



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

VANESSA DE ALBUQUERQUE BRITO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS DERIVADOS
TIOFÊNICOS FRENTE A CÉLULAS LEUCÊMICAS RESISTENTES A
QUIMIOTERAPIA**

Recife

2024

VANESSA DE ALBUQUERQUE BRITO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS DERIVADOS
TIOFÊNICOS FRENTE A CÉLULAS LEUCÊMICAS RESISTENTES A
QUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Coorientadoras: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Coorientadoras: Profa. Dra. Renata Binato Gomes

Recife

2024

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Brito, Vanessa de Albuquerque.

Avaliação dos mecanismos de ação dos derivados tiofênicos frente a células leucêmicas resistentes a quimioterapia / Vanessa de Albuquerque Brito. - Recife, 2024.
90f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2024.

Orientação: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Coorientação: Michelly Cristiny Pereira.

Coorientação: Renata Binato Gomes.

Inclui referências.

1. Tiofeno; 2. Leucemia; 3. Resistência. I. Rego, Moacyr Jesus Barreto de Melo. II. Pereira, Michelly Cristiny. III. Gomes, Renata Binato. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vanessa de Albuquerque Brito

Título: Avaliação dos mecanismos de ação dos derivados tiofênicos frente a células leucêmicas resistentes a quimioterapia

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais à Saúde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 01/11/2024.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Leydianne Leite de Siqueira Patriota
Departamento de Bioquímica – UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Valécia de Cassia Mendonça da Costa Andrade
Departamento de Bioquímica – UFPE

Assinatura: _____

Prof. Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley
Instituto de Ciências Biológicas – UPE

Assinatura: _____

Prof Dr. Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Departamento de Bioquímica – UFPE

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Com a plena certeza de que não ando neste mundo só, gostaria de demonstrar minha eterna gratidão à Deus, nosso Senhor Jesus Cristo e minha mãe amada, Nossa Senhora. Obrigada por terem me dado colo nos momentos mais desafiadores, me sustentado, quando imaginei que não suportaria, e por ter indicado o caminho correto a seguir. A ti, Senhor, entrego minha vida daqui pra frente na certeza de que ‘Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu’ Eclesiastes 3:1.

Nem todos os dias que eu tenho na vida serão suficientes para agradecer a minha mãe, Maria Betânia, por tantas coisas que não caberiam nestas páginas, mas, principalmente, por sempre ter lutado por mim. A ti eu dedico não só esta conquista, mas todas as outras que eu terei. Obrigada por fincar meus pés no chão todos os dias e por não ter atendido meus desejos quando isso se fez necessário.

Ao meu pai, Jurandir, que fez de mim a criança mais feliz do mundo. Que me ensinou o que é ‘ser humano’ não só com palavras e histórias de 40 anos atrás, mas principalmente pelo exemplo. Com o senhor eu aprendi que sensibilidade não é fraqueza, honestidade não é bobagem e que ainda é possível sonhar com um mundo justo. Ah, eu te amo tanto, é fácil perceber.

À Ketlyn agradeço por todo suporte emocional durante não só esse período, mas durante todos os nossos dias. Por sempre me encorajar e lembrar que somente eu posso realizar os meus sonhos. Obrigada pela paciência e pelas conversas.

À minhas tias e meus primos, principalmente Monize, por ter me encorajado a finalizar este ciclo. Saiba que você foi importante.

Ao professor Moacyr Rêgo minha eterna gratidão por toda paciência, ajuda e confiança. Obrigada por sempre, mesmo sem perceber, ensinar aos seus alunos sobre responsabilidade e compromisso.

Às minhas coorientadoras Michelly Pereira e Renata Binato pelo auxílio na condução deste trabalho. À professora Maira pela oportunidade e suporte.

À Thacianna e Valéria, pela contribuição durante a execução dos experimentos.

À Lidiane, por ter me ensinado praticamente tudo que eu sei na pesquisa científica, por ter me conduzido por alguns anos com paciência e leveza.

À minha incrível e eterna professora Michele Rosa, pela inspiração como pessoa e profissional.

Aos antigos e atuais integrantes do NUPIT, especialmente Eduardo, Érika, Lília e Valécia, por todo auxílio nos experimentos, apoio emocional e cafés da tarde com conversas que ficarão na minha memória para sempre.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização e conclusão desse sonho. Meu eterno muito obrigada!

RESUMO

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é uma forma agressiva de leucemia mieloide aguda caracterizada pela rápida proliferação de células imaturas, e cuja resistência a quimioterápicos é um desafio para o seu tratamento. Nesse cenário, os compostos tiofênicos, com uma estrutura molecular versátil e propriedades citotóxicas, torna-se uma molécula promissora para o tratamento da LPA. Diante do exposto, este estudo buscou investigar a ação de derivados tiofênicos nas vias de sinalização celular em linhagem de LPA. Para isso, foi utilizada a linhagem HL60/MX1, para avaliar o potencial citotóxico dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200, através do ensaio 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), seguida de uma abordagem proteômica livre de marcadores (*label-free*) com uma posterior análise de ontologia gênica. Com base nos resultados da análise proteômica, foi possível avaliar os mecanismos celulares envolvidos com o tratamento com os tiofênicos. As avaliações incluíram a quantificação de níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), a imunofenotipagem, bem como a análise do estresse do retículo endoplasmático e da dinâmica do ciclo celular com auxílio da citometria de fluxo. Com relação a avaliação da citotoxicidade dos derivados, identificou-se que os derivados SB44, SB83 e SB200 apresentaram concentração inibitória média (IC₅₀) de 13,94 μ M ($\pm$ 1,09), 19,19 μ M ($\pm$ 2,57) e 2,58 μ M ($\pm$ 0,36), respectivamente. No que se diz respeito à análise de ontologia gênica, o tratamento das células HL60/MX1 com diferentes compostos resultou em alterações em várias vias de sinalização. O composto SB44 modulou a regulação do citoesqueleto, expressão gênica, sinalização celular, ciclo celular e organização molecular e estrutural, além de modular vias de regulação metabólica, gênica, citoesqueleto, peptídeos e angiogênese. O tratamento com o composto SB83 levou a modificações associadas à organização de organelas, regulação de componentes celulares, dinâmica proteica e processos celulares e metabólicos, alterando ainda vias relacionadas à imunomodulação, inflamação, crescimento celular e resposta imune. Por fim, o tratamento com o composto SB200 modulou as proteínas envolvidas na adesão celular, regulação do citoesqueleto, morfologia celular, além da organização molecular e estrutural. Observou-se um evidente aumento na produção de superóxido nas células HL-60/MX1 após 24 horas de tratamento com os derivados SB44 ($p = 0,0043$) e SB83 ($p = 0,0004$), em comparação ao controle veículo (DMSO). As análises imunofenotípicas mostraram que esses derivados também aumentaram significativamente a expressão de HLA-DR e CD16. Os valores de significância para HLA-DR foram SB200 ($p = 0,0030$), SB44 ($p = 0,0022$) e SB83 ($p = 0,0028$), enquanto para CD16 foram SB200 ($p = 0,0222$), SB44 ($p = 0,0058$) e SB83 ($p = 0,0195$). Além disso, SB44 e SB83 reduziram significativamente a expressão de CD45RA, com $p = 0,0310$ e $p = 0,0299$, respectivamente. Por fim, os resultados da análise do ciclo celular apontaram que, após 24 horas, SB44 reduziu a porcentagem de células na fase G1 de 35,75% $\pm$ 0,7 para 25,65% $\pm$ 0,7 ($p = 0,009$) quando comparado ao DMSO. Após 48 horas, o mesmo derivado reduziu a fase S de 31,05% $\pm$ 1,3 para 19,65% $\pm$ 0,7 ($p = 0,01$). O SB83 também mostrou uma redução na fase S após 48 horas, de 31,05% $\pm$ 1,3 nas células tratadas com DMSO para 18% $\pm$ 5,23 ($p = 0,009$). Portanto, os derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200 demonstraram atividade antitumoral *in vitro* contra HL-60/MX1, capacidade de modular diferentes vias de sinalização, aumentar a geração de ROS, produzir alterações fenotípicas e alterar o ciclo celular. Dessa forma, estes compostos se destacam como potenciais agentes terapêuticos eficazes na LPA resistente ao tratamento.

Palavras-chave: Tiofeno; Leucemia; Resistência; Imunofenótipo; HL-60/MX1; ROS.

