à presença de células humanas por citometria de fluxo, além de terem os órgãos pesados, bem como o peso dos animais antes e após o tratamento para avaliação da toxicidade do tratamento. As células da medula óssea foram marcadas com anticorpo anti-CD45-PE humano e anti-CD45-FITC de camundongo (Becton Dickinson) e analisadas em citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cem mil eventos foram analisados em cada amostra e os detritos celulares foram omitidos dos resultados.

Além disso, avaliamos os efeitos toxicológicos do BTZ nesses animais, para isso, eles foram pesados no início e no final do experimento. O fígado, rins, pulmões, baço e coração foram removidos, pesados e examinados quanto a sinais de possíveis lesões graves, alterações de cor e/ou hemorragia.

Os corações, fígados, pulmões e rins foram corados em hematoxilina e eosina para análise da arquitetura tecidual e alterações morfológicas através da

microscopia óptica. 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.

4.8. Análises estatísticas

Os dados estatísticos foram analisados através do software GraphPad Prism 8 (Intuitive Software for Science) e expressos em média \pm E.P.M. padrão dos dados 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 teste-t ou análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Efeito do BTZ sobre a viabilidade de células cancerosas e não cancerosas

A avaliação da citotoxicidade do BTZ foi realizada a partir de um painel de linhagens celulares de diferentes células cancerosas e não cancerosas conforme descrito acima pelo ensaio de alamar blue após 72h de incubação.

A tabela 2 apresenta os resultados encontrados. O BTZ apresentou valores de CI_{50} que variaram de 0,13 a 9,17 μM para as linhagens de Leucemia promielocítica aguda humana (NB4) e Glioblastoma Humano (U87) respectivamente. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, apresentou valores de CI_{50} que variaram de 0,02 a 2,82 μM para as linhagens de leucemia linfóide de células T (Jurkat) e carcinoma de pâncreas (PANC-1) respectivamente. Para as linhagens não cancerosas, o BTZ apresentou valores que variaram de 0,18 a 0,85 μM para as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e fibroblastos de pulmão (MRC-5) respectivamente. A doxorrubicina apresentou valores de CI_{50} variando de 1,21 a 3,60 μM para as células primárias de PBMC e linhagem de fibroblasto de prepúcio (BJ) respectivamente.

Tabela 2. Citotoxicidade do BTZ em diferentes tipos histológicos

Linhagens	Tipo Histológico	$CI_{50} \mu\text{M}$	
		BTZ	Doxorrubicina
Células cancerosas			
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	1,39	1,33
		0,44- 4,41	0,85 - 2,08
HCT116	Carcinoma de cólon humano	0,31	1,53
		0,06 - 1,75	1,09 - 2,17
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	0,16	0,28
		0,01 - 1,81	0,16 - 0,48
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosas humano	0,18	1,14
		0,04 - 4,19	0,64 - 2,01
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano	0,02	0,48
		0,01-0,26	0,36 - 0,63

CAL 27	Carcinoma oral de células escamosas humano	0,08	4,36
		0,04- 0,26	2,99 - 6,34
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humano	0,52	0,12
		0,18 - 1,43	0,06 - 0,23
NB4	Leucemia promielocítica aguda humana	0,11	0,13
		0,04 - 0,33	0,08 - 0,21
KG-1a	Leucemia mieloide aguda humana	0,06	0,54
		0,01 - 0,90	0,23 - 1,25
THP-1	Leucemia monocítica aguda	0,33	0,23
		0,10 - 1,06	0,14 - 0,38
Jurkat	Leucemia linfoide de células T humana	0,05	0,04
		0,01 - 1,86	0,02 - 0,11
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana	0,31	1,35
		0,09 - 1,01	0,75 - 2,43
B16-F10	Melanoma murino	0,03	0,10
		0,01 - 0,39	0,06 - 0,16
4T1	Carcinoma de mama (triplo negativo) murino	1,83	1,14
		0,2 - 4,19	0,64 - 2,01
SCC9	Carcinoma de células escamosas de língua humana	1,83	1,14
		0,2 - 4,19	0,64 - 2,01
SCC25	Carcinoma de células escamosas de língua humana	0,36	1,31
		0,05 - 2,27	0,71 - 2,38
MDA-MB 231	Adenocarcinoma de Mama	1,48	2,00
		0,52 - 7,6	1,14 - 3,50
OVCAR - 3	Adenocarcinoma de Ovário	0,5	1,84
		0,01 - 0,95	1,13- 3,00
U-87	Glioblastoma Humano	1,67	0,48
		0,67- 4,18	0,24 - 0,98
A549	Carcinoma de Pulmão	0,14	2,54
		0,12 - 0,16	1,96- 3,30
PANC-1	Carcinoma de Pâncreas	0,02	4,36
		0,01 - 0,14	2,99 - 6,34
DU-145	Carcinoma de Próstata	0,09	1,35
		0,02 - 0,56	0,52 - 3,50
A375	Melanoma	0,01	0,46
		0,01 - 0,12	0,33 - 0,65

Células não cancerosas

MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano	0,58	1,44
		0,14 - 2,51	0,90 - 2,30
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico	0,51	1,33
		0,18 - 1,47	0,91 - 1,94
BJ	Fibroblasto de prepúcio humano	0,21	1,33
		0,18 - 1,47	0,91 - 1,94

A tabela apresenta os valores de CI_{50} (concentração inibitória média) em μM e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata pelo ensaio alamar blue após 72 horas de tratamento. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Tendo em vista que dentre as LMA testadas KG-1a é a que mais expressa o perfil de CTL (CD34+CD38-), escolhemos essa linhagem para os ensaios *in vivo* e *in vitro* desse estudo com o objetivo de avaliar os efeitos do BTZ em CTLs de LMA. Assim, avaliamos a atividade antileucêmica do BTZ em células KG-1a utilizando as concentrações 0,5, 1 e 2 μM .

Para confirmar a citotoxicidade do BTZ em células KG-1a, realizamos o ensaio de viabilidade celular por exclusão de azul de tripam nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas. Observamos que o BTZ foi capaz de reduzir significativamente o percentual de células viáveis nas diferentes concentrações e tempos testados quando comparado com o controle negativo (DMSO 0,2%) (**Figura 3**).

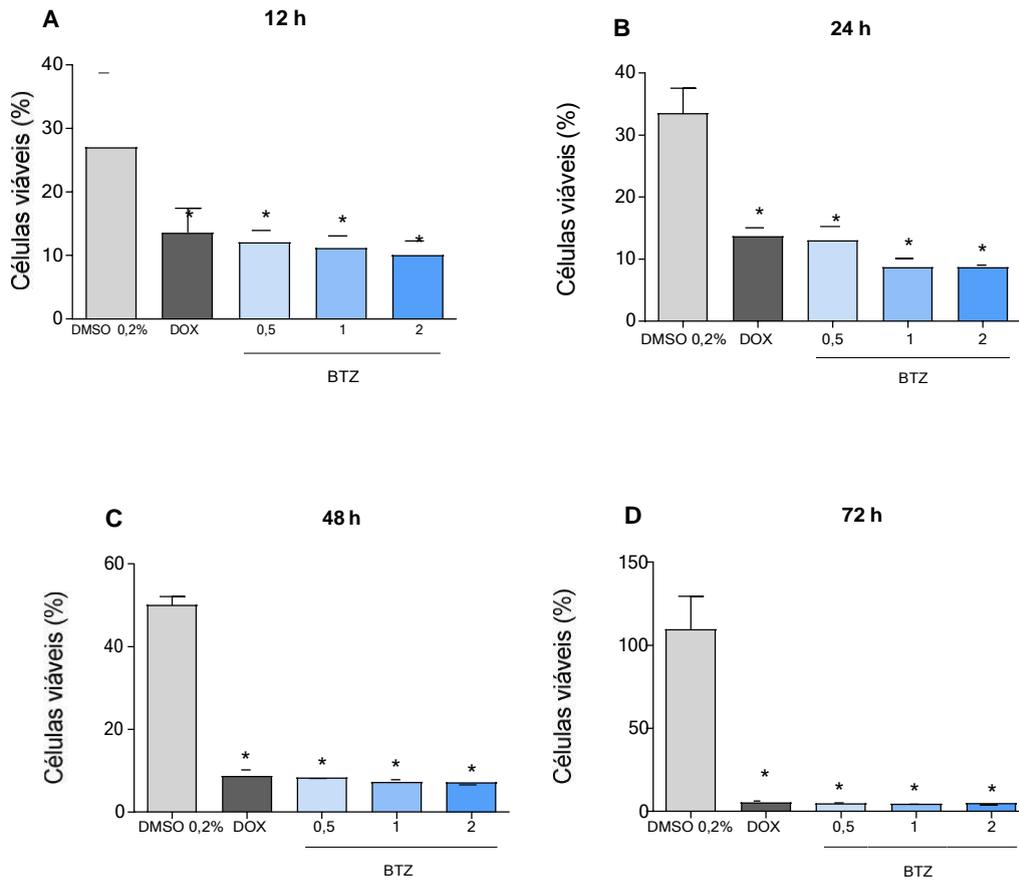


Figura 3. Efeito do BTZ sobre a viabilidade de KG-1a após 12h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) de tratamento, determinado pela contagem de células viáveis por azul de tripam. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste DMSO 02%. Doxorrubicina 1 μ M foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.2. BTZ reduziu a população de CTLs viáveis

O tratamento com BTZ foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade total de células CD34+ após 48h de tratamento, além da redução das células marcadas para CD13, CD33, CD38 e CD123 (**Figura 4**).

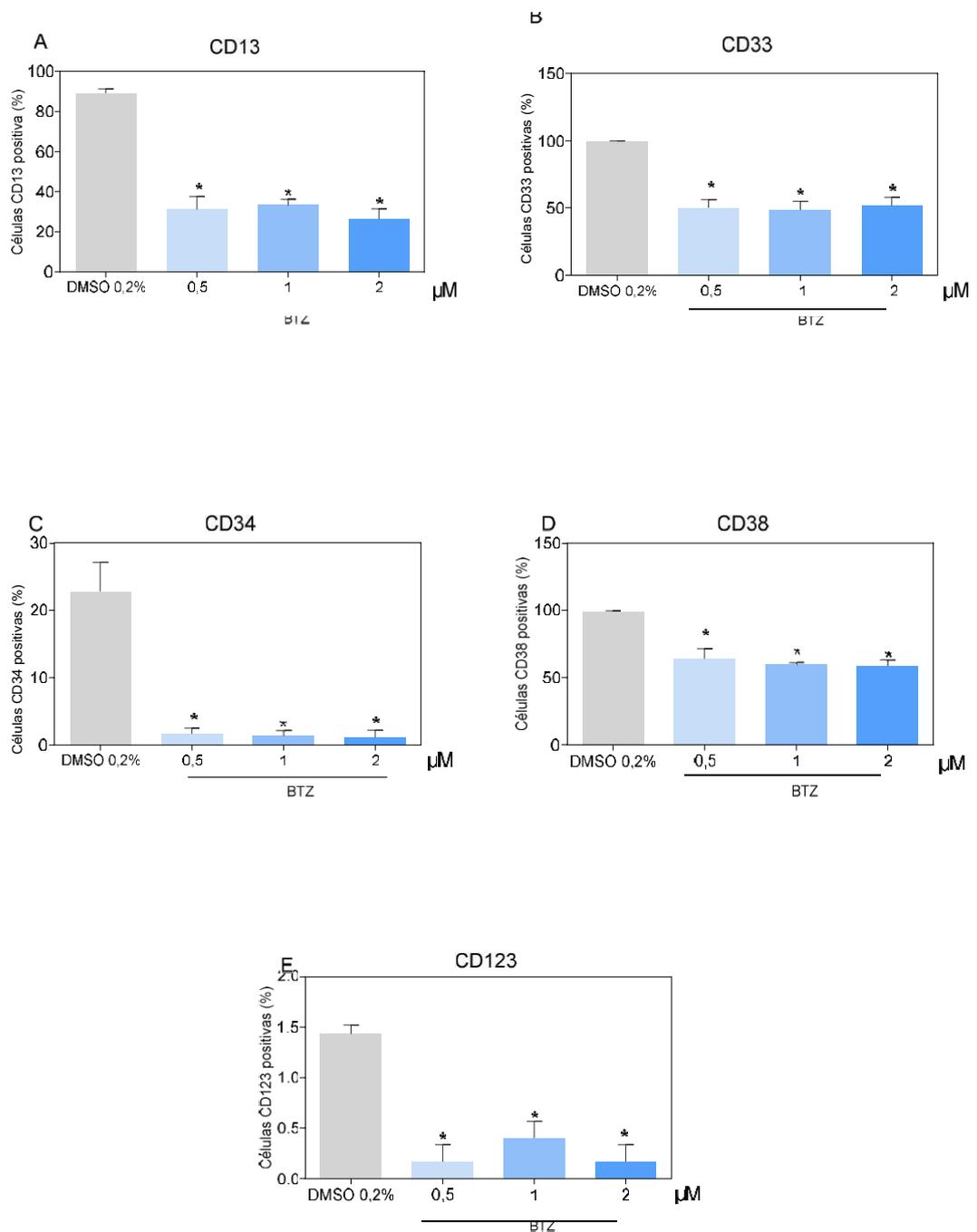


Figura 4. Efeito do BTZ sobre a viabilidade de células KG-1a após 48h de incubação determinado por citometria de fluxo. (A) anti-CD13 PE-CF594, anti-CD33 BV510, anti-CD34 PE, anti-CD38 BV421 e anti-CD123 BV605. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à 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.

5.3. BTZ induz morte celular apoptótica em células KG-1a

Após tratamento das células KG-1a com o BTZ foi possível observar que há um aumento estatisticamente significativo das células em apoptose. Os resultados mostram que no tempo de 12 horas, as células em apoptose passaram de 4,4% no DMSO 0,2% para 11,78 com o BTZ 0,5 μ M, 15,3% com o BTZ 1 μ M e 18,16 com o BTZ 2 μ M. Após 24h de tratamento, observa-se nas maiores concentrações um aumento estatisticamente significativo das células em apoptose correspondentes a 19,55 % BTZ 1 μ M e 20,24 % BTZ 2 μ M quando comparado com o 4,4% do controle DMSO 0,2%. Com 48 e 72h de tratamento, é possível observar que a morte celular é estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas quando se comparado ao controle negativo DMSO 0,2% (**Figura 5**).

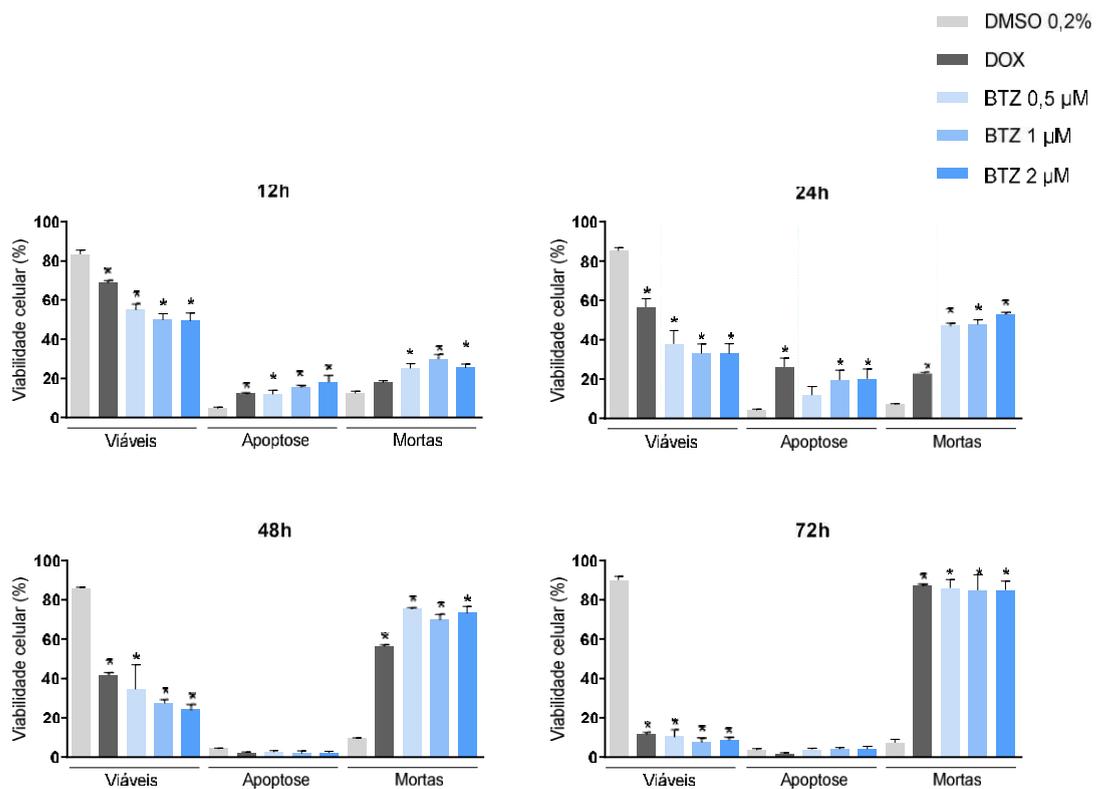


Figura 5. Efeito do BTZ sobre a morte de células KG-1a após 12, 24, 48 e 72 h de incubação realizado com citômetro de fluxo utilizando YO-PRO-1 e IP. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student-Newman-Keuls.

Adicionalmente, para melhor compreender o papel do BTZ na morte celular apoptótica, avaliamos o papel da proteína BCL2 associada ao agonista da morte celular (BAD). Para isso, foi utilizado as células BAD KO SV40 MEF e sua linhagem parental WT SV40 MEF. Os resultados demonstram que no tratamento com BTZ não houve diferença no número de células mortas nas linhagens BAD e WT (**Figura 6**).

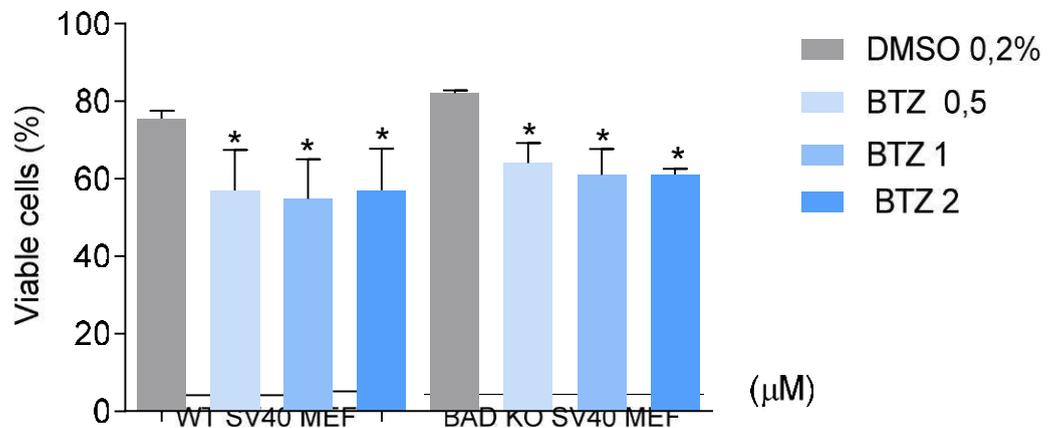


Figura 6. Efeito do BTZ sobre a morte de células WT SV 40 MEF e BAD KO SV 40 MEF realizados com 7AAD+YO-PRO após 48h de incubação por citometria de fluxo. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. Os valores correspondem à % de células viáveis de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls.

5.4. BTZ aumenta a expressão da atividade de Caspase-3 e PARP-1 clivada em células KG1a

A fim de confirmar os resultados obtidos no item anterior, avaliamos se a morte celular induzida por BTZ estava associada a apoptose, através da quantificação da Caspase-3 e PARP-1 clivada. Observamos após 24h tratamento das células KG-1a com o BTZ na concentração de 2 μM que houve aumento significativo da expressão de PARP-1 clivada (**Figura 7A**) e caspase-3 ativa (**Figura 7B**).

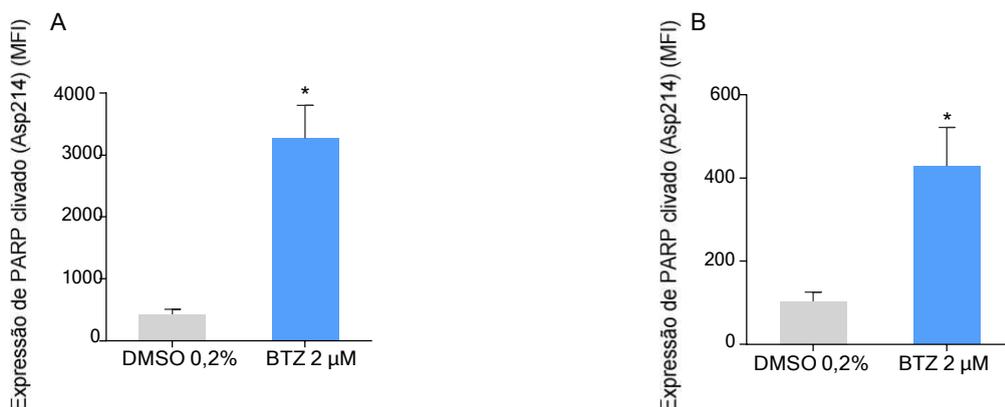


Figura 7. Efeito do BTZ sobre a atividade de caspase-3 (A) e PARP-1 (B) em células KG-1a após 24 h de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste DMSO 0,2%. Os valores correspondem à MFI (intensidade média da fluorescência) de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por teste t de Student.

Para confirmar a participação das caspases na morte celular foram utilizados inibidores de caspases. Utilizamos o inibidor Z-VAD-(OMe)-FMK para pré-tratamento das células 2 horas antes de incubar com o BTZ na maior concentração. Observa-se que ao utilizar o inibidor houve uma redução estatisticamente significativa do número de células apoptóticas, bem como o aumento da população de células viáveis, ou seja, a apoptose foi revertida pelo inibidor (**Figura 8**).

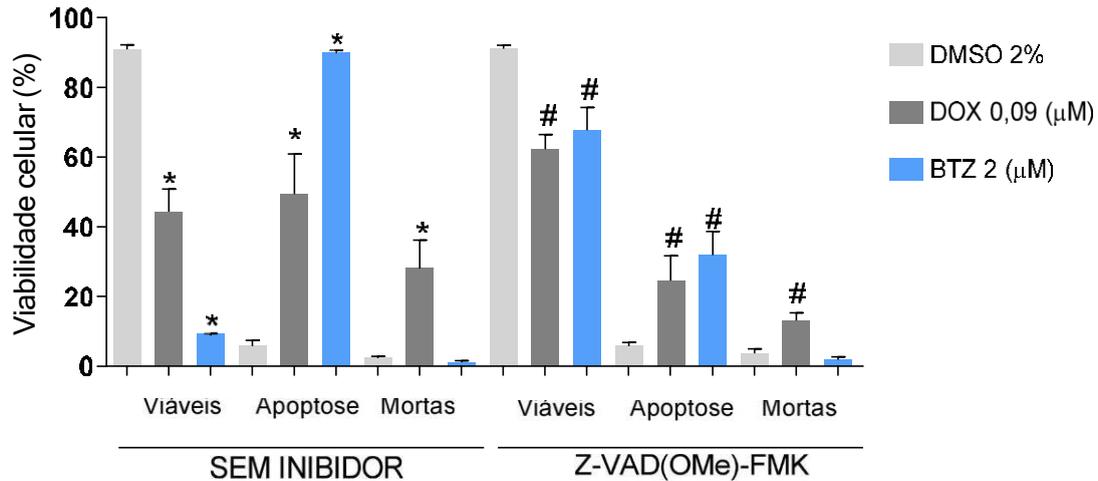


Figura 8. Efeito do BTZ no ensaio de reversão com inibidor de apoptose ZVAD. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste DMSO 02%. Doxorrubicina 1 µM foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média ± 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.

5.5. BTZ causa alterações no potencial transmembrânico mitocondrial

Os resultados demonstraram que após 24h de tratamento com o BTZ nas maiores concentrações, houve um aumento na perda do potencial transmembrânico das células KG-1a observado por fluorescência avaliada por citômetro de fluxo (**Figura 9**).

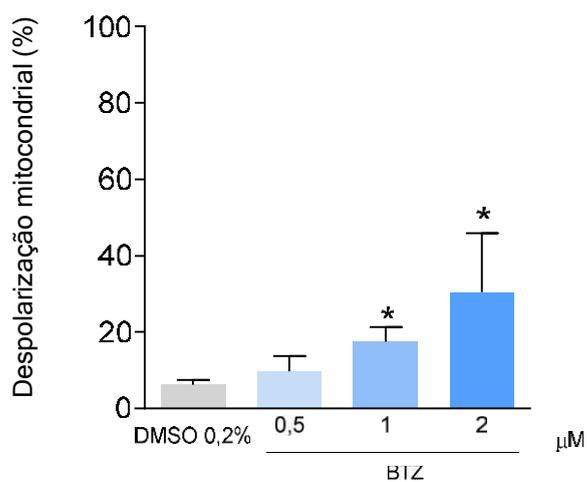


Figura 9. Efeito do BTZ da despolarização da membrana mitocondrial. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste DMSO 02%. Doxorrubicina 1 μM foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à MFI (intensidade média da fluorescência) 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.

5.6. BTZ aumenta os níveis de ERO

No presente estudo, observa-se que o BTZ aumentou significativamente os níveis de ERO após 24 horas de incubação quando comparado com o controle negativo (**Figura 10**).

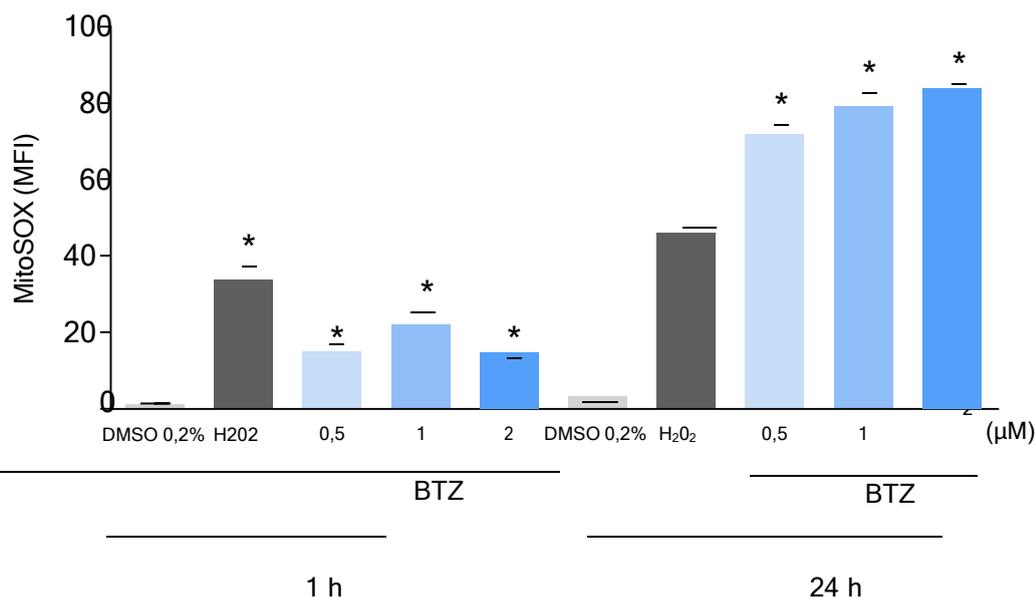


Figura 10. Efeito do BTZ sobre os níveis de ERO das células KG-1a determinadas por citometria de fluxo usando a coloração com MitoSOX™. DMSO 0,2% foi utilizado como controle negativo. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 μM) e a doxorrubicina (DOX, 1 μM) foram utilizados como controles positivos. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Foram avaliados dez mil eventos por experimento e os debris celulares foram omitidos na análise. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

A fim de confirmar se o efeito causado por BTZ estava realmente relacionado ao estresse oxidado em células KG-1a realizamos o ensaio de reversão com inibidor o farmacológico N-acetil-cisteína (NAC - Sigma-Aldrich Co). Nossos dados demonstram que o BTZ altera os níveis de ERO em células KG-1a, uma vez que as células que foram submetidas ao pré-tratamento com o inibidor NAC foram preservadas indicado assim que pré-tratamento reverteu levemente a apoptose induzida pelo BTZ (**Figura 11**).