ABSTRACT

Acute promyelocytic leukemia (APL) is an aggressive form of acute myeloid leukemia characterized by rapid proliferation of immature cells, and whose resistance to chemotherapy is a challenge for its treatment. In this scenario, thiophene compounds, with a versatile molecular structure and cytotoxic properties, become a promising molecule for the treatment of APL. This study aimed to investigate the action of thiophene derivatives on cellular signaling pathways in an APL cell line. The HL60/MX1 cell line was used to evaluate the cytotoxic potential of the thiophene derivatives SB44, SB83, and SB200. The cytotoxicity evaluation was conducted using the 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, followed by a label-free proteomics approach with subsequent gene ontology analysis. Based on the proteomic analysis results, it was possible to assess the cellular mechanisms involved with thiophene treatment. Evaluations included quantification of reactive oxygen species (ROS) levels, immunophenotyping, as well as endoplasmic reticulum stress and cell cycle dynamics through flow cytometry. Regarding cytotoxicity, the IC₅₀ values for SB44, SB83, and SB200 were 13.94 μ M ($\pm$ 1.09), 19.19 μ M ($\pm$ 2.57), and 2.58 μ M ($\pm$ 0.36), respectively. Gene ontology analysis revealed that treatment with these thiophenes led to alterations in several signaling pathways. SB44 modulated cytoskeleton regulation, gene expression, cell signaling, cell cycle, and molecular and structural organization, as well as metabolic, gene regulatory, cytoskeletal, peptide, and angiogenesis pathways. SB83 induced changes related to organelle organization, regulation of cellular components, protein dynamics, cellular processes, and metabolic pathways, altering immune modulation, inflammation, cell growth, and immune response pathways. Finally, SB200 modulated proteins involved in cell adhesion, cytoskeleton regulation, cell morphology, and molecular and structural organization. A significant increase in superoxide production was observed in HL-60/MX1 cells after 24 hours of treatment with SB44 ($p = 0.0043$) and SB83 ($p = 0.0004$), compared to the vehicle control (DMSO). Immunophenotypic analyses showed that these derivatives also significantly increased the expression of HLA-DR and CD16. The significance values for HLA-DR were SB200 ($p = 0.0030$), SB44 ($p = 0.0022$), and SB83 ($p = 0.0028$), while for CD16 they were SB200 ($p = 0.0222$), SB44 ($p = 0.0058$), and SB83 ($p = 0.0195$). Additionally, SB44 and SB83 significantly reduced the expression of CD45RA, with $p = 0.0310$ and $p = 0.0299$, respectively. Finally, cell cycle analysis showed that after 24 hours, SB44 reduced the percentage of cells in the G1 phase from 35.75% $\pm$ 0.7 to 25.65% $\pm$ 0.7 ($p = 0.009$) compared to DMSO. After 48 hours, SB44 reduced the S phase from 31.05% $\pm$ 1.3 to 19.65% $\pm$ 0.7 ($p = 0.01$). SB83 also showed a reduction in the S phase after 48 hours, from 31.05% $\pm$ 1.3 in DMSO-treated cells to 18% $\pm$ 5.23 ($p = 0.009$). Therefore, the thiophene derivatives SB44, SB83, and SB200 demonstrated in vitro antitumor activity against HL-60/MX1, the ability to modulate various signaling pathways, increase superoxide generation, induce phenotypic changes, and alter the cell cycle. These compounds stand out as potential effective therapeutic agents chemotherapy-resistant in LPA.

Keywords: Thiophene; Leukemia; Resistance; Immunophenotype; HL-60/MX1; ROS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fenótipos característicos associados à carcinogênese.	18
Figura 2 -	Diferentes modelos de diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (HSCs).....	20
Figura 3 -	Estimativa do número de casos dos 13 tipos de câncer com maior incidência em 2022, no mundo.	25
Figura 4 -	Estrutura anel tiofeno.	29
Figura 5 -	Etapas da proteômica label-free LC/MSMS.	34
Quadro 1 -	Caracterização dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200.	36
Figura 6 -	Avaliação da citotoxicidade dos derivados tiofênicos na linhagem HL-60/MX1. As figuras A, B e C exibem a viabilidade dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200, respectivamente na linhagem HL-60/MX1 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$).	43
Figura 7 -	Diagrama de Venn demonstrando a distribuição de proteínas entre as amostras tratadas (SB44, SB83 e SB200) e controle.	44
Figura 8 -	Análise de ontologia gênica das proteínas diferencialmente expressas reguladas pelo tratamento com os compostos SB44, SB83 e SB200 de acordo com o programa MetaCore. As barras indicam a porcentagem de proteínas envolvidas em cada categoria	46
Figura 9 -	Vias canônicas de sinalização celular e metabólica das proteínas significativamente expressas. As barras indicam a porcentagem de proteínas envolvidas em cada categoria	48
Figura 10 -	Principais rotas moleculares envolvidas com o tratamento SB44 (A), SB83 (B) e SB200 (C) em células HL-60/MX1 obtidas através da análise do MetaCore.	50
Figura 11 -	Produção de superóxido induzido pelo derivado SB44 nas células da linhagem HL-60/MX1. Uma produção significativa de superóxido induzida pelo derivado SB44 na concentração de IC ₅₀ (13,94 μ M) em células HL-60/MX1 em comparação com o controle veículo, DMSO,	

	após um período de incubação de 24 e 48 horas.....	53
Figura 12 –	Produção de superóxido induzido pelo derivado SB83 nas células da linhagem HL-60/MX1. Uma produção significativa de superóxido induzida pelo derivado SB83 na concentração de IC ₅₀ (19,19 µM) em células HL-60/MX1 em comparação com o controle veículo, DMSO, após um período de incubação de 24 e 48 horas.....	54
Figura 13 –	Produção de superóxido induzido pelo derivado SB200 nas células da linhagem HL-60/MX1. As células da linhagem HL-60/MX1 foram tratadas com o derivado SB200 na concentração de IC ₅₀ (2,58 µM). As células foram incubadas por 24 e 48 horas. Além disso, foram utilizados os controles veículo (DMSO) e não marcado.	55
Figura 14 –	Estratégia de <i>gates</i> para a imunofenotipagem. Gráficos em formato de <i>dot plot</i> contendo os <i>gates</i> para <i>all cells</i> (1) e <i>single cells</i> (2) que são comuns para todos os testes de imunofenotipagem.....	56
Figura 15 –	Perfil de expressão de marcadores imunológicos na linhagem HL-60/MX1 quando tratadas com o derivado tiofeno SB200. (A) HLA-DR; (B) CD16; (C) CD56, (E) CD45RA e (F) CD11c. As barras representam a média de expressão dos marcadores e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle veículo (*p < 0,05).	57
Figura 16 –	Perfil de expressão de marcadores imunológicos na linhagem HL-60/MX1 quando tratadas com o derivado tiofeno SB44. (A) HLA-DR; (B) CD16; (C) CD56, (E) CD45RA e (F) CD11c. As barras representam a média de expressão dos marcadores e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle veículo (*p < 0,05).	58
Figura 17 -	Perfil de expressão de marcadores imunológicos na linhagem HL-60/MX1 quando tratadas com o derivado tiofeno SB83. (A) HLA-DR; (B) CD16; (C) CD56, (E) CD45RA e (F) CD11c. As barras representam a média de expressão dos marcadores e os asteriscos indicam diferenças	

estatisticamente significativas em relação ao controle veículo (*p < 0,05). 59

Figura 18 -

Análise do estresse do retículo endoplasmático em células HL-60/MX1 tratadas com o derivado SB200. As células da linhagem HL-60/MX1 foram marcadas com o CellLight ER-GFP por 16 horas e tratadas em seguida com o derivado SB200 com a concentração de IC₅₀ e ½ IC₅₀ por 48 horas e então analisadas por citometria de fluxo. (A) Gráfico da indução do estresse do ER em diferentes condições analisadas. (B) Representação da Intensidade de Fluorescência através de histograma, exibindo as condições analisadas – HL-60/MX1 marcada com o CellLight ER-GFP e as células HL-60/MX1 marcada com o CellLight ER-GFP e tratadas com o derivado SB200 nas concentrações de ½ IC₅₀ e IC₅₀. 60

Figura 19 -

Efeito dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200 e DMSO no ciclo celular das células HL-60/MX1 após 24 e 48 horas de tratamento. (A), (B) e (C) representam as condições: células não tratadas, DMSO (0,1%) e células tratadas com os derivados tiofênicos (IC₅₀) por 24 horas, (D), (E) e (F) representam células não tratadas, DMSO (0,1%) e células tratadas com os derivados tiofênicos (IC₅₀) por 48h. *p < 0.05. 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	Cultura de células do tipo Americano (do inglês, American Type Cell Culture)
ATO	Trióxido de Arsênio
ATRA	Ácido Trans Retinóico
AZA	Azacitidina
CP-HSC	HSCs de curto prazo
CSC	Célula-tronco do câncer
DHE	Diidroetídio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRM	Doença Residual Mensurável
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético
FAB	Franco-Americano-Britânico
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu-Fib	Peptídeo Glu-1-fibrinopeptídeo B
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSC	Célula-tronco Hematopoiética
IC50	Concentração Inibitória Média
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
KCL	Cloreto de potássio
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LPA	Leucemia Promilelocítica Aguda
LP-HSC	HSCs de longo prazo
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MP-HSC	HSCs de médio prazo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Na₃VO₄	Ortovanato de sódio
NH₄FA	Formiato de amônio
NH₄HCO₃	Bicarbonato de Amônio
NMP	Neoplasias mieloproliferativas
NT	Não tratadas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Iodeto de propídeo
PLC	Progenitores linfoides comuns
PMC	Progenitores mieloides comuns
PMP	Célula progenitora multipotente
RC	Remissão Completa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptores retinoides
SCF	Fator de Células-tronco
SDF-1	Fator Derivado do estroma 1 (do inglês, Stromal Cell-Derived Factor 1)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
VEM	Venetoclax
WBC	Leucócitos (do inglês, White blood cells)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 LEUCEMIA	17
3.1.1 Leucemia mieloide aguda (LMA)	21
3.1.2 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	23
3.2 EPIDEMIOLOGIA	24
3.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	27
3.4 DERIVADOS TIOFÊNICOS	29
3.5 ANÁLISE PROTEÔMICA	32
4. MÉTODOS	36
4.1 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS	36
4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM LEUCÊMICA HL-60/MX1	36
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS LEUCÊMICAS	37
4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E DIGESTÃO TRÍPTICA	38
4.5 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA LABEL-FREE POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS	38
4.6 PESQUISA DE BANCO DE DADOS	39
4.7 ANÁLISE DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	40
4.8 IMUNOFENOTIPAGEM	40
4.9 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	41
4.10 CICLO CELULAR	41
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
5. RESULTADOS	42
5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	42
5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA <i>LABEL-FREE</i> POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)	43
5.2.1 Análise de expressão diferencial de proteínas em células HL60/MX1 tratadas com os compostos SB44, SB83 e SB200 e não tratadas	43

5.2.2 Análise <i>in silico</i> de processos biológicos e vias de sinalização	44
5.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ROS	52
5.4 IMUNOFENOTIPAGEM	55
5.5 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	59
5.6 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	61
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	73
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	74

1. INTRODUÇÃO

As leucemias são um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas, caracterizadas pela proliferação descontrolada de células progenitoras hematopoiéticas anormais, que substituem as células normais da medula óssea e aparecem no sangue periférico. Elas podem ser classificadas em subtipos, destacando-se as leucemias mieloides e linfoides, com particular atenção para a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) devido às suas características clínicas, epidemiológicas e terapêuticas (American Cancer Society, 2024; National Cancer Institute, 2024; WHO, 2017).

A LMA é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação clonal de precursores mieloides imaturos na medula óssea, levando à falência medular e à apresentação de citopenias no sangue periférico (Döhner *et al.*, 2017). Esta doença é altamente heterogênea em termos de genética, biologia e resposta ao tratamento, o que dificulta o manejo clínico e prognóstico dos pacientes (Arber *et al.*, 2016a). A LMA é mais comum em adultos, especialmente em indivíduos acima de 60 anos, e possui uma incidência que varia de 3 a 5 casos por 100.000 pessoas por ano. Além disso, estima-se que, durante o período de 2023-2025 ocorrerão 11.540 casos de LMA (Inca, 2022). A etiologia da doença pode estar associada a fatores genéticos, exposição a agentes químicos e radiação ionizante, além de ser secundária a outras desordens hematológicas (Appelbaum *et al.*, 2001; MedlinePlus, 2021).

Dentre os subtipos da LMA, a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) se destaca por suas características morfológicas e genéticas únicas, bem como pela sua resposta específica ao tratamento com ácido all-trans-retinoico (ATRA) e trióxido de arsênio (ATO) (Lo-Coco *et al.*, 2013). A LPA é caracterizada pela translocação t(15;17), que resulta na fusão dos genes PML e RARA, levando à produção da oncoproteína PML-RAR α (Coombs *et al.*, 2015). Este rearranjo genético impede a maturação dos promielócitos, resultando em acúmulo dessas células na medula óssea. A LPA representa cerca de 5-10% dos casos de LMA e é frequentemente associada a um risco aumentado de coagulação intravascular disseminada (CID) (Arber *et al.*, 2022b; Welch *et al.*, 2012).

Embora se tenha notáveis taxas de remissão completa (RC) relatadas em mais de 90% dos pacientes com LPA e a melhora na sobrevivência a longo prazo de pacientes, a morte precoce, definida como morte ocorrida entre 0 e 30 dias após o diagnóstico, continua sendo significativa, representando de 8,2% a 32,6% da mortalidade total (Li *et al.*, 2024).

O diagnóstico das leucemias é um processo complexo que envolve uma combinação de exames clínicos, laboratoriais e de imagem. A avaliação inicial inclui hemograma completo, exames de coagulação, análise morfológica da medula óssea e estudos citogenéticos e moleculares (Hartmann *et al.*, 2019). Esses exames são essenciais para a classificação precisa do subtipo de leucemia, o que é crucial para a escolha do tratamento adequado. O tratamento das leucemias varia conforme o subtipo e pode incluir quimioterapia, terapia alvo, transplante de células-tronco hematopoéticas e, no caso da LPA, ATRA e ATO (Carbone *et al.*, 2020). No entanto, apesar dos resultados favoráveis em pacientes com LPA de baixo risco, pacientes que apresentam alto risco de mortalidade aliada a uma maior chance de recidiva geralmente não se beneficiam totalmente com a combinação destes dois medicamentos. Com isso, é evidente a necessidade de terapias alternativas que favoreçam o prognóstico de pacientes com LPA, especialmente em casos refratários ou recidivantes (Iyer *et al.*, 2023).

Derivados heterocíclicos contendo enxofre foram identificados como capazes de se ligar a uma ampla variedade de alvos proteicos específicos em células cancerígenas (Maji *et al.*, 2024). Um exemplo é o tiofeno, um heterociclo com a fórmula C_4H_4S , que possui um átomo de enxofre. Suas diversas aplicações decorrem de sua disponibilidade como subproduto da destilação de petróleo, da possibilidade de funcionalização nas posições α e β , além da síntese facilitada de moléculas e polímeros regioregulares à base de tiofeno (Kumar *et al.*, 2023).

Recentemente, a pesquisa sobre derivados de tiofeno tem se destacado no desenvolvimento de terapias antileucêmicas (Zhang *et al.*, 2021b). Esses compostos, que contêm o anel tiofênico, demonstram potencial como agentes anticancerígenos, apresentando propriedades citotóxicas e capacidade de induzir apoptose em células leucêmicas (Alam *et al.*, 2022).

Diante do exposto, torna-se fundamental a compreensão abrangente de novas alternativas terapêuticas para potencializar o tratamento, e melhorar significativamente o prognóstico dessas doenças complexas. O presente trabalho visa contribuir significativamente para o avanço da investigação de novas moléculas contra a leucemia, abordando lacunas existentes e propondo novas perspectivas. Destarte, este trabalho teve como objetivo, explorar a ação de derivados tiofênicos, com foco na atividade antineoplásica contra a Leucemia Promielocítica Aguda resistente a quimioterapia (HL-60/MX1).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação de derivados tiofênicos nas vias de sinalização celular em linhagem de leucemia aguda resistente ao tratamento quimioterápico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200 em células da linhagem leucêmica resistente HL-60/MX1;
- Identificar as proteínas e vias de sinalização que foram modulados positiva e negativamente pelos derivados tiofênicos;
- Investigar os principais processos celulares alterados após o tratamento com os derivados tiofênicos através de ensaios *in vitro* utilizando a linhagem HL-60/MX1.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEUCEMIA

O câncer é um conjunto de doenças que abrange mais de 100 diferentes tipos de neoplasias malignas. De natureza multifatorial e complexa, ele é causado por uma combinação de fatores que incluem: estresse genotóxico, condições hormonais e imunológicas, agressões ambientais externas e fatores hereditários (INCA, 2022; Boaretto *et al.*, 2023). A proliferação celular descontrolada, a ausência de diferenciação celular e a invasão local do tecido adjacente são as principais características moleculares da doença. Todos os tipos tumorais são oriundos de anomalias genéticas que podem afetar duas categorias de genes: genes supressores de tumor e oncogenes, sendo estes resultantes de eventos como: mutações pontuais, ampliações gênicas e/ou translocações (Gale *et al.*, 2022).

Estudos sugerem que a capacidade de invadir, migrar, implantar e estimular com sucesso o crescimento de novos vasos sanguíneos são propriedades importantes das células que causam metástases. Conforme o câncer cresce, os nutrientes são inicialmente fornecidos por meio de difusão direta a partir da circulação sanguínea, tendo em vista que à medida que o tumor aumenta de volume, ele pode liberar fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que promovem a formação de novos vasos sanguíneos, essenciais para sustentar o seu crescimento contínuo (Gale *et al.*, 2022). Uma ampla gama de processos malignos envolvendo diferentes tipos de tumores e uma diversidade crescente de subtipos incorpora diversas alterações, habilidades e características adquiridas que surgem de desafios específicos dos tecidos superados durante trajetórias particulares de desenvolvimento tumoral (**Figura 1**) (Hanahan, 2022).