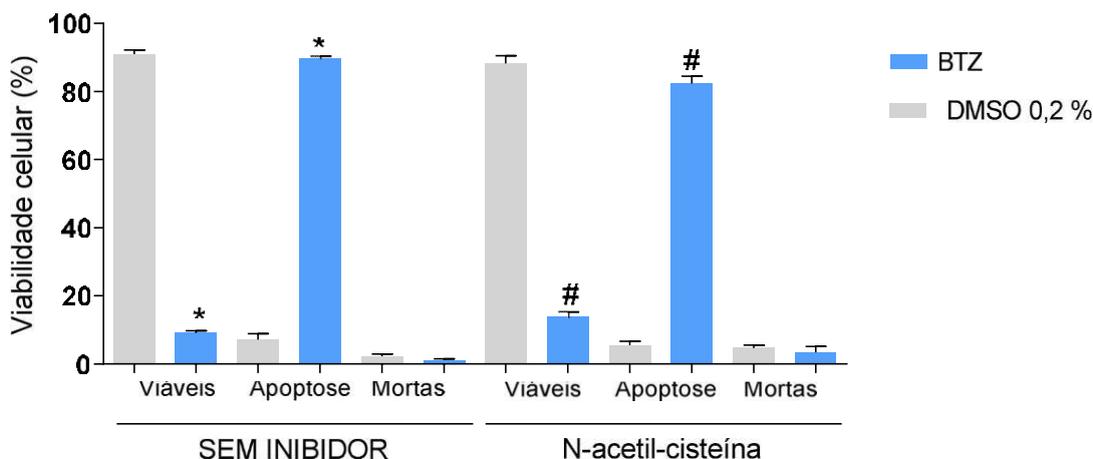


Figura 11. Efeito do BTZ no ensaio de reversão com inibidor de ERO (NAC). O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste DMSO 02%. Doxorrubicina 1 μ M foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à 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.

5.7. BTZ induz a fragmentação do DNA em células KG-1a.

Nossos resultados demonstraram que o BTZ induziu fragmentação internucleossômica do DNA após o período de 12 horas de incubação correspondente a 42,64% na concentração de 0,5 μ M, 49,92 na concentração de 1 μ M e 56,11% na concentração de 2 μ M. Após 24h de tratamento observa-se cerca de 48,36% na concentração de 0,5 μ M, 51,33% concentração de 1 μ M e 62,21% na concentração de 2 μ M de células com DNA fragmentado. Após o período de 48h de incubação observa-se fragmentação em torno de 75,24% na concentração de 0,5 μ M, 78,04% na concentração de 1 μ M e 80,73% na concentração de 2 μ M. Além disso, com 72h de incubação com o BTZ observa-se um aumento de células na fração sub-G0/G1 correspondente a 87,91% na concentração de 0,5 μ M, 87,74% na concentração de 1 μ M e 87,25 na concentração de 2 μ M (**Tabela 3**). Considerando como DNA fragmentado todo DNA de tamanho sub-diplóide (sub-G0/G1). Esses dados demonstraram que o BTZ induziu a fragmentação internucleossômica do DNA em todas as concentrações testadas. O mesmo pode ser observado com a doxorrubicina utilizada com controle positivo.

Tabela 3. Efeito do BTZ sobre o ciclo celular de KG-1a

Tratamento	Concentração (μ M)	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 1,64	37,95 \pm 4,18	14,56 \pm 0,81	12,48 \pm 1,70
Doxorrubicina	1	24,16 \pm 3,53*	24,77 \pm 3,60	13,28 \pm 1,40	20,41 \pm 3,30*
BTZ	0,5	45,26 \pm 5,27 *	17,08 \pm 2,03	5,81 \pm 1,59*	5,33 \pm 1,33
BTZ	1,0	54,17 \pm 3,65 *	17,41 \pm 5,16	5,65 \pm 1,57*	4,84 \pm 1,68
BTZ	2,0	60,22 \pm 3,50 *	17,46 \pm 6,08	2,92 \pm 0,82*	4,68 \pm 1,58
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*	7,56 \pm 2,65*
BTZ	0,5	48,36 \pm 10,52	9,38 \pm 2,18*	6,51 \pm 1,19*	3,22 \pm 0,82*
BTZ	1,0	51,33 \pm 7,84	9,38 \pm 3,34*	5,94 \pm 1,36*	3,47 \pm 0,83*
BTZ	2,0	53,30 \pm 8,63	5,91 \pm 1,05*	6,08 \pm 2,03*	2,78 \pm 0,29*
48 h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	14,57 \pm 2,85	46,54 \pm 3,09	14,02 \pm 0,93	12,90 \pm 0,65
Doxorrubicina	1	76,30 \pm 3,12*	8,17 \pm 2,24*	1,52 \pm 0,22*	3,13 \pm 1,18*
BTZ	0,5	75,28 \pm 2,34*	5,66 \pm 1,39*	2,65 \pm 0,59*	2,02 \pm 0,49*
BTZ	1,0	78,04 \pm 3,23*	5,65 \pm 1,02*	2,75 \pm 0,52*	2,20 \pm 0,85*
BTZ	2,0	80,73 \pm 1,97*	5,99 \pm 2,15*	1,36 \pm 0,21*	2,99 \pm 0,43*
72 h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	13,46 \pm 1,08	49,25 \pm 1,69	13,19 \pm 0,83	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*
BTZ	0,5	87,91 \pm 4,97*	1,61 \pm 0,53*	0,32 \pm 0,08*	1,21 \pm 0,55*
BTZ	1,0	87,75 \pm 4,73*	1,41 \pm 0,90*	0,25 \pm 0,09*	1,67 \pm 0,39*
BTZ	2,0	87,25 \pm 4,53*	1,72 \pm 0,64*	0,63 \pm 0,35*	1,15 \pm 0,26*

Tabela 3. A tabela apresenta os valores correspondentes a média \pm E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores respondem à 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.

5.8. BTZ causa efeitos na expressão gênica de células KG-1a

Investigamos o efeito causado pelo BTZ na expressão de alguns genes em células KG-1a. Os resultados demonstram que um total de 26 genes tiveram a expressão aumentada. Dentre eles os genes relacionados a vias de sinalização importantes no câncer NFKBIB (QR:2,21), RELA (QR:2,91), RELB (QR:7,31), APC, (QR:2,17), PTCH1 (QR:0,19), JAG1 (QR:2,79), JAG2 (QR:7,47), EGF (QR: 26,61), STAT1 (QR:2,45), STAT3 (QR:3,09), STAT5B (QR:2,53), AKT2 (QR:2,21) MTOR (QR:2,43), PIK3C2A (QR:2,02), SMAD2 (QR:2,17), SMAD7 (QR:3,07), PPARD (QR:2,00), PPARG (QR:9,98), genes relacionados ao estresse oxidativo GSTP1 (QR:2,10), TXNRD1 (QR:6,26), genes relacionados a apoptose BAD (QR:2,17), FAS (QR:4,93), MAP1LC3B (QR:5,53), SNAI1 (QR:11,86), VIM (QR:5,23), ZEB2 (QR:12,34). Os genes PTCH1 (QR: 0,19), FOXO1 (QR: 0,55), PARP1 (QR: 0,51), ATG3 (QR:0,56), SNAI3 (QR:0,25), TWIST1 (QR:0,16), que estão relacionados a outras vias de sinalização importantes no câncer, apoptose, autofagia e transição epitélio mesenquimal foram regulados negativamente após o tratamento com BTZ.

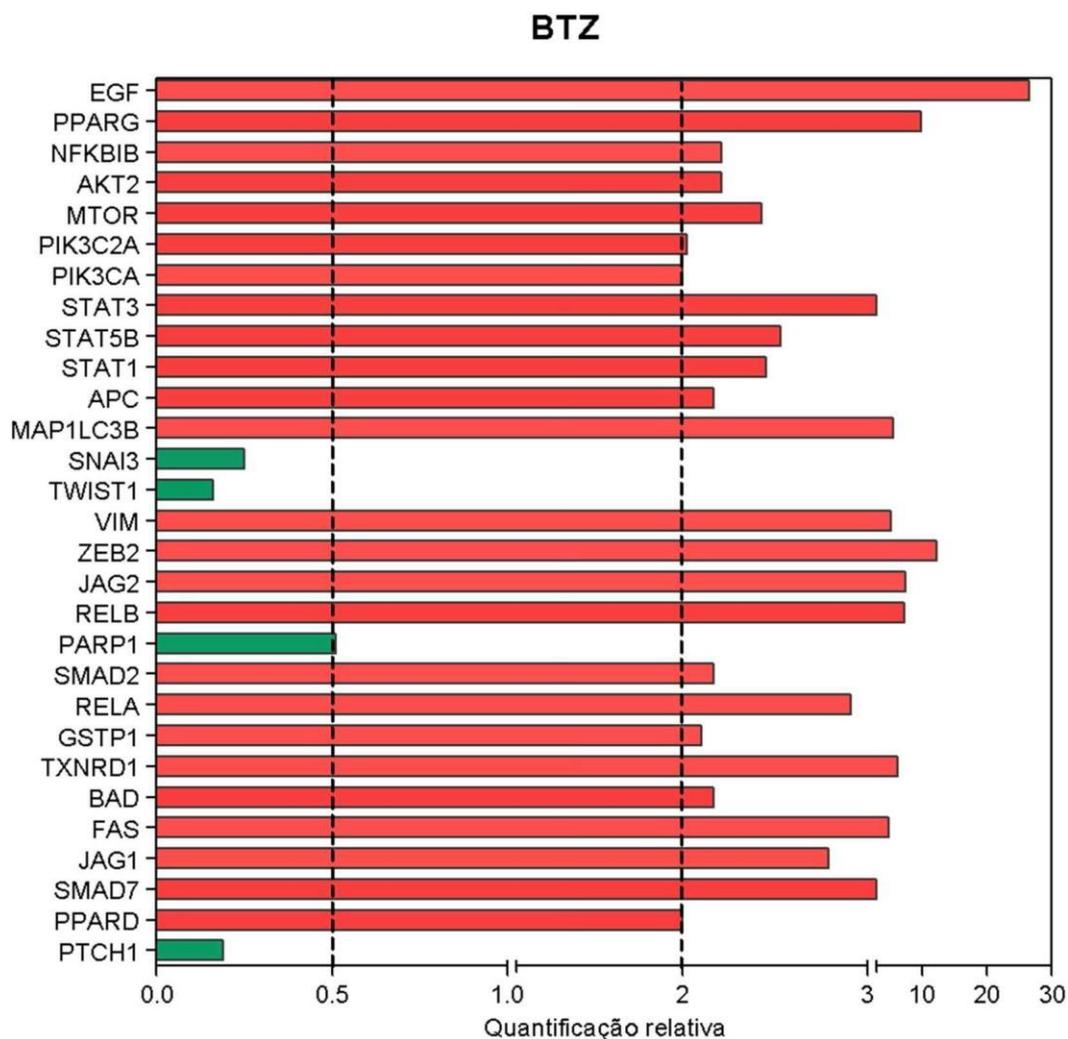


Figura 12. Efeito do BTZ na expressão gênica de célula KG1a. Os valores representam a quantificação relativa (RQ) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo). Os genes foram considerados regulados positivamente se $RQ \geq 2$ e foram considerados regulados negativamente se $RQ \leq 0,5$. WL. Não determinado (significa nenhuma expressão gênica).

5.9. BTZ reduziu a expressão de NF-κB p65 (pS536) em células KG1a

Após o tratamento com o BTZ na concentração de 2 μM observamos que não houve redução estatisticamente significativa na expressão de NF-κB pS529 (**Figura 13 A**) indicando que o BTZ não atua nesse sítio de fosforilação de NF-κB, entretanto houve redução estatisticamente significativa na expressão de NF-κBp65 (pS536) (**Figura 13 B**).

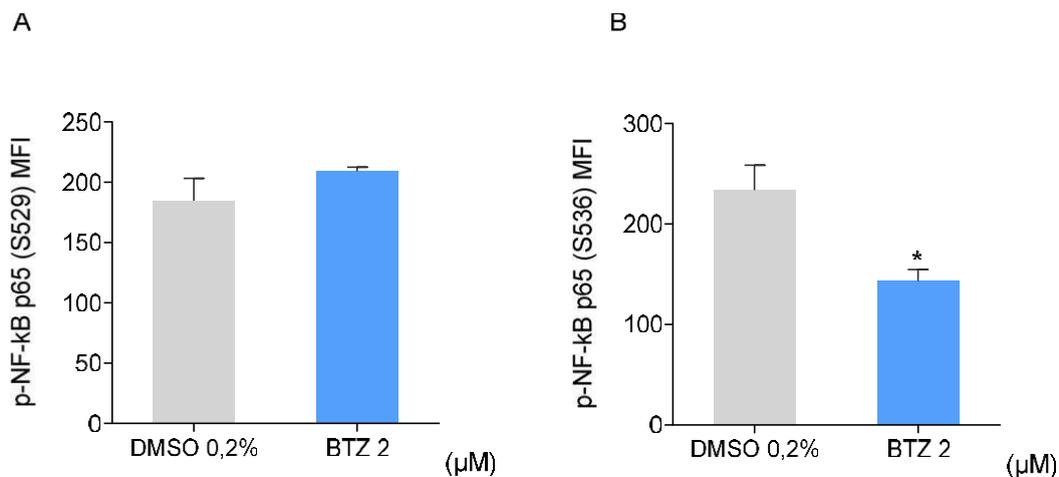


Figura 13. Efeito do BTZ sobre a expressão de NF-κB p65 (pS529) (A) e NF-κB p65 (pS536) (B) após 24h de incubação determinado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. *P < 0,05 quando comparado com o controle negativo por teste t de Student.

Paralelamente foi avaliado a expressão de NF-κB utilizando o anticorpo PE anti-NF-κB p65 por microscopia confocal após o tratamento por 6 horas com o BTZ. Nossos resultados mostram uma redução na marcação de NF-κB no núcleo e uma maior concentração no citoplasma quando comparado ao controle DMSO 0,2% (**Figura 14**).

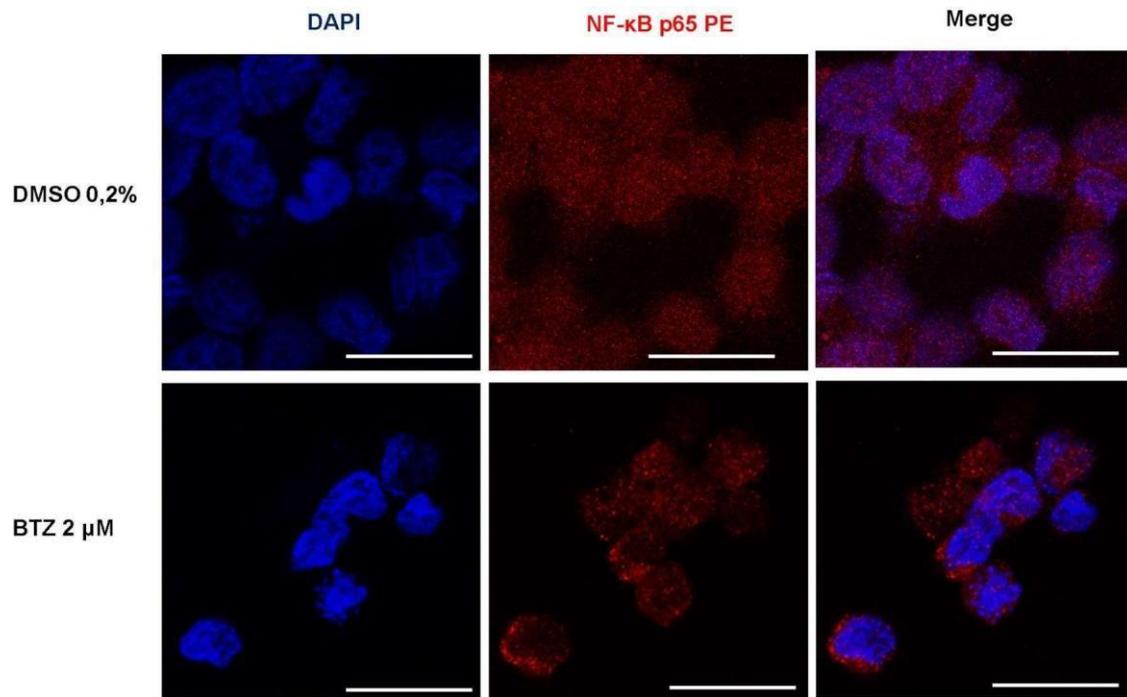
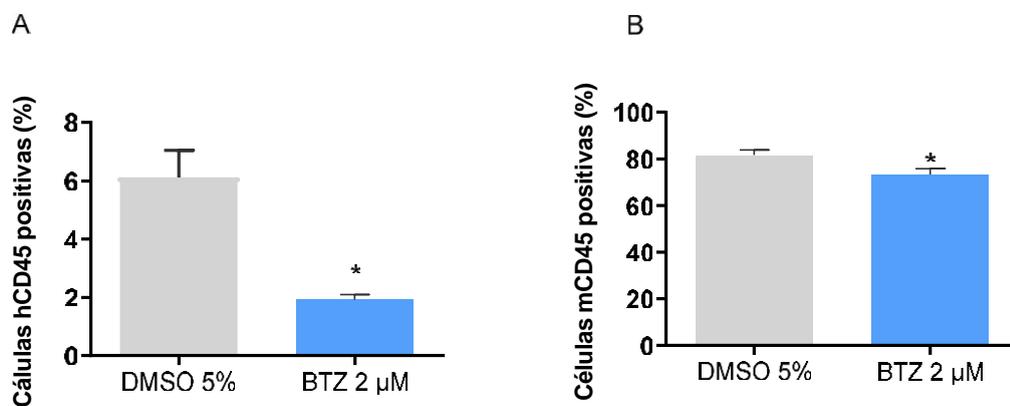


Figura 14. Microscopia Confocal de células KG-1a marcadas com anticorpo PE anti-NF- κ B p65 marcando em vermelho e DAPI (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific) marcando em azul. Imagem obtida através do microscópio confocal Zeiss na objetiva de 100x (barra = 20 μ m).

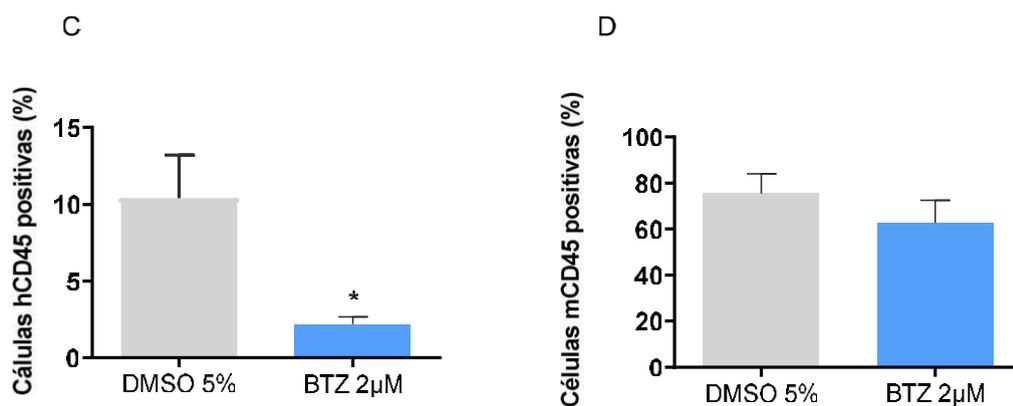
5.10. BTZ inibe o crescimento de células KG-1a em modelo *in vivo*

Na figura 15 pode-se observar uma redução significativa no percentual de células hCD45+ da medula óssea (**Figura 15**) (A) e sangue periférico (C) dos animais tratados com BTZ quando comparado ao controle negativo DMSO 5%. Não foi observado redução estatisticamente significativa nas células do baço (E). Além disso, a análise de mCD45 revela que o BTZ causou redução estatisticamente significativa no número de células mCD45 positivas na medula óssea (B), no entanto não foram evidenciadas diferenças estatísticas na redução das células mCD45 no baço e no sangue periférico (D e F).

Medula Ossea



Sangue



Baço

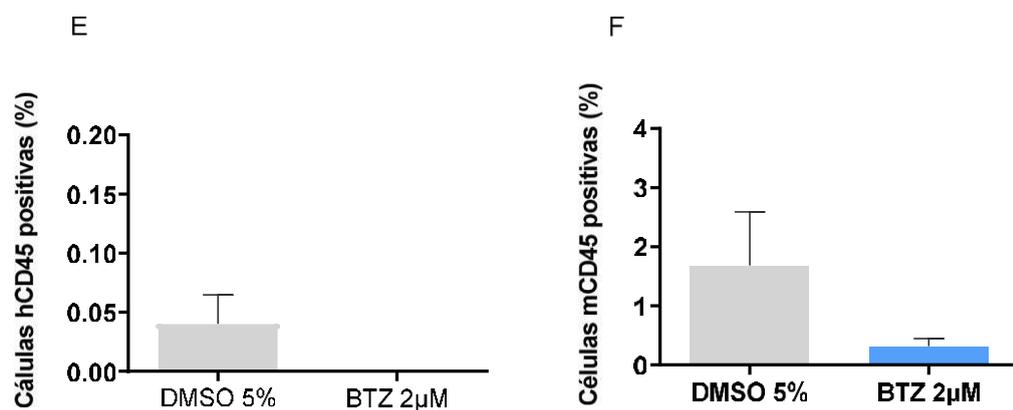


Figura 15. Efeito da atividade do BTZ em modelo in vivo em camundongos NSG inoculados com células KG-1a. Após coletadas as células foram marcadas com anticorpo anti-CD45-PE humano e anti-CD45-FITC de camundongo (Becton Dickinson). As figuras A e B mostram o percentual de células na medula óssea positivas para o anticorpo hCD45 e mCD45 respectivamente. As

figuras C e D mostram células do sangue periférico dos camundongos positivas para hCD45 e mCD45 respectivamente. As figuras E e F representam as marcações positivas no sangue da medula óssea dos camundongos para o anticorpo hCD45 e mCD45 respectivamente. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo por correlação estatística seguida por test-t.

Adicionalmente, realizamos análises histológicas e morfológicas dos órgãos que foram coletados dos animais. Nossos dados demonstram que após tratamento com BTZ houve uma leve redução do peso corporal de camundongos NSG inoculados com células KG-1a quando comparado com o controle negativo (**Tabela 4**). Não observamos diferenças de peso estatisticamente significativas entre os órgãos (fígado, pulmão, coração e rins), no entanto, observa-se uma redução de peso estatisticamente significativa no baço dos animais tratados com o BTZ quando comparado ao grupo controle (**Tabela 5**).

Tabela 4. Efeito do BTZ no peso dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a.

Grupos	Média de peso dos animais (g)	
	Peso Inicial	Peso Final
DMSO 5%	22 \pm 0,51	20,68 \pm 1,01
BTZ 0,01mg/kg	23,69 \pm 1,06	23,17 \pm 1,01

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

Tabela 5. Efeito do BTZ no peso dos órgãos dos camundongos NSG inoculados com células KG-1a.

Órgãos	Média de peso (g/100g de massa corpórea)	
	DMSO 5%	BTZ 0,1 mg/kg
Coração	0,46 \pm 0,03	0,50 \pm 0,28
Pulmão	0,74 \pm 0,03	0,69 \pm 0,02
Fígado	5,33 \pm 0,51	5,48 \pm 0,42
Rins	1,25 \pm 0,16	1,20 \pm 0,19
Baço	0,28 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02 *

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

Análise histológica dos órgãos

Os órgãos (coração, fígado, pulmão e rim) dos animais foram analisados histologicamente para uma melhor avaliação dos efeitos sistêmicos do BTZ nos animais tratados com este composto-teste. A Figura 15 apresenta as fotomicrografias representativas dos rins, pulmões e fígados.

Os corações dos grupos experimentais CTL e BTZ não apresentaram alterações arquiteturais e morfológicas.

Os fígados apresentaram alterações histopatológicas como hiperemia vascular, degeneração hidrópica dos hepatócitos e inflamação tecidual mista. Essas alterações variaram de discreta a moderada nos grupos experimentais CTL e BTZ. Ainda, áreas focais com hepatócitos em necrose de coagulação foram observadas. As arquiteturas do parênquima e do sistema porta variaram de preservada a parcialmente alterada nos grupos CTL e BTZ.

A arquitetura do parênquima pulmonar estava parcialmente alterada em todos os animais dos grupos CTL e BTZ. Essa alteração arquitetural estava principalmente relacionada ao espessamento dos septos alveolares com atelectasia do espaço aéreo, que variou de discreto a intenso. Além disso, outras alterações histológicas observadas foram hiperemia vascular, edema e inflamação com infiltrado predominantemente de células polimorfonucleares. Ainda, áreas focais de hemorragia, depósito de hemossiderina e fibrose foram observadas nos pulmões dos animais.

A arquitetura renal estava mantida no grupo CTL, mas variou de mantida a parcialmente alterada nos animais tratados com BTZ. As alterações histopatológicas observadas neste órgão foram hiperemia vascular moderada a intensa e hialinização glomerular discreta com diminuição do espaço urinário, sendo mais evidentes no grupo BTZ. Ainda, os animais apresentaram áreas focais de fibrose e células dos túbulos do córtex renal em necrose de coagulação foram observadas nos dois grupos experimentais. Áreas discretas de hemorragia foram observadas nos animais tratados com BTZ.

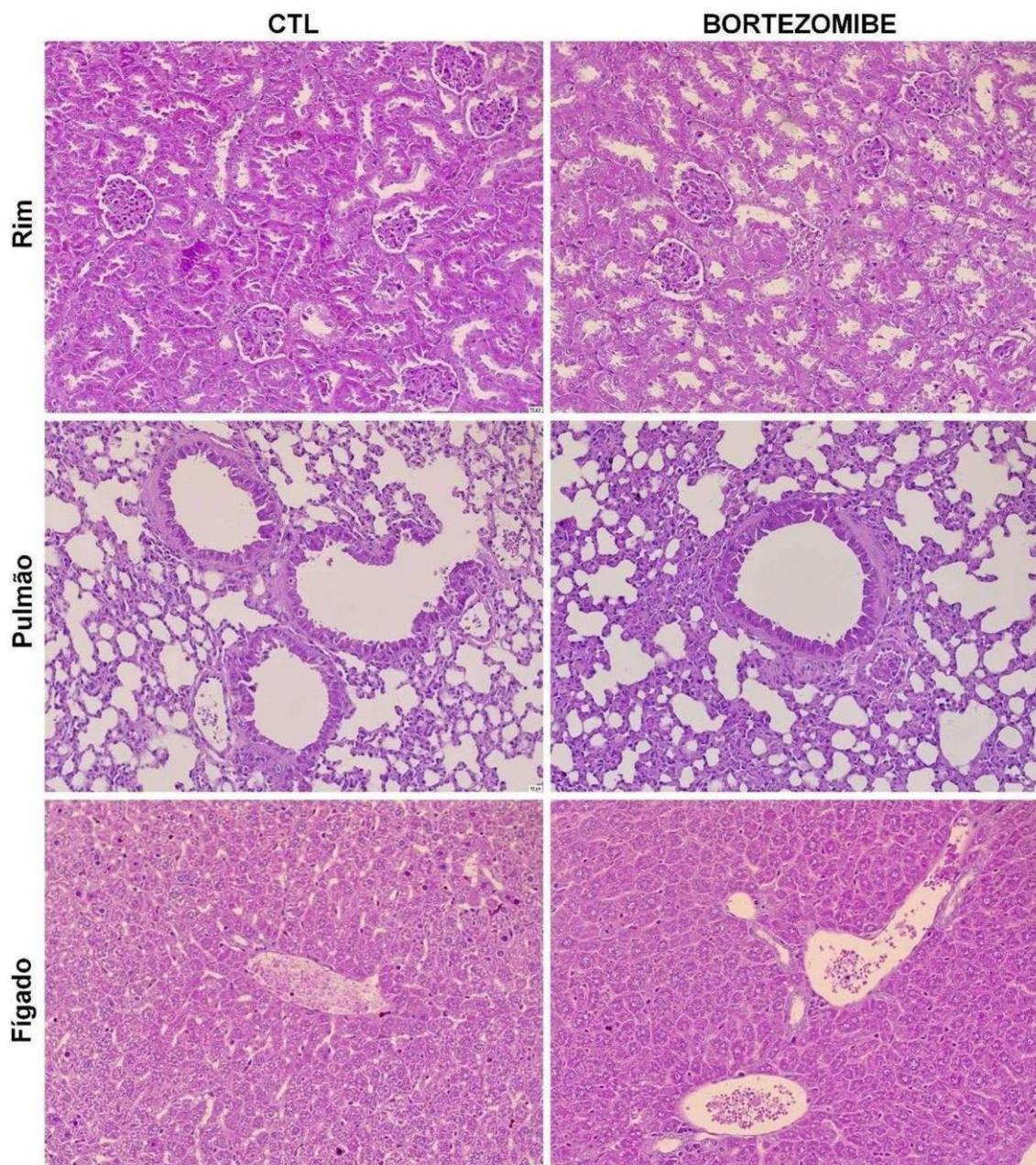


Figura 16. Fotomicrografias representativas dos órgãos de camundongos NOD. Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) transplantados com células de LMA (KG-1a) tratados com bortezomibe. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%), utilizado para solubilizar e diluir o composto-teste. Os animais foram tratados através da via intraperitoneal durante duas semanas.

6. DISCUSSÃO

Um dos principais problemas relacionados ao sucesso do tratamento da LMA é a alta capacidade das CTLs saírem do estágio de quiescência para proliferarem de maneira descontrolada, o que culmina na recidiva da doença. Por esse motivo, as propriedades biológicas de compostos que sejam capazes de eliminar as CTLs de LMA vem despertando bastante interesse no ramo farmacêutico. Nesse sentido, três inibidores de proteassoma, dentre eles o BTZ, recebeu destaque pela sua aprovação regulatória e demonstra uma eficácia terapêutica considerável em ambientes clínicos. Dessa forma, o BTZ vem sendo utilizado rotineiramente no tratamento de mieloma múltiplo, linfoma de células do manto (MCL) e amiloidose, devido aos seus efeitos antitumorais associados à inibição da atividade do proteassoma (IBRAHIM & EHRLICH, 2020). Na literatura, estudos sobre a ação do BTZ em CTLs de LMA ainda permanecem escassos. Aqui demonstramos a atividade antitumoral do BTZ frente a uma variedade de linhagens de células cancerosas e dentre elas as células LMA KG-1a, o qual apresenta células progenitoras CD34 positivas.