Figura 1 - Fenótipos característicos associados à carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Hanahan, (2022).

Os cânceres podem ser divididos em sólidos e hematopoiéticos, que vão se diferenciar pela origem e localização do tumor. Enquanto os cânceres sólidos, que podem ser carcinomas ou sarcomas, são tumores palpáveis e visíveis em exame de imagem, os cânceres hematopoiéticos se desenvolvem na medula óssea ou no sistema linfático. Estes tipos tumorais afetam diretamente a produção e a diferenciação das células sanguíneas e incluem as leucemias, os linfomas e o mieloma múltiplo (Montironi *et al.*, 2021).

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos, marcada por um crescimento anormal e descontrolado dessas células na medula óssea, substituindo as células sanguíneas normais (American Cancer Society, 2024). Devido à sua natureza medular e estreita associação com o sistema sanguíneo, tende a se disseminar facilmente, apresentando manifestações sistêmicas, embora não haja compreensão total das suas causas (Pelcovits e Niroula, 2020).

Segundo a classificação estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a qual é amplamente utilizada como referência para o diagnóstico e direcionamento de tratamento dessas doenças, existem mais de 12 tipos de leucemias, sendo os quatro principais identificados como leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (INCA, 2022). Esta classificação leva em

consideração vários aspectos, incluindo características morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas, moleculares e clínicas das células leucêmicas. Um outro critério de classificação existente foi proposto pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1982, em que as leucemias podem ser enquadradas de M0 a M7, baseando-se nas alterações morfológicas observadas (Bortolheiro *et al.*, 2006).

A incidência desses tipos de leucemia geralmente aumenta com a idade, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, com subtipos predominantes variando de acordo com a idade: LLA é mais comum em crianças com menos de 15 anos, enquanto LLC e LMA são mais frequentes em indivíduos adultos (American Cancer Society, 2022; Juliusson *et al.*, 2016).

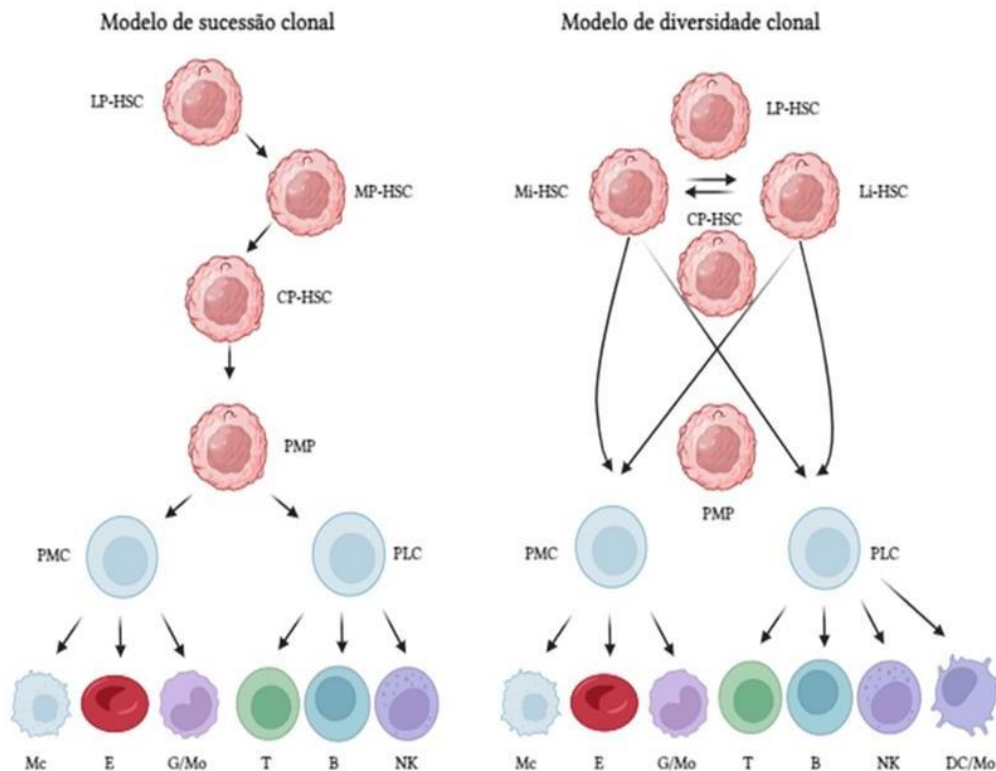
Em processos normais, as células-tronco hematopoiéticas (do inglês, Hematopoietic Stem Cells - HSCs) são responsáveis pela geração constante de células sanguíneas através da autorrenovação e diferenciação resultando na formação e sustentação de um clone ao longo da vida. Elas estão localizadas em nichos teciduais específicos e são reguladas por sinais ambientais complexos, como a hipóxia (Greenbaum *et al.*, 2013; Ribatti *et al.*, 2023).

Para garantir a homeostase, as HSCs recebem auxílio das células reticulares que produzem fatores como o fator derivado do estroma 1 (do inglês, SDF-1) e o fator de células-tronco (do inglês, SCF), que são fatores essenciais para guiar as HSCs para seus locais de ação e garantir sua sobrevivência (Ding *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2017). Estas células podem ser classificadas em três categorias com base em sua capacidade de repovoar a hematopoiese: HSCs de curto prazo (CP-HSC), HSCs de médio prazo (MP-HSC) e HSCs de longo prazo (LP-HSC).

As CP-HSCs podem criar clones diferenciados por 4 a 6 semanas, enquanto as MP-HSCs mantêm uma progênie diferenciada por 6 a 8 meses antes de desaparecerem. As LP-HSCs, juntamente com a célula progenitora multipotente (PMP), podem sustentar a hematopoiese indefinidamente, originando os progenitores linfóides comuns (PLCs) e os progenitores mielóides comuns (PMCs) (Beerman *et al.*, 2017; Benveniste *et al.*, 2010). Enquanto a LP-HSC é fundamental para manter a homeostase hematopoiética ao longo da vida, destacando sua importância na preservação das características das células-tronco hematopoiéticas (Mendelson *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2022).

A diferenciação dessas populações de células progenitoras leva à formação de populações de células efectoras periféricas em cada linhagem, como células B e T na linhagem linfóide, ou eritrócitos e neutrófilos na linhagem mielóide (Adams *et al.*, 2006; Kawamoto *et al.*, 2010; Villani *et al.*, 2017). Um melhor entendimento dos dois modelos aqui discutidos pode ser observado esquematicamente através da **Figura 2**.

Figura 2 – Diferentes modelos de diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (HSCs).



Li-HSC - Células-Tronco Hematopoiéticas de Longo Prazo, do inglês Long-Term Hematopoietic Stem Cells; Mi-HSC - Células-Tronco Hematopoiéticas de Médio Prazo, do inglês Middle-Term Hematopoietic Stem Cells.

Fonte: Adaptado de Testa *et al.*, (2010).

O modelo clássico da hierarquia hematopoiética, conhecido como modelo de sucessão clonal, sugere que todas as células maduras encontradas no sangue periférico descendem de uma única HSC de longo prazo (Jordan *et al.*, 1990).

Em contrapartida, o modelo alternativo, denominado modelo de diversidade clonal, sugere que diferentes tipos de HSCs possam contribuir para a formação de todas as linhagens celulares, embora essa contribuição seja altamente direcionada e influenciada por estímulos do microambiente (Lu *et al.*, 2014).

Segundo um paradigma estabelecido há várias décadas, a HSC inicialmente origina o PMP, que perde a capacidade de se renovar, mas mantém um amplo potencial de diferenciação. Subsequentemente, por meio da diferenciação dos PMPs, surgem o PMC, responsável pela geração de todas as linhagens de células mieloide, e o PLC, capaz de gerar todas as células linfoides, incluindo linfócitos B, T e NK (Carroll *et al.*, 2018). A redução da capacidade funcional das LP-HSC e das CP-HSPC é uma característica proeminente do envelhecimento

das células-tronco e de diversos distúrbios hematopoéticos, especialmente no contexto do desenvolvimento e progressão de doenças malignas hematopoéticas (Carroll *et al.*, 2018).

A perda da regulação normal da hematopoiese ocorre dentro desses tipos de cânceres, embora a doença progrida por meio da diferenciação e expansão clonal de grupos de células progenitoras, resultando, por fim, em uma falta de maturação terminal em tipos celulares funcionais na periferia. Essa constatação levou à descoberta da célula-tronco do câncer (CSC), mais precisamente conhecida como célula-tronco leucêmica (Pollyea *et al.*, 2017). Essas células alteradas não desempenham suas funções corretamente, reproduzindo-se em ritmo acelerado e com uma taxa de mortalidade inferior às células normais, resultando na substituição gradual das células sanguíneas saudáveis na medula óssea por células cancerosas anormais (Bispo *et al.*, 2020; INCA, 2024).