BTZ foi o primeiro inibidor de proteassoma aprovado pela FDA para uso clínico em mieloma múltiplo (IBRAHIM & EHRLICH, 2020). Atualmente é um fármaco já aprovado para a terapia do linfoma de células do manto em pacientes adultos que receberam pelo menos um outro tipo de tratamento e em casos de MM. Apesar de ter apresentado uma maior atividade em MM e a maioria dos estudos serem voltados para esse tipo de doença, o BTZ também já demonstrou citotoxicidade em outras doenças das células plasmáticas e linfomas não-Hodgkin e atuou contra algumas malignidades hematológicas. Em testes de ensaios clínicos com pacientes com linfoma de células do manto, por exemplo, incluindo os pacientes que receberam terapia prévia de alta intensidade, o BTZ também mostrou grande eficácia. Assim, esse fármaco vem sendo amplamente estudado no tratamento de outros tipos de câncer (TAN et al., 2019; NCI, 2020).

No presente estudo, inicialmente, o ensaio de citotoxicidade demonstrou que várias linhagens de células cancerosas são sensíveis ao BTZ. Alguns trabalhos já vêm destacando a ação do BTZ frente a algumas linhagens tumorais. ZHOU et al., 2022, após avaliar a atividade do BTZ em quatro linhagens de câncer de cabeça e pescoço observou que o fármaco exibiu

sensibilidade promissora em duas das linhagens testadas com valores de CI_{50} referentes a 3,97nM e 3,66nM nas linhagens UMSCC-17A e UMSCC-17B, respectivamente (ZHOU et al., 2022). BTZ também exibiu citotoxicidade e uma excelente capacidade antitumoral em câncer de vesícula biliar (CHEN et al., 2022). Em células de LMA Nomo-1 e Kasumi-1, o BTZ mostrou sensibilidade ao reduzir o crescimento e a viabilidade celular com valores de CI_{50} variando entre 9,6 nM e 4,2 nM, respectivamente, apresentando uma maior sensibilidade às células Kasumi-1 (STORY et al., 2021). O BTZ também se mostrou promissor em ensaios com as linhagens MV4-11 e THP1 ao inibir a proliferação celular exibindo valores de CI_{50} equivalentes a 0,08 μ M e 0,12 μ M, respectivamente (ZHOU et al., 2021). Ainda corroborando com nossos achados sobre citotoxicidade o tratamento com BTZ isoladamente ou combinado com o dasatinib reduziu significativamente a viabilidade das células TOM-1 (IC_{50} de 5nM) e BV-173 (IC_{50} de 5nM) (MALETZKE et al., 2022).

Embora se tenha estudos sobre ação do BTZ em diferentes linhagens cancerosas, a literatura ainda carece de pesquisas sobre a atividade do BTZ em células de LMA. Os resultados obtidos pelo nosso teste de citotoxicidade revelam além do efeito do BTZ nas diferentes linhagens testadas a sua capacidade em reduzir a população de células KG1a, onde o BTZ exibiu um valor de CI_{50} correspondente 0,06 μ M, sendo considerado promissor. A linhagem celular KG-1a é um dos tipos de linhagens de LMA caracterizada por expressarem perfis que contêm CD34+ (perfis de CTLs) e por isso, são normalmente utilizadas em estudos de CTLs (TAN et al., 2019). Desta forma, essa linhagem foi selecionada para o estudo dos mecanismos de ação do BTZ.

Com o ensaio de azul de tripam em células KG-1a, confirmamos a ação do BTZ em reduzir a viabilidade celular sugerindo assim a sua atividade promissora na redução da viabilidade. Estudos apontam que o BTZ já demonstrou atividade promissora contra doenças malignas das células linfoides em crianças tratadas para leucemia linfoblástica aguda recorrente (LLA) sugerindo que a inclusão de BTZ à quimioterapia de indução parece seguro e bem tolerado em pacientes infantis com LLA recidivante (HASEGAWA et al., 2019). August e colaboradores (2020), em um estudo com crianças com LLA recidiva ou refratária demonstraram que a adição de BTZ à quimioterapia de reindução produziu uma resposta completa na maioria dos casos e não induziu

a toxicidade excessiva para células normais (AUGUST et al., 2020). Apesar do sucesso dos inibidores de proteassoma para o tratamento de neoplasias hematopoiéticas, incluindo leucemia, o estudo sobre a sua atividade e eficácia ainda é bastante limitada em LMA principalmente focando nas CTL. Aqui demonstramos o efeito do BTZ e a sua capacidade de reduzir a viabilidade de CTL de LMA.

Atualmente o BTZ está disponível para administração subcutânea e intravenosa e seu mecanismo de ação consiste em inibir ação do tipo quimotripsina do núcleo proteolítico do proteassoma 26S interrompendo o ciclo celular e causando morte por apoptose (TAN et al., 2019). Os proteassomas são proteases responsáveis por degradar as proteínas intracelulares que estão danificadas ou apresentam erros de síntese. Como já citado, uma das características das células cancerosas é a sua instabilidade genética e alta capacidade de proliferação em comparação com as células normais o que as tornam mais dependentes da função do sistema de proteassoma. Nesse aspecto, os inibidores de proteassoma vem recebendo destaque por ser um alvo inovador para a terapia do câncer (MAHMOUDIAN et al., 2021).

A inibição do proteassoma 26S impede a proteólise e afeta diversos sinais de cascata celular, acarretando na interrupção do ciclo celular, apoptose e inibição da angiogênese levando assim a morte de células tumorais (NCI, 2020). Entretanto, ainda não está claro a ação do BTZ em impedir a auto-renovação de CTLs de LMA bem como o desenvolvimento da leucemogênese. Nesse sentido, reconhecendo a atividade promissora do BTZ e tendo como base o seu mecanismo de ação em outros tipos de cânceres buscamos investigar os a ação exercida por este fármaco em CTLs de KG-1a.

Avaliamos o efeito do BTZ na viabilidade das CTL utilizando os marcadores mieloides CD13, CD33 para caracterizar as células leucêmicas e os CD123, CD34 e CD38 foram também utilizados para detectar o fenótipo CTLs original. Esses marcadores já são relatados como específicos para identificação de CTLs (MOHD et al., 2023). Nossos dados demonstram que o BTZ causou uma redução significativa da população de células CD34, CD13, CD33, CD38 e CD123 viáveis. Corroborando com nossos achados, Zhou e colaboradores, 2021, avaliaram a capacidade do BTZ em inibir a atividade das células progenitoras leucêmicas em células MV4-11 e THP1 e também observaram

redução da viabilidade celular (ZHOU et al., 2021).

É importante ressaltar que os pacientes que apresentam maior proporção de células CD34+ CD38- possuem uma sobrevida livre de recidiva significativamente pior do que pacientes com menor proporção dessas células. Sobretudo, tendo em vista que as CTLs contribuem para doença residual mínima (DRM), esses pacientes inevitavelmente possuem uma predisposição relativamente alta de DRM. Ultimamente alguns quimioterápicos já foram descritos por terem ação nos blastos leucêmicos, no entanto, nenhum desses quimioterápicos utilizados rotineiramente na terapia antileucêmica conseguem eliminar as CTLs.

Nos blastos de LMA, CD123 é aberrantemente expresso em CD34+/CD38- e já foi detectado em cerca de 75% da LMA, diferentemente do encontrado nas CTH e progenitoras normais (SUGITA et al., 2022; PELOSI et al., 2023). Estudos já demonstraram que o CD123 é expresso tanto nas CTLs quanto em blastos leucêmicos mais diferenciados e a sua elevada expressão nos blastos leucêmicos se relaciona com um mau prognóstico da doença (TESTA et al., 2002; TESTA et al., 2019). Arai et al. (2019) demonstraram que a expressão de CD123 nos blastos de LMA está associada com a dificuldade na resposta à quimioterapia de indução inicial e sobrevida global. Assim, CD123, é um alvo atraente para o tratamento LMA e alguns compostos vem sendo testados. O SL-401 (toxina da difteria geneticamente modificada fundida com interleucina-3), por exemplo, foi testado por Mani e colaboradores 2019, como agente de direcionamento de CD133 em pacientes com LMA. Eles observaram uma indução potente da citotoxicidade contra LMA uma vez que o composto foi capaz de atuar tanto nas células CD123+ quanto nos blastos de síndrome mielodisplásica (MANI et al., 2018). Diferentes agentes terapêuticos direcionados contra CD123 vêm sendo avaliados para o tratamento de LMA. Nós relatamos aqui o efeito do BTZ em reduzir a população de células CD133 positivas.

Em um estudo com diferentes células de LMA dentre elas a linhagem KG-1a, Mohd e colaboradores encontraram elevada expressão dos marcadores mielóides CD13 e CD33 (MOHD et al., 2023). HE et al., 2020 também detectou uma alta porcentagem de células CD13+ na população de CTLs de LMA, diferentemente do encontrado na medula óssea de doadores normais (HE et al.,

2020). Ao analisar a expressão de algumas proteínas de superfície celular de seis antígenos que normalmente estão associados a CTL de LMA no diagnóstico inicial e na recidiva Haubner e colaboradores 2019, e observou que no diagnóstico inicial, as células da maioria dos pacientes eram positivas para CD33 correspondendo a 96,4% e na recidiva 98,1%, demonstrando assim que esse fenótipo está altamente expresso nas células de LMA (Haubner et al., 2019). Desta maneira, tendo em vista que esses fenótipos estão superexpressos nas CTL de LMA, o estudo de drogas que atuem sobre eles surge como uma estratégia promissora para um melhor direcionamento terapêutico.

Nesse sentido, considerando que os fenótipos, CD123, CD13, CD33, CD38, CD34, combinam antígenos para detecção da DRM (ZONG et al., 2022), podemos compreender que o desenvolvimento de terapias-alvo utilizando anticorpos monoclonais é de grande importância e ultimamente tem se mostrado efetivo na prática clínica (GAUTHIER et al., 2023). Além disso, partindo do pressuposto que as CTLs desempenham um papel crítico da recidiva da LMA, o estudo para o desenvolvimento de novas terapias alvo para as CTLs se faz necessário e esses marcadores de células tronco oferecem uma proposta interessante para o direcionamento terapêutico.

Embora na literatura já se encontre alguns estudos sobre compostos que atuem nas CTLs de LMA, notavelmente, somos os primeiros a estudar sobre o efeito causado pelo BTZ nesse tipo de linhagem. Diante disso, os nossos resultados obtidos mostram que o BTZ pode servir como uma importante ferramenta para eliminar as CTLs tendo como alvo os marcadores acima citados onde o fármaco exerceu efeito ao reduzir a população de células viáveis.

A inibição do proteassoma induz morte celular apoptótica uma vez que leva ao acúmulo de proteínas mal dobradas e ubiquitiladas o que consequentemente possibilita a degradação de fatores pró-apoptóticos. A principal característica dos inibidores proteassomais é a sua capacidade de interromper diferentes vias de sinalização celular e atuar no microambiente da medula óssea. Além disso, alguns estudos já demonstraram que esses inibidores são capazes de inibição da progressão do ciclo celular, angiogênese, proliferação celular e induzir morte celular apoptótica (TAN et al., 2019).

Investigamos a morte celular por apoptose induzida pelo BTZ em células KG-1a a partir da avaliação da ativação de caspase-3 e clivagem de PARP1. A

proteína PARP1 desempenha um papel muito importante na morte celular por apoptose sendo considerada como um alvo terapêutico em alguns tipos de câncer (LU et al., 2022). Nossos resultados demonstram que o BTZ induziu aumento significativo na ativação da caspase-3 e PARP clivada nas células KG-1a tratadas na concentração de 2 μ M. Em conformidade com nosso achado um estudo avaliou a citotoxicidade do BTZ em combinação com daunorrubicina em linhagens de células de leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) e demonstraram que o co-tratamento com BTZ e daunorrubicina aumentou significativamente a ativação da caspase- 3, -8 e -9 (DU et al., 2017). Em células de MM o tratamento combinado de BTZ com MPT0G413 também causou aumentos consideráveis nos níveis de PARP clivada e caspase-3 (HUANG et al., 2019) sugerindo morte celular por apoptose.

De acordo com nossos resultados podemos sugerir que o mecanismo de ação do BTZ em células KG-1a afeta eventos que interferem na morte celular por meio da ativação das caspases-3, alterando a expressão da proteína PARP clivada. Ainda corroborando com os nossos achados, Maletzke e colaboradores, 2022 detectaram a clivagem de PARP e um aumento da sua expressão em algumas linhagens de células de LLA que foram submetidas ao tratamento com inibidores de proteassoma e dentre eles o BTZ, sustentado a ideia de que os inibidores proteassomais induzem morte por apoptose em LLA (MALETZKE et al., 2022).

Sabe-se que a mitocôndria é uma organela que além de suas múltiplas funções metabólicas exerce papel central na regulação da morte celular apoptótica, isto porque, após a indução de apoptose a membrana externa mitocondrial se torna permeável induzindo a célula à morte. Esse processo envolve a liberação de citocromo C das mitocôndrias e conseqüentemente a ativação da caspase (BOCK & TAIT, 2020). A fim de confirmar a morte celular apoptótica, avaliamos a despolarização da membrana mitocondrial. Nossos resultados demonstraram que o BTZ foi capaz de reduzir o potencial de membrana nas células KG-1a, característica de morte por apoptose. Além disso, ensaio de reversão com inibidor de apoptose ZVAD mostrou que o tratamento com o inibidor preveniu a apoptose induzida pelo BTZ sugerindo que o BTZ induz morte celular apoptótica envolvendo a participação de caspases.

A fim de elucidar a consistência dos dados obtidos anteriormente sobre morte apoptótica induzida pelo BTZ em células KG-1a, realizamos o ensaio com YOPRO-1 e IP. Nossos resultados reportam que BTZ reduziu as células viáveis e induziu um aumento significativo nas células em apoptose, sugerindo que esse pode ser um mecanismo de morte induzida pelo BTZ em células KG-1a. Consistente com nossos achados, Maletzke et al.,2022 em um ensaio com células de linhagem de LLC, BV-173, observou que o BTZ induziu morte por apoptose em 84,1% deixando apenas 13,2% de células viáveis mostrando assim que o tratamento com inibidores de proteassoma induziu apoptose em células de LLA (MALETZKE et al.,2022). O BTZ também induziu morte celular por apoptose em células de LMA MV4-11 e THP1 (ZHOU et al., 2021).