Existem duas vias pelas quais a leucemia pode surgir. Inicialmente, uma célula-tronco saudável pode adquirir uma série de mutações, originadas de diversos eventos genéticos, e subsequentes mudanças epigenéticas, afetando seu crescimento, conferindo resistência à apoptose e interferindo na diferenciação de sua descendência (Testa *et al.*, 2010). Em segundo lugar, células parcialmente diferenciadas podem recuperar padrões de atividade genética que permitem a reativação das características únicas de autorrenovação das células-tronco, enquanto também afetam sua capacidade de diferenciação posterior (Kosan *et al.*, 2016).

No contexto molecular, as leucemias são caracterizadas por anomalias cromossômicas e mutações genéticas que desempenham um papel crucial na patogênese da doença. Pesquisas recentes têm fornecido *insights* sobre como essas alterações genéticas afetam as células hematopoéticas e o microambiente medular, contribuindo para o desenvolvimento da leucemia (Papaemmanuil *et al.*, 2016).

Estudos em modelos animais têm demonstrado a importância de determinados genes, como Rarg, Rb1 e Mib1, na predisposição para neoplasias mieloproliferativas (NMP), estágio precursor da leucemia mieloide aguda, destacando a interconexão entre genética e patogênese (Kuek *et al.*, 2021). Considerando o papel central das anomalias cromossômicas e mutações genéticas na patogênese das leucemias, é crucial entender como esses eventos moleculares específicos se manifestam na leucemia mieloide aguda LMA e, no seu subtipo, LPA.

3.1.1 Leucemia mieloide aguda (LMA)

A leucemia mieloide aguda (LMA) representa uma condição complexa e heterogênea, caracterizada pela proliferação descontrolada e diferenciação anormal de uma população clonal

de células-tronco mieloides, o que leva à perturbação da hematopoiese e à insuficiência da medula óssea (Papaemmanuil *et al.*, 2016). Esta forma de leucemia é predominantemente observada em adultos, constituindo cerca de 80% de todos os casos, e exibe uma grande diversidade em termos de apresentações clínicas, características morfológicas e imunofenótipos (Wakiti e Mewawalla, 2018; Weinberg *et al.*, 2023).

Normalmente, a LMA surge de mutações genéticas aleatórias nas HSCs, assim como em outros progenitores mieloides que possuem a capacidade de se autorrenovar e espalhar o clone leucêmico em indivíduos saudáveis (Döhner *et al.*, 2022). As principais anormalidades citogenéticas recorrentes na LMA incluem $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q12)$ e $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$. Ademais, uma série de anomalias cariotípicas, como monossomias dos cromossomos 5 e/ou 7, deleção do braço longo do cromossomo 5, e anormalidades do braço longo do cromossomo 3, como $inv(3)(q21q26)$ e $t(3;3)(q21;q26)$, além de cariótipos complexos, estão associadas a uma resposta fraca à terapia inicial e a um risco significativamente aumentado de recidiva (Padmakumar *et al.*, 2021).

Fatores indiretos também desempenham um papel no desenvolvimento da LMA, incluindo distúrbios mieloproliferativos, síndrome mielodisplásica, hemoglobinúria paroxística noturna e anemia aplástica. Essas condições podem gerar mutações que ativam uma cascata de eventos, levando à expansão e disseminação de clones leucêmicos em indivíduos anteriormente saudáveis (Döhner *et al.*, 2022; Wakiti e Mewawalla, 2018). A apresentação clínica da LMA é marcada pela proliferação anormal de células mieloides pouco diferenciadas na medula óssea, no sangue periférico e, por vezes, em outros tecidos, resultando em uma série de sintomas, incluindo aumento dos glóbulos brancos e sinais de comprometimento da função da medula óssea, como anemia e trombocitopenia (Döhner *et al.*, 2022).

Atualmente, os avanços na ciência genética e molecular têm desempenhado um papel fundamental na evolução do diagnóstico e tratamento da LMA. Métodos avançados de análise, como a citometria de fluxo, citogenética e sequenciamento de próxima geração, estão sendo cada vez mais utilizados no diagnóstico e investigação da doença (Roman Diaz *et al.*, 2024). O diagnóstico da LMA é feito pela presença de $\geq 20\%$ de blastos no sangue periférico ou na medula óssea, ou pela presença de anomalias genéticas específicas, independentemente da contagem de blastos [$t(8;21)$, $inv(16)$, ou $t(15;17)$] (Döhner *et al.*, 2022).

A base do tratamento inicial da LMA consiste em medicamentos quimioterápicos de indução, seguida por uma fase de consolidação com quimioterapia adicional e/ou transplante alogênico de células-tronco (Mishra *et al.*, 2023). A escolha do tratamento de indução inicial

depende do estado funcional do paciente, do estado biológico da doença e perfil molecular recentemente reconhecido de células de leucemia (Pelcovits e Niroula, 2020).

Em pacientes jovens e saudáveis, comumente são abordadas quimioterapias intensivas, como o regime "7+3", que combina citarabina e antraciclina (Roman Diaz *et al.*, 2024). Para pacientes idosos, terapias combinadas que incluem agentes hipometilantes e inibidores específicos, como o venetoclax (VEN) e azacitidina (AZA), estão sendo exploradas e têm mostrado eficácia na indução da apoptose em células leucêmicas (Garciaz *et al.*, 2024).

No entanto, cerca de um terço dos pacientes com LMA tratados com VEN-AZA apresentam resistência primária ao tratamento. Além disso, entre os pacientes que respondem, a remissão dura em média aproximadamente 18 meses, e quase todos acabarão por sofrer recidiva (Garciaz *et al.*, 2024).

Apesar dos avanços significativos, o diagnóstico e tratamento da LMA ainda podem apresentar desafios, e novas terapias continuam sendo investigadas para melhorar os desfechos dos pacientes. Este campo está em constante evolução, impulsionado pela pesquisa contínua e pela busca por novas abordagens terapêuticas.

3.1.2 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

Inicialmente descrita em 1957 através de três casos clínicos que foram identificados como a "forma mais maligna de leucemia aguda", a LPA é causada por um bloqueio na diferenciação, em que as células leucêmicas ficam interrompidas na fase de promielócitos, correspondendo por cerca de 10 a 15% dos novos casos de LMA (Hillestad, 1957; Chale *et al.*, 2019). Em cerca de 95% dos casos, observa-se uma translocação cromossômica balanceada específica entre os cromossomos 15 e 17 t(15;17)(q24;q21), resultando na formação da proteína de fusão PML-RAR α (Kakizuka *et al.*, 1991). Em 10% dos casos, uma análise citogenética bem-sucedida pode não detectar a translocação clássica t(15;17) (Jimenez *et al.*, 2020). Entretanto, na maioria desses casos, uma análise molecular revela a presença do transcrito de fusão PML-RAR α , formado devido a eventos de inserção criptograficamente complexos ou ocultos (Jimenez *et al.*, 2020).

O PML-RAR α promove dois impactos principais: desregula o controle transcricional ao agir como um repressor dos genes alvo do RAR α e compromete a função homeostática do PML, que atua como supressor tumoral. O RAR α é um fator de transcrição dependente de ligante que se liga aos receptores retinoides X (RXR) para formar heterodímeros

transcricionalmente ativos (Noguera *et al.*, 2019). As variantes genéticas da LPA que não envolvem a fusão do gene PML:RAR α são muito raras e constituem < 2% de todos os casos de LPA (Castelijn *et al.*, 2023).

Clinicamente, a LPA é caracterizada pela tendência à hemorragia grave devido à fibrinólise, acompanhada de trombocitopenia com predomínio de promielócitos anômalos no sangue periférico com um desfecho fatal rápido. Geralmente, os sintomas incluem níveis elevados de leucócitos (WBC), contagem baixa de plaquetas, distúrbios na coagulação e sangramentos, exigindo um diagnóstico e tratamento rápidos (Yilmaz *et al.*, 2021).

A LPA tende a afetar pacientes mais jovens em comparação com outros tipos de LMA, onde a idade média ao diagnóstico de LPA é aproximadamente 40 anos, em contraste com a idade média de 70 anos observada na LMA não-LPA (Cicconi *et al.*, 2016). Atualmente, o uso do ácido all-trans retinoico (ATRA) e do trióxido de arsênico (ATO) tem sido fundamental para melhorar as taxas de cura da LPA. Esses agentes têm a vantagem de serem diferenciadores em baixas doses, ao contrário dos agentes quimioterápicos citotóxicos tradicionais (Yilmaz *et al.*, 2021).

Contudo, a síndrome de diferenciação (SD), anteriormente conhecida como síndrome de ATRA, é uma complicação potencialmente fatal que geralmente surge nos primeiros dias ou semanas de terapia com ATRA contra a LPA. Dispneia, derrame pleural, febre, ganho de peso, edema periférico, hipotensão e insuficiência renal aguda são as características evidentes. Um diagnóstico preciso de SD muitas vezes não é possível devido à frequência de outras condições clínicas que mimetizam os sintomas, como sangramento, infecção e sepse (Chen *et al.*, 2024). Por isso, corticosteroides profiláticos têm sido utilizados em ensaios clínicos prospectivos e são recomendados para prevenir a SD em todos os pacientes com LPA recém-diagnosticada, especialmente aqueles com doença de alto risco. A terapia com ATRA mais ATO deve ser suspensa em pacientes com SD grave, caracterizada pela presença de três ou mais sinais ou sintomas clínicos (Yilmaz *et al.*, 2021).

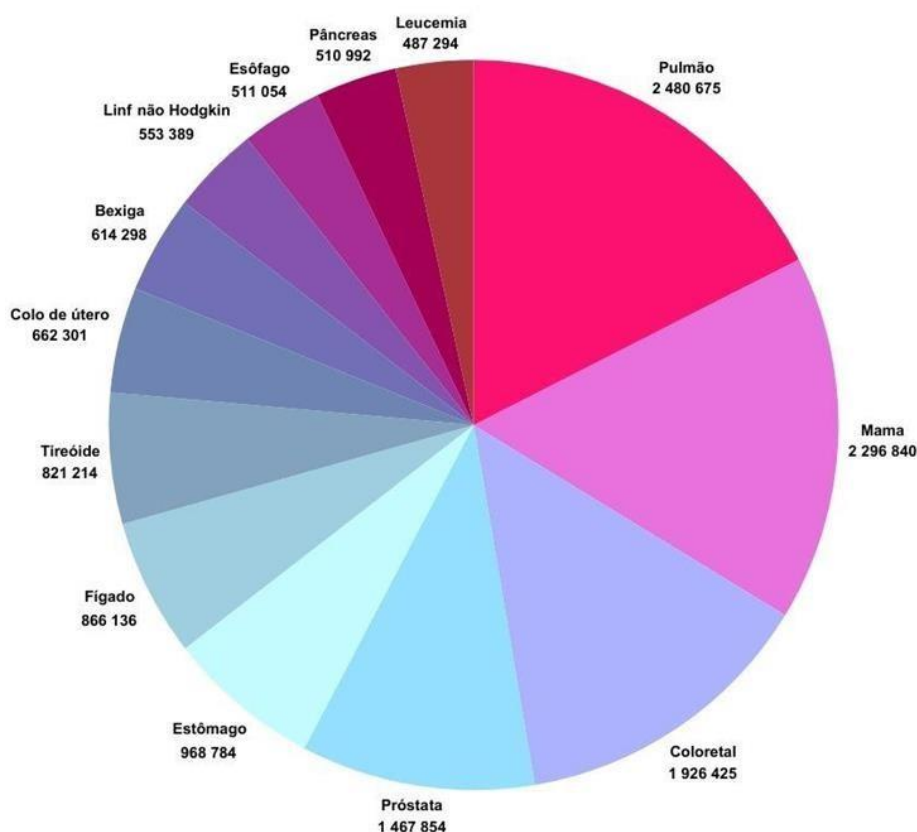
Sendo assim, é de grande importância a busca por alternativas terapêuticas capazes de mitigar esses efeitos e melhorar o prognóstico do paciente acometido pela LPA.

3.2 EPIDEMIOLOGIA

O câncer atua como o principal desafio de saúde pública global com incidências e taxas de mortalidade com alta variância entre os diferentes subtipos de tumores, refletindo a complexidade e a diversidade da doença em várias populações. De acordo com os dados da

Organização Mundial de Saúde (OMS), foram registrados cerca de 19.976.499 casos de câncer em todo o mundo em que se destacam o câncer de pulmão como câncer mais incidente, com uma estimativa de 2.480.675 novos casos, câncer de mama é o segundo mais comum com 2.296.840 casos, seguido pelo câncer colorretal com 1.926.425 casos apenas no ano de 2022 (Figura 3).

Figura 3 - Estimativa do número de casos dos 13 tipos de câncer com maior incidência em 2022 no mundo.



Fonte: Adaptado da Organização Mundial de Saúde, (2022).

Foram registrados 487.294 casos e 305.405 óbitos da leucemia em 2022 em todo o mundo. Embora o número de casos de leucemia seja menor comparado aos tipos de câncer mais prevalentes, a taxa de mortalidade relativa é significativa. Por exemplo, o câncer de próstata, com 397.430 novos casos, apresentou uma mortalidade de 102.519 óbitos, enquanto o câncer de fígado, com 758.725 novos casos, resultou em 13.599 óbitos (INCA, 2022). Essa análise indica que, embora a leucemia não seja um dos tipos tumorais mais incidentes no mundo, a sua letalidade relativa é alta.

No contexto do Brasil, o câncer de próstata apresenta a maior incidência, com 102.519 novos casos anuais, seguido pelo câncer de mama com 94.728 casos e o câncer colorretal com 60.118 novos casos. Em relação à leucemia, o país registra aproximadamente 11.859 novos casos por ano, sendo 8.790 óbitos. Embora esses números sejam menores quando comparados aos tipos de câncer mais prevalentes, a taxa de mortalidade relativa é significativamente alta (INCA, 2022).

De acordo com projeções do INCA para o triênio de 2023 a 2025, estima-se que ocorrerão aproximadamente 704 mil novos casos de câncer. Dentro desse total, prevê-se que 5.920 casos de leucemia serão diagnosticados em homens, o que equivale a uma taxa de 5,67 novos casos a cada 100.000 indivíduos do sexo masculino. Em mulheres, são esperados 4.890 novos casos de leucemia, correspondendo a uma taxa de 4,56 casos a cada 100.000 indivíduos do sexo feminino. Entre as mortes causadas por leucemia, a LMA representa a maior parte, aproximadamente 62% (Howlader *et al.*, 2021).

No Brasil, o número estimado de novos casos de LMA, segundo projeções para o mesmo triênio citado anteriormente, é de 11.540 casos, o que corresponde a um risco estimado de 5,33 por 100 mil habitantes, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres. É o sexto câncer mais frequente em homens na região Nordeste (5,54 por 100 mil) e o nono em mulheres na mesma região (5,08 por 100 mil). Além disso, foram previstos 560 casos de leucemia em Pernambuco em 2023, no entanto, o número real de casos ainda não foi divulgado até o presente momento (INCA, 2023).

A LPA, o subtipo mais comum de LMA, ocorre muito raramente antes dos 20 anos de idade e a incidência é ligeiramente maior nos homens do que nas mulheres (Cingam e Koshy, 2017). Pacientes com LPA geralmente são classificados em três categorias de risco: baixo, intermediário e alto — com base na contagem de leucócitos (WBC). Os pacientes de risco baixo e intermediário são agrupados, sendo caracterizados por uma contagem de leucócitos inferior a 10.000/ μ L. Já os pacientes de alto risco apresentam contagens de leucócitos superiores a 10.000/ μ L (Jimenez *et al.*, 2020).

A grande maioria dos pacientes com LPA alcança remissão completa após a terapia de indução e remissão molecular após a conclusão da terapia de consolidação. No entanto, cerca de 10% dos pacientes com LPA de alto risco apresentam recidiva da doença (Stahl *et al.*, 2019).

Esses dados destacam a complexidade do tratamento da leucemia e a severidade de seus efeitos, exigindo intervenções médicas avançadas e um diagnóstico precoce para melhorar os prognósticos dos pacientes.

3.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A LPA, categorizada como AML-M3 pelo sistema de classificação Franco-Americano-Britânico (FAB), é caracterizada por uma interrupção na diferenciação celular, onde as células leucêmicas ficam estagnadas no estágio dos promielócitos do processo de maturação celular. O manejo ideal da LPA exige um diagnóstico precoce, implementação de medidas de suporte intensivas, gestão adequada das complicações relacionadas ao tratamento e monitoramento da doença residual mensurável (DRM) para a presença de PML/RAR α (Noguera *et al.*, 2019).

O diagnóstico da LPA deve ser realizado de forma minuciosa e envolve várias etapas: exame físico, para a observação de sinais e sintomas importantes como manchas na pele e sangramento, punção da medula óssea, para a identificação de promielócitos, o que configura forte indicio de LPA, além disso, hemograma, afim de observar alterações como trombocitopenia e leucocitose, exame citogenético, com o intuito de identificar a translocação nos cromossomos 15 e 17 e, por fim, exames de imagem, para avaliar a presença de gânglios linfáticos aumentados ou infiltração em órgãos (Vieira *et al.*, 2023). Alguns pacientes são direcionados ao tratamento antes mesmo que obtenham os resultados dos exames, afim de evitar hemorragia. Porém, após o diagnóstico concluído, é possível conduzir o tratamento de maneira mais assertiva e eficaz.