Atualmente as ERO são conhecidas como subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbio sendo reconhecidas por regular a sinalização da célula, por este motivo é importante se manter os níveis de ERO para preservar capacidade de auto-renovação das CTHs. Por outro lado, as CTLs também exibem baixos níveis de ERO, porém, diferente das CTH elas necessitam de oxigênio para satisfazer suas necessidades energéticas metabólicas através da respiração mitocondrial. Em contrapartida, os blastos leucêmicos possuem elevados níveis de ERO que lhes possibilitam a capacidade de renovação. Sendo assim, diversos estudos sustentam a ideia da importância da sinalização redox na regulação da diferenciação celular, levando em consideração a hematopoese (ROMO-GONZÁLEZ et al., 2022).

Dessa forma, compostos capazes de induzir estresse oxidativo tem sido fortemente implicado no direcionamento de CTLs, isto porque o aumento da oxidação embora por si só não seja suficiente para o tratamento da LMA está associado à auto-renovação reduzida que consequentemente induzirá a diferenciação ou morte das células hematopoiéticas (MPAKOU et al., 2021).

A literatura mostra que as células cancerosas exibem níveis elevados de estresse oxidativo em comparação às células normais (GALADARI et al., 2017) e já é descrito também que a inibição do proteassoma aumenta os níveis de ERO (CORRALES-MEDINA et al 2015). Sendo assim, avaliamos os níveis de ERO em células KG-1a tratadas com o BTZ.

Em nosso trabalho, observou-se um aumento da expressão de superóxido mitocondrial após o tratamento com BTZ em células KG-1a. Mpakou e

colaboradores investigaram a capacidade do BTZ de sensibilizar células de LMA para a decitabina em termos de viabilidade celular e diferenciação e demonstraram que o BTZ em tratamento combinado com a decitabina apresentou atividade sinérgica sendo capaz de produzir estresse oxidativo, que induz à inibição do crescimento em células de LMA Kasumi-1 (MPAKOU et al., 2021).

Adicionalmente, realizamos o ensaio de reversão com inibidores farmacológicos para confirmar os resultados obtidos com o experimento anterior. Observamos que o inibidor reverteu a produção de ERO induzida pelo BTZ reforçando que o BTZ realmente aumenta os níveis de ERO conforme demonstrado em experimento anterior. Corroborando com os nossos achados, o tratamento com BTZ em células de leucemia e linfoma humano de diferentes origens demonstrou morte celular associada ao aumento da geração de ERO (GODA et al., 2015). Em combinação com o ácido hidroxâmico suberoylanilida (SAHA), o BTZ foi testado em carcinoma de nasofaringe (NPC) e semelhante aos nossos achados foi observado um aumento na produção de ERO. Além disso, ao utilizar o sequestrador de ROS, N-acetilcisteína foi observado uma redução nos efeitos apoptóticos do bortezomib/SAHA, enquanto o inibidor de caspase Z-VAD-FMK suprimiu significativamente a apoptose sem diminuir a geração de ERO (HUI et al., 2013).

Levando em consideração que as ERO exercem papéis importantes sinalização celular no câncer, compostos capazes de induzir estresse oxidativos tem sido fortemente implicado no direcionamento de CTLs, isto porque o aumento da oxidação embora por si só não seja suficiente para o tratamento da LMA está associado à auto-renovação reduzida que conseqüentemente induzirá a diferenciação morte das células hematopoiéticas (MPAKOU et al., 2021).

Já é compreendido que na morte por apoptose a célula passa por uma cascata de eventos bioquímicos que leva a alterações morfológicas que incluem a retração, perda de aderência com a matriz extracelular, branqueamento de membranas, condensação da cromatina, encolhimento citoplasmático, formação de corpos apoptóticos (pequenas vesículas) além de fragmentação do DNA (GALLUZZI et al., 2018; CHEHADE et al., 2021).

Sabe-se a via do proteassoma está vinculada na regulação do ciclo celular e apoptose por meio da manutenção do equilíbrio de diferentes proteínas

reguladoras com destaque para as como ciclinas, as proteínas oncogênicas e supressoras tumorais bem como os fatores de transcrição gênica (ZHANG et al., 2020). Analisamos a distribuição do ciclo celular em células KG-1a e observamos que o tratamento com BTZ com todas as concentrações testadas, induziu fragmentação no DNA, demonstrado pelo maior percentual de células na fração sub G0/G1. Nossos dados sugerem que o BTZ induz morte celular com fragmentação do DNA internucleosomal. Corroborando com nossos achados, o BTZ também induziu aumento de sub-G0/G1 em células de carcinoma de pulmão A549 (WANG et al., 2022). Em combinação com chidamida, o BTZ também aumentou o percentual de células em sub-G0/G1 em células MGC-803 e BGC-823, indicando apoptose (ZHANG et al., 2020). Barbosa e colaboradores 2019, avaliaram o efeito do BTZ em combinação com o inibidor MK-1775 no ciclo celular das células de MM também observaram aumento de células na fração sub-G0/G1 (BARBOSA et al., 2019).

Alguns estudos têm demonstrado em algumas linhagens cancerosas que inibidores proteassomal inibem a degradação de proteínas alvo reguladoras do ciclo celular regulando a sua progressão. No entanto, ainda há pouquíssimos relatos sobre o efeito do BTZ no ciclo celular das células de LMA. Aqui relatamos que o BTZ induz fragmentação no DNA de células KG-1a, confirmando nossos resultados anteriores sobre a morte celular por apoptose induzida pelo BTZ.

Levando em consideração que alterações genéticas estão associadas com a sucessão e eventos que ocorrem nas células cancerosas fizemos a análise da expressão gênica que revelou que o BTZ exerce efeito sobre a expressão de alguns genes que fazem parte das vias NF- κ B, WNT/ β -catenin, NOTCH, EGFR, JAK/STAT, PI3K/AKT/MTOR, TGF-beta/SMAD, PPAR, além dos genes que estão associados com estresse oxidativo, apoptose e transição epitélio mesenquimal. Nossa análise revelou que o BTZ atua aumentando ou diminuindo a expressão dos genes acima citados.

Tendo em vista que essas vias estão associadas ao desenvolvimento tumoral, estudá-las é de grande importância para o desenvolvimento de novas terapias anti LMA. Um estudo demonstrou que genes da via JAK / STAT tiveram a sua expressão reduzida após o tratamento com BTZ em combinação com o ruxolitinibe sugerindo que a inibição de JAK pode ser uma estratégia terapêutica para o tratamento de MM (DE OLIVEIRA et al., 2017). O BTZ exibiu efeito na

proliferação e apoptose de células de mieloma por meio da ativação da via de sinalização Wnt / β -catenina demonstrando que o composto pode reduzir o nível de expressão das proteínas relacionadas com a via de sinalização bem como inibir a proliferação celular e acelerar a apoptose (DAI et al., 2020). Já foi relatado que certos pacientes com leucemia de células T do adulto a sinalização Notch-1 juntamente com a ativação constitutiva da via do fator nuclear- κ B se mantiveram aumentadas e que o BTZ em combinação com romidepsina teve a sua eficácia aumentada no bloqueio da via Notch-1 (YU et. al. 2015).

Curiosamente nossos dados revelam que o BTZ exerce ação codificando o inibidor *NFKB1B*. Assim, os dados demonstraram que o BTZ supostamente induz morte celular pela regulação positiva de NFKB1B (NF-Kappa-B Inibidor Beta), que se trata de um gene inibidor da via NF- κ B. Já é descrito que NF- κ B é constitutivamente ativo na LMA e que está associado com a capacidade das células leucêmicas proliferarem-se e resistirem aos mecanismos de morte celular programada (RODRIGUES et al.,2021). O BTZ já é conhecido por inibir fator nuclear interferindo assim com a sobrevivência celular mediada por NF- κ B, o crescimento do tumor e a angiogênese (NCI, 2020). Baseando-se nesses pressupostos, e nos resultados obtidos pelo ensaio de expressão gênica, avaliamos os níveis de expressão de NF κ B em células KG1a tratadas com BTZ. Nossos dados demonstraram o BTZ foi capaz de reduzir a expressão de NF- κ B p65(pS536) sugerindo assim que o composto atua nesse sítio de fosforilação da via NF- κ B. Corroborando com nossos achados, ROBAK & ROBAK 2019, já demonstraram que a ação antineoplásica do BTZ se dá principalmente por meio da inibição do fator nuclear κ B onde se encontra componentes da via associados à proliferação celular, apoptose e angiogênese. (ROBAK & ROBAK, 2019).

Um estudo demonstrou a expressão aumentada de NF- κ B em amostras de medula óssea de 103 pacientes com LMA, constatando que a expressão estava aumentada em 80,5% (83 de 103) desses pacientes com LMA sugerindo assim que esse fator nuclear desempenha um papel fundamental na sobrevivência de células leucêmicas (DARWISH et al., 2019). Já foi relatado que NF- κ B é constitutivamente ativado em CTLs de LMA (GUZMAN et al., 2001) e quando ativado constitutivamente pode ativar transcricionalmente os genes Bcl-2 e Bcl-XL (fatores anti-apoptóticos/pró-sobrevivência), e assim proteger as células tumorais de estímulos apoptóticos associados a vários agentes

quimioterápicos (DARWISH et al., 2019).

Por fim, avaliamos a atividade antileucêmica do BTZ em modelo *in vivo* utilizando camundongos NSG inoculados com células KG-1a. Nesse ensaio utilizamos modelos de camundongos imunossuprimidos e focamos principalmente nas células de LMA da medula óssea. Nossos dados revelaram que o fármaco foi capaz de reduzir as células leucêmicas na medula óssea sangue dos animais, sugerindo assim que o BTZ apresenta capacidade de eliminar células de LMA em modelo *in vivo*. Semelhante aos nossos achados, ZHOU e colaboradores, 2021, demonstraram que o BTZ suprimiu a proliferação celular e a função das CTLs e inibindo a progressão de célula leucêmicas em camundongos NOD/SCID-IL2R γ (NSG) inoculados com células de linhagem de LMA MLL-AF9 (ZHOU et al., 2021). O BTZ em combinação com o inibidor MK1775 demonstrou atividade anti-MM e eficácia ao erradicar células-tronco do MM em modelos *in vivo*, onde pós tratamento, os animais tiveram uma taxa de crescimento tumoral significativamente mais lenta e além disso, não tiveram alterações de peso bruscas durante o período de tratamento. (LIANG et al., 2020). Em ensaios *in vivo* com células de câncer colorretal, o BTZ em combinação com ICG (indocianina verde) mostraram excelente inibição de células tumorais devido ao efeito combinado (QING et al., 2021). Esses dados mostram a eficácia do BTZ tanto isoladamente quanto em combinação com outros fármacos, bem como indicam a ausência de toxicidade causada pelas doses aplicadas dos fármacos. Nossos resultados sustentam a ideia da atividade antitumoral exercida pelo BTZ.

7. Conclusão

Em nosso trabalho demonstramos que o tratamento com o BTZ além de ser citotóxico para diferentes linhagens de células cancerosas, induziu morte celular de células de LMA KG-1a, bem como redução da viabilidade de CTLs, induziu fragmentação do DNA, aumentou a expressão de caspase-3 ativa e PARP clivada, e seu efeito foi parcialmente prevenido com o uso de um inibidor de caspase, indicando morte celular por apoptose. Além disso, observamos que o BTZ aumentou significativamente os níveis de ERO. A análise da expressão gênica revelou que o BTZ exerce ação sobre uma variedade de genes associados ao câncer e interferiu na atividade da via de sinalização do NF- κ B. BTZ também se mostrou eficaz na inibição tumoral em modelo animal com xenotransplante de células de leucemia humana. Nessa perspectiva, a atividade antileucêmica desempenhada pelo BTZ surge como uma estratégia promissora para o tratamento de LMA.

Referências

Ahn, D., Kim, C. W., Go, R. E., & Choi, K. C. (2022). Evaluation of mitochondrial oxidative toxicity in mammalian cardiomyocytes by determining the highly reproducible and reliable increase in mitochondrial superoxides after exposure to therapeutic drugs. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 83, 105393. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105393>

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2017*. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2023

Arai, N., Homma, M., Abe, M., Baba, Y., Murai, S., Watanuki, M., Kawaguchi, Y., Fujiwara, S., Kabasawa, N., Tsukamoto, H., Uto, Y., Ariizumi, H., Yanagisawa, K., Hattori, N., Saito, B., Shiozawa, E., Harada, H., Yamochi-Onizuka, T., Nakamaki, T., & Takimoto, M. (2019). Impact of CD123 expression, analyzed by immunohistochemistry, on clinical outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *International journal of hematology*, 109(5), 539-544. <https://doi.org/10.1007/s12185-019-02616-y>

Austin, R.J., Straube, J., Halder, R. et al. Oncogenic drivers dictate immune control of acute myeloid leukemia. *Nat Commun* 14, 2155 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37592-9>

Apalla, Z., Bobos, M., Lallas, A., Lazaridou, E., & Katodritou, E. (2020). Bortezomib induced purpuric rash. *Dermatologic therapy*, 33(4), e13651. <https://doi.org/10.1111/dth.13651>

Bayat Mokhtari, R., Baluch, N., Homayouni, T. S., Morgatskaya, E., Kumar, S., Kazemi, P., & Yeger, H. (2018). The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review. *Journal of cell communication and signaling*, 12(1), 91-101. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0401-y>

Bispo, J. A. B., Pinheiro, P. S., & Kobetz, E. K. (2020). Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(6), a034819. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819>

Barbosa, R. S. S., Dantonio, P. M., Guimarães, T., de Oliveira, M. B., Fook Alves, V. L., Sandes, A. F., Fernando, R. C., & Colleoni, G. W. B. (2019). Sequential combination of bortezomib and WEE1 inhibitor, MK-1775, induced apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 519(3), 597-604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.163>

Bock, F. J., & Tait, S. W. G. (2020). Mitocôndrias como reguladores multifacetados da morte celular. *Revisões da natureza. Biologia celular molecular*, 21(2), 85-100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>

Bosshard, R., O'Reilly, K., Ralston, S., Chadda, S., & Cork, D. (2018). Systematic reviews of economic burden and health-related quality of life in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer treatment reviews*, 69, 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.0053>

Carter, B.Z., Mak, P.Y., Tao, W. et al. A inibição combinada de BCL-2 e MCL-1 supera a resistência mediada pela deficiência de BAX da leucemia mieloide aguda mutante TP53 a miméticos BH3 individuais. *Câncer de sangue J.* 13, 57 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00830-w>

Cehade, H., Fox, A., Mor, G. G., & Alvero, A. B. (2021). Determinação da Ativação de Caspase por Western Blot. *Métodos em biologia molecular (Clifton, N.J.)*, 2255, 1-12. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1162-3_1