A introdução da quimioterapia para tratar a LPA trouxe uma mudança significativa no curso da doença e nos resultados dos pacientes. Inicialmente, as terapias seguiam duas abordagens principais: uma combinação de antraciclina e citarabina, uma quimioterapia típica para leucemia mieloide aguda ainda amplamente utilizada, e monoterapia com altas doses de antraciclina, que alcançava taxas de remissão completa de 47-88% dos casos (Sanz e Lo-Coco, 2021).

As primeiras indicações das propriedades distintivas do ácido all-trans retinoico (ATRA) surgiram na década de 1980, quando a linhagem celular HL-60 foi usada como modelo para LPA. Nesse estudo pioneiro, Breitman *et al.* (1980) publicaram as primeiras evidências de que o ATRA podia induzir a diferenciação dos promielócitos em granulócitos maduros. Atualmente, o tratamento de pacientes de baixo a médio risco tem sido amplamente eficaz com a terapia combinada de ATRA e trióxido de arsênio (ATO), apresentando resultados significativos nas taxas de sobrevida em comparação ao tratamento com ATO isolado ou à combinação de ATRA com quimioterapia (Chale *et al.*, 2019; Balasundaram *et al.*, 2022).

Além disso, a combinação ATRA-ATO mostrou menor toxicidade em comparação ao ATRA-quimioterapia, estabelecendo-se como o novo padrão de tratamento para pacientes com

LPA de baixo a intermediário risco (Cingam e Koshy, 2017; Chale *et al.*, 2019). Na LPA, o ATRA tem dupla função terapêutica: ativa a transcrição de genes envolvidos na diferenciação da linhagem mieloide e degrada a oncoproteína PML-RAR α . O ATO degrada todas as espécies moleculares contendo PML, promove a apoptose nas células de LPA, tem um efeito pró-oxidante e danifica estruturas proteicas em geral, resolvendo ligações dissulfeto (Noguera *et al.*, 2019). Os regimes de indução que combinam ATRA com antraciclinas, com ou sem citarabina, demonstram taxas de remissão completa (CR) superiores a 90% em ensaios conduzidos por grupos cooperativos (O'Donnell *et al.*, 2013).

Pacientes com doença de risco baixo ou intermediário (contagem de leucócitos $\leq 10.000/\mu\text{L}$) são tratados com regimes de consolidação menos intensivos em comparação com aqueles usados para tratar pacientes de alto risco (contagem de leucócitos $> 10.000/\mu\text{L}$), dependendo do protocolo de tratamento utilizado (O'Donnell *et al.*, 2013). No entanto, pacientes de alto risco apresentam maior tendência à recidiva e ao desenvolvimento de resistência tanto ao ATRA quanto ao ATO, devido a mutações genéticas que levam à substituição de aminoácidos no domínio de ligação ao ligante RAR α (LBD) e no domínio PML-B2 de PML-RAR α , respectivamente (Noguera *et al.*, 2019). Embora ATRA e ATO tenham proporcionado uma melhoria significativa no prognóstico da LPA, as mortes precoces ainda são um fator que impacta a taxa de cura da doença. Essas mortes podem ocorrer principalmente devido à coagulopatia associada à doença e a eventos hemorrágicos (Lu *et al.*, 2021).

Embora o foco principal do tratamento de LPA esteja em ATRA e ATO, o etoposídeo pode ser utilizado como parte de regimes quimioterápicos, especialmente em pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento inicial. Em alguns protocolos de tratamento, ele pode ser combinado com outros agentes antitumorais a depender do perfil do paciente (Lu *et al.*, 2021). Este quimioterápico atua inibindo a topoisomerase II, uma enzima essencial para o desenrolamento do DNA durante os processos de replicação e transcrição. O etoposídeo interfere nesse processo, levando ao acúmulo de quebras de fita dupla no DNA, o que resulta em apoptose, especialmente em células que se dividem rapidamente, como as células leucêmicas (Grohmann *et al.*, 2018; Bailly, 2023). No entanto, assim como outros agentes antitumorais, o etoposídeo pode causar efeitos colaterais significativos, como mielossupressão, náuseas e risco aumentado para infecções (Bailly, 2023).

Um aspecto da LPA é a possibilidade de desenvolvimento da síndrome de diferenciação, que pode ocorrer durante o tratamento, apresentando-se com febre, ganho de peso e problemas respiratórios. Embora a LPA não seja classificada em estágios como outros tipos de câncer, sua avaliação se concentra na resposta ao tratamento e no controle das recidivas. O

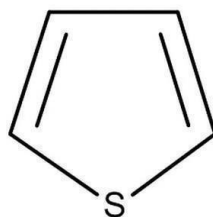
acompanhamento regular é fundamental para garantir a melhor qualidade de vida possível para os pacientes (Woods *et al.*, 2023). Neste tipo tumoral, o conceito de estadiamento não se aplica da mesma forma do que nos outros cânceres, uma vez que a LPA é uma doença hematológica e, portanto, é avaliada de maneira diferente. Em vez de um sistema de estadiamento, a LPA é monitorada com base em critérios clínicos e laboratoriais que ajudam a avaliar a gravidade da doença e a resposta ao tratamento, como contagem de leucócitos, avaliação de sintomas clínicos, exame de coagulação e análise da medula óssea (Instituto Camargo Center, 2024).

Dessa forma, a alta taxa de mortalidade precoce associada à leucemia combinada a complexidade genética da doença e ao desenvolvimento de resistência medicamentosa em pacientes de alto risco, refletem a necessidade de aprimorar as opções de tratamento disponíveis, com o surgimento de novas drogas que obtenham efeito citotóxico com o mínimo de reações adversas possíveis. Estratégias como o diagnóstico precoce, tratamentos personalizados e o desenvolvimento de novas terapias são cruciais para aumentar a sobrevida dos pacientes.

3.4 DERIVADOS TIOFÊNICOS

Os tiofenos são compostos heterocíclicos que possuem um anel de cinco membros, sendo quatro carbonos e uma molécula de enxofre (**Figura 4**) (Singh; Singh; Bedi, 2020). O nome "tiofeno" foi derivado das palavras gregas 'theion', que significa enxofre e 'phaino', que significa brilhante (Mishra *et al.*, 2011). A estrutura do tiofeno é encontrada em fontes naturais, como petróleo e carvão, e manifestam-se como um líquido incolor, solúvel em água, com odor similar ao benzeno à temperatura ambiente (Stefani., 2009). O anel tiofênico tem sido amplamente utilizado na síntese de derivados por conta de suas propriedades estruturais e químicas únicas, que conferem uma ampla atividade biológica, incluindo anti-inflamatória (Mota *et al.*, 2020; Da cruz *et al.*, 2021), antitumoral (Pathania *et al.*, 2020), antinociceptiva (Mota *et al.*, 2020), anticonvulsivante (Deep *et al.*, 2016) e antibacteriana (Lahsasni *et al.*, 2018).

Figura 4. Estrutura anel tiofeno.



Fonte: Adaptado de Vallan *et al.* (2021).

A ampla atividade biológica dos tiofenos é atribuída à sua estrutura molecular, que facilita interações com diversos alvos biológicos. Entre os fatores que contribuem para essa ampla atividade biológica, destacam-se as interações moleculares, as propriedades farmacofóricas e o isosterismo. Em relação às interações moleculares, os tiofenos possuem a capacidade de interagir com proteínas como enzimas e receptores celulares devido à sua estrutura molecular versátil, permitindo-lhes desempenhar múltiplas funções biológicas (Hu *et al.*, 2013). Adicionalmente, a estrutura dos tiofenos pode ser modificada para aumentar a afinidade com alvos específicos no organismo ou ser empregada como isósteros no desenvolvimento de fármacos (Kilbourn, 1989, Sztanke; Rzymowska; Sztanke, 2015), promovendo a melhoria da eficácia e a seletividade dos compostos, além de reduzir os possíveis efeitos adversos e garantir características físico-químicas superiores.

A atividade antitumoral deste grupo de compostos tem sido largamente reportada na literatura científica. Diferentes derivados de tiofeno foram avaliados quanto à atividade antitumoral contra a linhagem celular de câncer de mama humana MCF-7, sendo que o composto 12 ((Z)-3-(3-Metilisoxazol-5-ilamino)-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona, possui os seguintes substituintes: um grupo 3-metilisoxazol em uma extremidade e um grupo tiofeno na outra extremidade) e 14 (derivado da quinolin-3-amina, possui os seguintes substituintes: uma porção de quinolina) mostraram quatro vezes mais atividade antitumoral quando comparado com a doxorrubicina (Ghorab; Bashandy; Al-said, 2014). Um estudo realizado por Dos Santos *et al.* (2018) investigaram a atividade antitumoral de derivados de tiofeno na linhagem celular MCF-7. Os resultados demonstraram uma significativa atividade citotóxica, bem como seletividade e eficácia comparável à da doxorrubicina. Adicionalmente, observou-se que os derivados de tiofeno induziram a parada do ciclo celular na fase G0/G1, sugerindo um potencial mecanismo de ação para o tratamento do câncer de mama.