Chen, M., Juengpanich, S., Li, S., Topatana, W., Lu, Z., Zheng, Q., Cao, J., Hu, J., Chan, E., Hou, L., Chen, J., Chen, F., Liu, Y., Jiansirisomboon, S., Gu, Z., Tongpeng, S., & Cai, X. (2022). Bortezomib-Encapsulated Dual Responsive Copolymeric Nanoparticles for Gallbladder Cancer Targeted Therapy. *Advanced*

science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 9(7), e2103895.
<https://doi.org/10.1002/advs.202103895>

Chen, Z., Guo, Q., Song, G., & Hou, Y. (2022). Molecular regulation of hematopoietic stem cell quiescence. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 79(4), 218. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04200-w>

Chigasova, A.K., Ostrovskaya, L.A. & Korman, D.B. Gold Polyacrylate: Mechanism of Cytotoxic Action on Tumor Cells. BIOPHYSICS 67, 943-947 (2022). <https://doi.org/10.1134/S0006350922060045>

Cloos, J., Roeten, M. S., Franke, N. E., van Meerloo, J., Zweegman, S., Kaspers, G. J., & Jansen, G. (2017). (Immuno) proteasomes as therapeutic target in acute leukemia. Cancer metastasis reviews, 36(4), 599-615. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9699-4>

Darwish, N., Sudha, T., Godugu, K., Bharali, D. J., Elbaz, O., El-Ghaffar, H., Azmy, E., Anber, N., & Mousa, S. A. (2019). Novel Targeted Nano-Parthenolide Molecule against NF- κ B in Acute Myeloid Leukemia. Molecules (Basel, Switzerland), 24(11), 2103. <https://doi.org/10.3390/molecules24112103>

De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. Blood cancer journal, 6(7), e441. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>

Ferrarini, I., Rigo, A., & Visco, C. (2022). The mitochondrial anti-apoptotic dependencies of hematologic malignancies: from disease biology to advances in precision medicine. Haematologica, 107(4), 790-802. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.280201>

Fricker L. D. (2020). Proteasome Inhibitor Drugs. Annual review of pharmacology and toxicology, 60, 457-476. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023603>

Gauthier, L., Virone-Oddos, A., Beninga, J., Rossi, B., Nicolazzi, C., Amara, C., Blanchard-Alvarez, A., Gourdin, N., Courta, J., Basset, A., Agnel, M., Guillot, F., Grondin, G., Bonnevaux, H., Bauchet, A. L., Morel, A., Morel, Y., Chiron, M., & Vivier, E. (2023). Control of acute myeloid leukemia by a trifunctional NKp46-CD16a-NK cell engager targeting CD123. *Nature biotechnology*, 10.1038/s41587-022-01626-2. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01626-2>

Grover, R., Drall, S., Poonia, N., Jain, G. K., Aggarwal, G., Lather, V., ... & Goyal, R. K. (2022). CD44 and CD133 aptamer directed nanocarriers for cancer stem cells targeting. *European Polymer Journal*, 111770. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111770>

O'Donnell, A., Pepper, C., Mitchell, S., & Pepper, A. (2023). NF- κ B and the CLL microenvironment. *Frontiers in oncology*, 13, 1169397. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1169397>

Haubner, S., Perna, F., Köhnke, T. et al. Perfil de coexpressão de marcadores de células-tronco leucêmicas para terapia-alvo combinatória na LMA. *Leucemia* 33, 64-74 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0180-3>

He, X., Feng, Z., Ma, J., Ling, S., Cao, Y., Gurung, B., Wu, Y., Katona, B. W., O'Dwyer, K. P., Siegel, D. L., June, C. H., & Hua, X. (2020). Bispecific and split CAR T cells targeting CD13 and TIM3 eradicate acute myeloid leukemia. *Blood*, 135(10), 713-723. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002779>

Hui, K. F., Lam, B. H., Ho, D. N., Tsao, S. W., & Chiang, A. K. (2013). Bortezomib and SAHA synergistically induce ROS-driven caspase-dependent apoptosis of nasopharyngeal carcinoma and block replication of Epstein-Barr virus. *Molecular cancer therapeutics*, 12(5), 747-758. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0811>

Hsueh, Y. S., Chang, H. H., Shan, Y. S., Sun, H. S., Fletcher, J. A., Li, C. F., & Chen, L. T. (2019). Nuclear KIT induces a NFKBIB-RELA-KIT autoregulatory loop

in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, 38(38), 6550-6565. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0900-9>

INCA. Coordenação de prevenção e vigilância de câncer. Estimativas 2023: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, v., n., p., 2022

Infante, M. S., Piris, M. Á., & Hernández-Rivas, J. Á. (2018). Molecular alterations in acute myeloid leukemia and their clinical and therapeutical implications. *Alteraciones moleculares en leucemia mieloide aguda y sus implicaciones clínicas y terapéuticas. Medicina clínica*, 151(9), 362-367. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.05.002>

Ishii, H., & Yano, S. (2022). New Therapeutic Strategies for Adult Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*, 14(11), 2806. <https://doi.org/10.3390/cancers14112806>

Jiang, Y. P., Liu, B. Y., Zheng, Q., Panuganti, S., Chen, R., Zhu, J., Mishra, M., Huang, J., Dao-Pick, T., Roy, S., Zhao, X., Lin, J., Banik, G., Hsi, E. D., Mandalam, R., & Junutula, J. R. (2018). CLT030, a leukemic stem cell-targeting CLL1 antibody-drug conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Blood advances*, 2(14), 1738-1749. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018020107>

Jin, L., Kom, M. C., Fu, G., Xie, Y., Gao, Y., Shen, J., Huang, H., Hu, B., & Yan, J. (2022). Hexavalent chromium induces hepatocyte apoptosis via regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun amino-terminal kinase signaling. *Environmental toxicology*, 37(6), 1288-1296. <https://doi.org/10.1002/tox.23483>

Kaltschmidt, B., Witte, K. E., Greiner, J. F. W., Weissinger, F., & Kaltschmidt, C. (2022). Targeting NF-κB Signaling in Cancer Stem Cells: A Narrative Review. *Biomedicines*, 10(2), 261. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020261>

Kamens, J. L., Nance, S., Koss, C., Xu, B., Cotton, A., Lam, J. W., Garfinkle, E. A. R., Nallagatla, P., Smith, A. M. R., Mitchell, S., Ma, J., Currier, D., Wright, W.

C., Kavdia, K., Pagala, V. R., Kim, W., Wallace, L. M., Cho, J. H., Fan, Y., Seth, A., Gruber, T. A. (2023). Proteasome inhibition targets the KMT2A transcriptional complex in acute lymphoblastic leukemia. *Nature communications*, 14(1), 809. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36370-x>

Kandarakov, O., Belyavsky, A., & Semenova, E. (2022). Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4462. <https://doi.org/10.3390/ijms23084462>

Kelly, L. M., Yu, J. C., Boulton, C. L., Apatira, M., Li, J., Sullivan, C. M., Williams, I., Amaral, S. M., Curley, D. P., Duclos, N., Neuberg, D., Scarborough, R. M., Pandey, A., Hollenbach, S., Abe, K., Lokker, N. A., Gilliland, D. G., & Giese, N. A. (2002). CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer cell*, 1(5), 421-432. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00070-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00070-3)

Kuykendall, A., Duployez, N., Boissel, N., Lancet, J. E., & Welch, J. S. (2018). Acute Myeloid Leukemia: The Good, the Bad, and the Ugly. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 38, 555-573. https://doi.org/10.1200/EDBK_199519

Laverdière, I., Boileau, M., Neumann, A. L., Frison, H., Mitchell, A., Ng, S., Wang, J., Minden, M. D., & Eppert, K. (2018). Leukemic stem cell signatures identify novel therapeutics targeting acute myeloid leukemia. *Blood cancer journal*, 8(6), 52. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0087-2>

Lee, C. J., Savani, B. N., Mohty, M., Gorin, N. C., Labopin, M., Ruggeri, A., Schmid, C., Baron, F., Esteve, J., Giebel, S., Ciceri, F., & Nagler, A. (2019). Post-remission strategies for the prevention of relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia: expert review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone marrow transplantation*, 54(4), 519-530. <https://doi.org/10.1038/s41409-018-0286-2>

Levis M. (2017). Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood*, 129(26), 3403-3406. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-782292>

Liang, L., He, Y., Wang, H., Zhou, H., Xiao, L., Ye, M., Kuang, Y., Luo, S., Zuo, Y., Feng, P., Yang, C., Cao, W., Liu, T., Roy, M., Xiao, X., & Liu, J. (2020). The Wee1 kinase inhibitor MK1775 suppresses cell growth, attenuates stemness and synergises with bortezomib in multiple myeloma. *British journal of haematology*, 191(1), 62-76. <https://doi.org/10.1111/bjh.16614>

Lu, X., Huang, X., Xu, H., Lu, S., You, S., Xu, J., Zhan, Q., Dong, C., Zhang, N., Zhang, Y., Cao, L., Zhang, X., Zhang, N., & Zhang, L. (2022). The role of E3 ubiquitin ligase WWP2 and the regulation of PARP1 by ubiquitinated degradation in acute lymphoblastic leukemia. *Cell death discovery*, 8(1), 421. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01209-9>

Mahmoudian, M., Valizadeh, H., Löbenberg, R., & Zakeri-Milani, P. (2021). Bortezomib-loaded lipidic-nano drug delivery systems; formulation, therapeutic efficacy, and pharmacokinetics. *Journal of microencapsulation*, 38(3), 192-202. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1876175>

Maletzke, S., Salimi, A., Vieri, M., Schroeder, K. M., Schemionek, M., Masouleh, B. K., Brümmendorf, T. H., Koschmieder, S., & Appelman, I. (2022). Combined inhibition of BCR-ABL1 and the proteasome as a potential novel therapeutic approach in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *PloS one*, 17(10), e0268352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268352>

Mani, R., Goswami, S., Gopalakrishnan, B., Ramaswamy, R., Wasmuth, R., Tran, M., Mo, X., Gordon, A., Bucci, D., Lucas, D. M., Mims, A., Brooks, C., Dorrance, A., Walker, A., Blum, W., Byrd, J. C., Lozanski, G., Vasu, S., & Muthusamy, N. (2018). The interleukin-3 receptor CD123 targeted SL-401 mediates potent cytotoxic activity against CD34+CD123+ cells from acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome patients and healthy donors. *Haematologica*, 103(8), 1288-1297. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188193>

Migkou, M., Gavriatopoulou, M., Terpos, E., & Dimopoulos, M. A. (2018). Optimizing therapy in bortezomib-exposed patients with multiple myeloma. *Expert review of hematology*, 11(6), 463-469. <https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1479637>

Mohd Amin, A., Panneerselvan, N., Md Noor, S., Mohtaruddin, N., Sathar, J., Norbaya, W. S., Osman, R., Kee, L. H., Mohd Yaakub, W. H., Cheong, S. K., & Abdullah, M. (2023). ENPP4 and HOXA3 as potential leukaemia stem cell markers in acute myeloid leukaemia. *The Malaysian journal of pathology*, 45(1), 65-76.

Moshaver, B., Wouters, R. F., Kelder, A., Ossenkuppele, G. J., Westra, G., Kwidama, Z., Rutten, A. R., Kaspers, G., Zweegman, S., Cloos, J., & Schuurhuis, G. J. (2019). Relationship between CD34/CD38 and side population (SP) defined leukemia stem cell compartments in acute myeloid leukemia. *Leukemia research*, 81, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.04.004>

Mpakou, V., Spathis, A., Bouhla, A., Mpazani, E., Papageorgiou, S., Gkontopoulos, K., Glezou, E., Thomopoulos, T., Foukas, P., & Pappa, V. (2021). Synergistic inhibitory effects of low-dose decitabine in combination with bortezomib in the AML cell line Kasumi-1. *Experimental and therapeutic medicine*, 21(3), 195. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9628>

Naldini, M.M., Casirati, G., Barcella, M. et al. Perfil longitudinal unicelular da resposta à quimioterapia na leucemia mieloide aguda. *Nat Commun* 14, 1285 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36969-0>

National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Acute Myeloid Leukemia (AML); 2023

O'Donnell, M. R., Tallman, M. S., Abboud, C. N., Altman, J. K., Appelbaum, F. R., Arber, D. A., Bhatt, V., Bixby, D., Blum, W., Coutre, S. E., De Lima, M., Fathi, A. T., Fiorella, M., Foran, J. M., Gore, S. D., Hall, A. C., Kropf, P., Lancet, J.,

Maness, L. J., Marcucci, G., ... Ogba, N. (2017). Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, 15(7), 926-957. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0116>

Park, S. J., & Bejar, R. (2020). Clonal hematopoiesis in cancer. Experimental hematology, 83, 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.02.001>

Park, S. M., Cho, H., Thornton, A. M., Barlowe, T. S., Chou, T., Chhangawala, S., Fairchild, L., Taggart, J., Chow, A., Schurer, A., Gruet, A., Witkin, M. D., Kim, J. H., Shevach, E. M., Krivtsov, A., Armstrong, S. A., Leslie, C., & Kharas, M. G. (2019). IKZF2 Drives Leukemia Stem Cell Self-Renewal and Inhibits Myeloid Differentiation. Cell stem cell, 24(1), 153-165.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.016>

Pelosi, E., Castelli, G., & Testa, U. (2023). CD123 a Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia and Blastic Plasmacytoid Dendritic Neoplasm. International journal of molecular sciences, 24(3), 2718. <https://doi.org/10.3390/ijms24032718>

Phan, T. G., & Croucher, P. I. (2020). The dormant cancer cell life cycle. Nature reviews. Cancer, 20(7), 398-411. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0>

Pollyea, D. A., & Jordan, C. T. (2017). Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. **Blood**, 129(12), 1627-1635. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696039>

Relation, T., Dominici, M., & Horwitz, E. M. (2017). Concise Review: An (Im) Penetrable Shield: How the Tumor Microenvironment Protects Cancer Stem Cells. Stem cells (Dayton, Ohio), 35(5), 1123-1130. <https://doi.org/10.1002/stem.2596>

Rodrigues, A., Costa, R., Silva, S., Dias, I., Dias, R. B., & Bezerra, D. P. (2021). Cell signaling pathways as molecular targets to eliminate AML stem cells. Critical reviews in oncology/hematology, 160, 103277.

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103277>

Romo-González, M., Ijurko, C., & Hernández-Hernández, Á. (2022). Reactive Oxygen Species and Metabolism in Leukemia: A Dangerous Liaison. *Frontiers in immunology*, 13, 889875. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.889875>

Shi, Y., Zhang, Z., Qu, X., Zhu, X., Zhao, L., Wei, R., Guo, Q., Sun, L., Yin, X., Zhang, Y., & Li, X. (2018). Roles of STAT3 in leukemia (Review). *International journal of oncology*, 53(1), 7-20. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4386>

Qing, W., Xing, X., Feng, D., Chen, R., & Liu, Z. (2021). Indocyanine green loaded pH-responsive bortezomib supramolecular hydrogel for synergistic chemophotothermal/photodynamic colorectal cancer therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 36, 102521. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102521>

Singh, P., & Lim, B. (2022). Targeting Apoptosis in Cancer. *Current oncology reports*, 24(3), 273-284. <https://doi.org/10.1007/s11912-022-01199-y>

Stelmach, P., & Trumpp, A. (2023). Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 108(2), 353-366. <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.280800>

Story, J. Y., Zoine, J. T., Burnham, R. E., Hamilton, J. A. G., Spencer, H. T., Doering, C. B., & Raikar, S. S. (2021). Bortezomib enhances cytotoxicity of ex vivo-expanded gamma delta T cells against acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*, 23(1), 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.09.010>

Sugita, M., Galetto, R., Zong, H., Ewing-Crystal, N., Trujillo-Alonso, V., Mencia-Trinchant, N., Yip, W., Filipe, S., Lebuhotel, C., Gouble, A., Hassane, D. C., Smith, J., Roboz, G. J., & Guzman, M. L. (2022). Allogeneic TCR $\alpha\beta$ deficient CAR T-cells targeting CD123 in acute myeloid leukemia. *Nature communications*, 13(1), 2227. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29668-9>

Sun S. C. (2017). The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 17(9), 545-558. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>

Tabe Y., Konopleva M. (2017) Leukemia Stem Cells Microenvironment. In: Birbrair A. (eds) *Stem Cell Microenvironments and Beyond. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1041. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69194-7_3

Tan, C. R. C., Abdul-Majeed, S., Cael, B., & Barta, S. K. (2019). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bortezomib. *Clinical pharmacokinetics*, 58(2), 157-168. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0679-9>

Tan, M., Zhang, Q., Yuan, X., Chen, Y., & Wu, Y. (2019). Synergistic killing effects of homoharringtonine and arsenic trioxide on acute myeloid leukemia stem cells and the underlying mechanisms. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 38(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1295-8>

Testa, U., Riccioni, R., Militi, S., Coccia, E., Stellacci, E., Samoggia, P., Latagliata, R., Mariani, G., Rossini, A., Battistini, A., Lo-Coco, F., & Peschle, C. (2002). Elevated expression of IL-3R α in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood*, 100(8), 2980-2988. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0852>

Testa, U., Pelosi, E., & Castelli, G. (2019). CD123 as a Therapeutic Target in the Treatment of Hematological Malignancies. *Cancers*, 11(9), 1358. <https://doi.org/10.3390/cancers11091358>

Thomas, D., & Majeti, R. (2017). Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 129(12), 1577-1585. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696054>

Vitale, I., Pietrocola, F., Guilbaud, E., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D.,

Agostini, M., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Aqeilan, R. I., Arama, E., Baehrecke, E. H., Balachandran, S., Bano, D., Barlev, N. A., Bartek, J., Bazan, N. G., ... Galluzzi, L. (2023). Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023. *Cell death and differentiation*, 30(5), 1097-1154. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01153-w>

Wakita, S., Sakaguchi, M., Oh, I., Kako, S., Toya, T., Najima, Y., Doki, N., Kanda, J., Kuroda, J., Mori, S., Satake, A., Usuki, K., Ueki, T., Uoshima, N., Kobayashi, Y., Kawata, E., Tajika, K., Nagao, Y., Shono, K., Shibusawa, M., ... Yamaguchi, H. (2022). Prognostic impact of CEBPA bZIP domain mutation in acute myeloid leukemia. *Blood advances*, 6(1), 238-247. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004292>

Wang, L., Yin, H., Huang, S., Huang, S., Huang, C., Zhang, Z., & Liu, H. (2022). Bortezomib induces cellular senescence in A549 lung cancer cells by stimulating telomere shortening. *Human & experimental toxicology*, 41, 9603271221124094. <https://doi.org/10.1177/09603271221124094>

Whitehead, T. P., Metayer, C., Wiemels, J. L., Singer, A. W., & Miller, M. D. (2016). Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 46(10), 317-352. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.08.004>

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.) World cancer report: cancer research for cancer prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 19 set. 2022

Zhao, J. C., Agarwal, S., Ahmad, H., Amin, K., Bewersdorf, J. P., & Zeidan, A. M. (2022). A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Blood reviews*, 52, 100905. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100905>

Zhou, B., Qin, Y., Zhou, J., Ruan, J., Xiong, F., Dong, J., Huang, X., Yu, Z., & Gao, S. (2021). Bortezomib suppresses self-renewal and leukemogenesis of

leukemia stem cell by NF- κ B-dependent inhibition of CDK6 in MLL-rearranged myeloid leukemia. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(6), 3124-3135. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16377>

Zhang, Q., Lenardo, M. J., & Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*, 168(1-2), 37-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>

Zhang, W., Niu, J., Ma, Y., Yang, X., Cao, H., Guo, H., Bao, F., Haw, A., Chen, Y., & Sun, K. (2020). The Synergistic Antitumor Activity of Chidamide in Combination with Bortezomib on Gastric Cancer. *OncoTargets and therapy*, 13, 3823-3837. <https://doi.org/10.2147/OTT.S240721>

Zong, L., Xie, J., Kong, J., Bao, X., Wu, X., Pu, Y., Zhang, J., & Qiu, H. (2022). Lineage switch from acute myeloid leukemia to acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 63(9), 2257-2259. <https://doi.org/10.1080/10428194.2022.2064984>

Zhou, P., Zhang, C., Song, X. et al. Δ Np63 α promotes Bortezomib resistance via the CYGB-ROS axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Death Disease* 13, 327 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04790-0>

APÊNDICE

Tabela 6 - Efeito do BTZ na expressão gênica em células KG-1a.

Function/Assay ID	Gene Symbol	Gene Name	RQ	
			CTL	BTZ
NFκB pathway				
Hs00765730_m1	NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1	1.00	0.78
Hs00174517_m1	NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2	1.00	1.83
Hs00153283_m1	NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	1.00	1.90
Hs00182115_m1	NFKBIB	NFKB inhibitor beta	1.00	2.21
Hs00153294_m1	RELA	RELA proto-oncogene, NF-κB subunit	1.00	2.91
Hs00232399_m1	RELB	RELB proto-oncogene, NF-κB subunit	1.00	7.31
WNT/β-catenin pathway				
Hs00181051_m1	APC	APC, WNT signaling pathway regulator	1.00	2.17
Hs00793391_m1	CSNK1A1	casein kinase 1 alpha 1	1.00	1.35
Hs00170025_m1	CTNNB1	catenin beta 1	1.00	1.38
Hs00275656_m1	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	1.00	1.63
Hs00228741_m1	WNT10A	Wnt family member 10A	n.d.	n.d.
Hs00559664_m1	WNT10B	Wnt family member 10B	1.00	1.25
Hs00257131_m1	WNT2B	Wnt family member 2B	n.d.	n.d.
Hs00362452_m1	WNT6	Wnt family member 6	n.d.	n.d.
Hedgehog pathway				

Hs00368306_m1	DHH	desert hedgehog	n.d.	n.d.
Hs00171790_m1	GLI1	GLI family zinc finger 1	1.00	1.08
Hs00257977_m1	GLI2	GLI family zinc finger 2	n.d.	n.d.
Hs00181117_m1	PTCH1	patched 1	1.00	0.19
Hs00179843_m1	SHH	sonic hedgehog	n.d.	n.d.
Hs00170665_m1	SMO	smoothened, frizzled class receptor	n.d.	n.d.
Hs00171981_m1	SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling	1.00	1.63
NOTCH pathway				
Hs00194509_m1	DLL1	delta like canonical Notch ligand 1	1.00	n.d.
Hs01085096_m1	DLL3	delta like canonical Notch ligand 3	1.00	n.d.
Hs00164982_m1	JAG1	jagged 1	1.00	2.79
Hs00171432_m1	JAG2	jagged 2	1.00	7.47
Hs01062014_m1	NOTCH1	notch 1	1.00	0.83
Hs01050702_m1	NOTCH2	notch 2	1.00	0.94
EGFR pathway				
Hs01099999_m1	EGF	epidermal growth factor	1.00	26.61
Hs01076078_m1	EGFR	epidermal growth factor receptor	n.d.	n.d.
Hs00364282_m1	KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase	1.00	1.09
Hs01046830_m1	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1.00	1.42

Hs00234119_m1	RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	1.00	1.57
---------------	------	--	------	------

Hs00269660_s1	RHOB	ras homolog family member B	n.d.	n.d.
---------------	------	-----------------------------	------	------

JAK/STAT pathway

Hs01026983_m1	JAK1	Janus kinase 1	1.00	1.23
---------------	------	----------------	------	------

Hs01078136_m1	JAK2	Janus kinase 2	1.00	0.69
---------------	------	----------------	------	------

Hs00169663_m1	JAK3	Janus kinase 3	n.d.	n.d.
---------------	------	----------------	------	------

Hs01013989_m1	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	1.00	2.45
---------------	-------	---	------	------

Hs00374280_m1	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	1.00	3.09
---------------	-------	---	------	------

Hs00273500_m1	STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B	1.00	2.53
---------------	--------	--	------	------

Hs00598625_m1	STAT6	signal transducer and activator of transcription 6	1.00	1.56
---------------	-------	---	------	------

PI3K/AKT/MTOR pathway

Hs00178289_m1	AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	1.00	1.85
---------------	------	-------------------------------	------	------

Hs01086102_m1	AKT2	AKT serine/threonine kinase 2	1.00	2.21
---------------	------	-------------------------------	------	------

Hs00234508_m1	MTOR	mechanistic target of rapamycin	1.00	2.43
---------------	------	---------------------------------	------	------

Hs00904054_m1	PIK3C2A	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha	1.00	2.02
---------------	---------	--	------	------

Hs00176908_m1	PIK3C3	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	1.00	1.59
Hs00907957_m1	PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	1.00	2.00
Hs02621230_s1	PTEN	phosphatase and tensin homolog	1.00	0.73

TGF-beta/SMAD pathway

Hs01054576_m1	FOXO1	forkhead box O1	1.00	0.55
Hs00183425_m1	SMAD2	SMAD family member 2	1.00	2.17
Hs00929647_m1	SMAD4	SMAD family member 4	1.00	1.14
Hs00178696_m1	SMAD7	SMAD family member 7	1.00	3.07
Hs00998133_m1	TGFB1	transforming growth factor beta 1	1.00	1.38
Hs00234244_m1	TGFB2	transforming growth factor beta 2	1.00	n.d.
Hs01086000_m1	TGFB3	transforming growth factor beta 3	1.00	n.d.

PPAR pathway

Hs00947536_m1	PPARA	peroxisome proliferator activated receptor alpha	1.00	1.86
Hs04187066_g1	PPARD	peroxisome proliferator activated receptor delta	1.00	2.00
Hs01115513_m1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma	1.00	9.98
Hs01016719_m1	PPARGC1A	PPARG coactivator 1 alpha	n.d.	n.d.
Hs00991677_m1	PPARGC1B	PPARG coactivator 1 beta	1.00	0.76

Oxidative stress

Hs00943350_g1	GSTP1	glutathione S-transferase pi 1	1.00	2.10
Hs00178247_m1	OXS1	oxidative stress responsive 1	1.00	0.95
Hs00167309_m1	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.00	1.48
Hs01555214_g1	TXN	thioredoxin	1.00	1.70
Hs00917067_m1	TXNRD1	thioredoxin reductase 1	1.00	6.26

Apoptosis

Hs00559441_m1	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	1.00	1.74
Hs00188930_m1	BAD	BCL2 associated agonist of cell death	1.00	2.17
Hs00180269_m1	BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	1.00	1.40
Hs99999018_m1	BCL2	BCL2, apoptosis regulator	1.00	0.62
Hs00609632_m1	BID	BH3 interacting domain death agonist	1.00	1.43
Hs00234387_m1	CASP3	caspase 3	1.00	1.37
Hs00169152_m1	CASP7	caspase 7	1.00	1.01
Hs00219876_m1	DIABLO	diablo IAP-binding mitochondrial protein	1.00	1.39
Hs00538709_m1	FADD	Fas associated via death domain	1.00	1.03
Hs00531110_m1	FAS	Fas cell surface death receptor	1.00	4.93

Hs00242302_m1	PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1	1.00	0.51
Autophagy				
Hs01047860_g1	ATG12	autophagy related 12	1.00	1.63
Hs00223937_m1	ATG3	autophagy related 3	1.00	0.56
Hs00169468_m1	ATG5	autophagy related 5	1.00	1.47
Hs00186838_m1	BECN1	beclin 1	1.00	0.67
Hs01076567_g1	MAP1LC3A	microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha	1.00	n.d.
Hs00797944_s1	MAP1LC3B	microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	1.00	5.53
Necroptosis				
Hs00169407_m1	RIPK1	receptor interacting serine/threonine kinase 1	1.00	1.96
Hs01572686_m1	RIPK2	receptor interacting serine/threonine kinase 2	1.00	1.93
Hs01011177_g1	RIPK3	receptor interacting serine/threonine kinase 3	1.00	1.96
Epithelial-mesenchymal transition				
Hs00170423_m1	CDH1	cadherin 1	n.d.	n.d.
Hs00195591_m1	SNAI1	snail family transcriptional repressor 1	1.00	11.86
Hs00950344_m1	SNAI2	snail family transcriptional repressor 2	n.d.	n.d.

Hs01018996_m1	SNAI3	snail family transcriptional repressor 3	1.00	0.25
Hs00361186_m1	TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1	1.00	0.16
Hs00185584_m1	VIM	vimentin	1.00	5.23
Hs00232783_m1	ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	1.00	1.2
Hs00207691_m1	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2	1.00	12.34

As Células KG-1a foram tratadas com 2 μ M de BTZ por 12 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% DMSO) utilizado para diluição do composto testado. Após o tratamento, o RNA total foi isolado e transcrito reversamente. A expressão gênica foi detectada usando TaqMan® array plate 96 plus fast (#4413256). Os genes GUSB, HPRT1 e GAPDH foram utilizados como genes endógenos para normalização. Os valores representam a quantificação relativa (RQ) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo). Os genes foram considerados regulados positivamente se $RQ \geq 2$ e regulados negativamente se $RQ \leq 0,5$. N.d. Não determinado.



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, adenomatous polyposis coli; Ara-C, cytarabine; ATM, ataxia telangiectasia mutated; BAFFR, B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor; BCR, B cell receptor; BM, bone marrow; BMP, bone morphogenetic proteins; CEBPa, CCAAT/enhancer-binding protein alpha; CK1 α , casein kinase 1 α ; Co-SMAD, common SMAD mediator; DMAPP, 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 Propedeutics, 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@fiocruz.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/>).