Um estudo realizado por De oliveira *et al.* (2015) avaliaram a atividade antitumoral de derivados de tiofeno-tiossemicarbazona em linhagens de células tumorais humanas. Os compostos 7 (E)-N-(p-tolil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-tiossemicarbazona, que apresenta um

substituinte p-tolil (para-metilfenil) e um grupo tiofen-2-ilmetileno) e composto 9 ((E)-N-(naftalen-1-il)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-tiossemicarbazona, que possui um substituinte naftalen-1-il juntamente com o grupo tiofen-2-ilmetileno) exibiram atividade antitumoral promissora após 48 horas de tratamento. Observou-se que o composto 7 induziu a exposição precoce de fosfatidilserina como um mecanismo de sinalização de morte celular, sem alterar o perfil do ciclo celular. Adicionalmente, o composto 7 demonstrou baixa toxicidade aguda *in vivo* e foi capaz de inibir o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos.

O estudo realizado por Zhang *et al.* (2021b) avaliou os derivados de imidazo[1,2-a]piridina-tiofeno como inibidores de FLT3 e mutantes de FLT3 para leucemia mieloide aguda (LMA). Os resultados mostraram que os compostos 5e (4-fluorofenil ligado ao tiofen-2-il e um grupo 1-metil-1H-pirazol-4-il ligado à posição 7 da imidazo[1,2-a]piridina) e 5g (2,6-dimetoxifenil ligado ao tiofen-2-il e um grupo 1-metil-1H-pirazol-4-il ligado à posição 7 da imidazo[1,2-a]piridina) competem com o ATP na ligação ao bolso de FLT3, confirmando que são inibidores do tipo I. Esses compostos se ligam ao FLT3 na conformação ativa "DFG-in", o que pode ajudar a superar mecanismos de resistência causados por mutações, como a mutação D835. No ensaio de apoptose, as células MOLM14 foram tratadas com o composto 5, e o resultados mostraram que o composto induziu apoptose nas células, demonstrando seu mecanismo de ação anti-proliferativo.

Uma série de novos compostos heterocíclicos, incluindo anéis de tiofeno, foi sintetizada a partir do 4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno. Os derivados foram avaliados quanto à sua atividade antitumoral em linhagens celulares humanas HepG2, MCF7 e HCT116, sendo comparados à doxorrubicina, uma droga de referência. Os derivados de tiofeno mostraram potencial atividade antitumoral contra a linhagem de câncer colorretal, promovendo o aumento da apoptose e a inibição da tirosina quinase (El-metwally *et al.*, 2018). Diante das evidências encontradas na literatura, pode-se afirmar que os derivados tiofênicos têm alta versatilidade estrutural e apresentam uma diversidade de atividades biológicas, atraindo o interesse de pesquisadores de todo o mundo no campo da química medicinal. Dessa forma, busca-se compreender os efeitos de novos tiofenos frente à linhagem de leucemia mieloide aguda e as consequentes alterações na expressão do conjunto de proteínas que compõe o microambiente desse tipo tumoral.

3.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

As proteínas são os produtos do processo de decodificação que se inicia com a informação contida no DNA celular (Kadakeri *et al.*, 2020). Essas macromoléculas desempenham uma função fundamental em vários processos biológicos, que auxiliam na predição e/ou detecção de estágios específicos de desenvolvimento, eventos fisiológicos e patológicos (Macklin; Khan; Kislinger, 2020). A fim de avaliar as proteínas expressas em um determinado sistema biológico, vários grupos de pesquisa têm como objetivo compreender a expressão, regulação e função das proteínas por meio da abordagem proteômica (Kwon *et al.*, 2021). Esta metodologia não permite apenas avaliar o perfil de expressão de proteínas, mas também investigar modificações pós-traducionais (Zhu *et al.*, 2022), interações entre proteínas para compreender redes de interação e vias de sinalização celulares (Elhabashy *et al.*, 2022), mecanismos moleculares subjacentes a processos fisiológicos e patológicos, como crescimento tumoral (Kopylov *et al.*, 2022), metástase (Neophytou *et al.*, 2021) e resistência a medicamentos (Zeng *et al.*, 2021), dentre outros.

Existem diferentes metodologias proteômicas disponíveis para investigar a expressão e a função das proteínas em sistemas biológicos, cuja importância é essencial para nossa compreensão sobre aspectos fisiológicos e/ou patológicos. Os métodos clássicos para análise quantitativa de misturas complexas de proteínas envolvem a separação e comparação das mesmas por meio de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), seguida de espectrometria de massa (Simula *et al.*, 2009; Strohkamp; Gemoll; Habermann, 2016) ou identificação em *tandem* de espectrometria de massa (Guo *et al.*, 2023). Nestes procedimentos, a quantificação das proteínas específicas é realizada utilizando a intensidade de pixels associada a cada proteína. No entanto, os *spots* observados em um gel 2D-PAGE frequentemente compreendem múltiplas proteínas, o que torna a quantificação desafiadora, uma vez que não podemos distinguir qual proteína no *spot* está alterada. Além disso, a abordagem proteômica empregando a 2D-PAGE está sujeita às limitações impostas pelo método, que incluem uma faixa limitada de pH, dificuldade na detecção de proteínas com reduzida abundância ou com diferentes pesos moleculares e valores de pontos isoelétricos extremos (Lee; Saraygord-Afshari; Low, 2020).

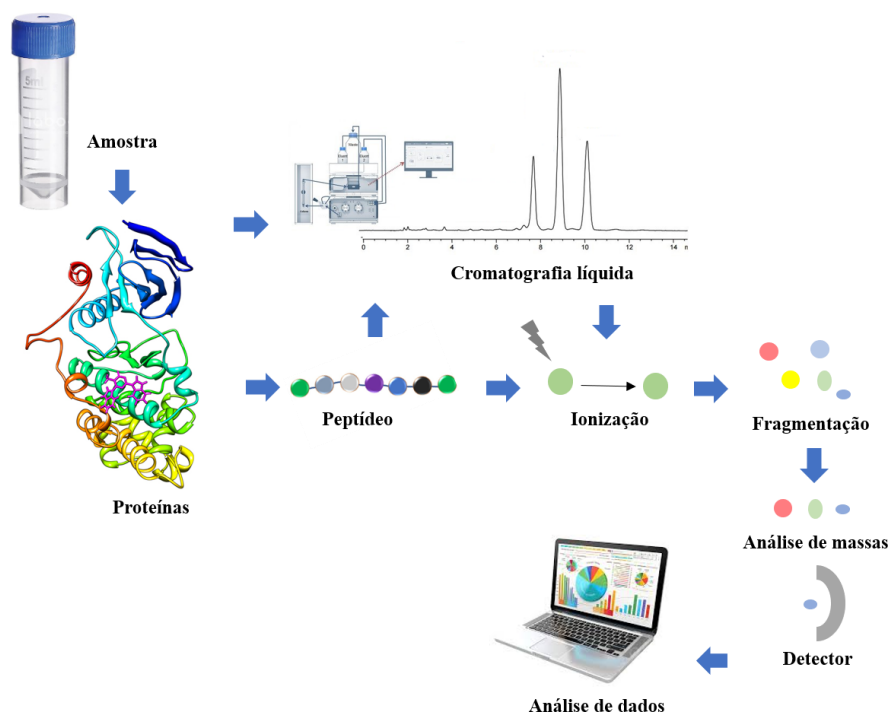
Em seguida, as técnicas de proteômica *shotgun*, caracterizadas pela análise direta dos peptídeos resultantes da digestão de uma mistura complexa de proteínas (proteômica do tipo *bottom-up*) (Dupree *et al.*, 2020) ou não (proteômica do tipo *top-down*) (Brown *et al.*, 2020) foram utilizadas para a análise quantitativa de proteínas. Em contraste com a abordagem

utilizada no gel 2D-PAGE, as proteínas são extraídas de uma amostra biológica de interesse e digeridas enzimaticamente ou quimicamente, e os peptídeos fragmentados são separados com auxílio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (Brown *et al.*, 2020). Por meio de algoritmos computacionais como SEQUEST ou MASCOT, é conduzida uma busca nos espectros de massas correspondentes às disponíveis em bancos de dados, visando identificar as proteínas (Karabacak *et al.*, 2009).

A proteômica *label-free* é uma abordagem analítica de quantificação de proteínas do tipo *shotgun* sem a necessidade do uso de rótulos ou marcadores químicos. Nesse método, as amostras são analisadas por espectrometria de massa de alta resolução e os dados brutos são processados para identificar e quantificar as proteínas presentes. As etapas no fluxo de trabalho da proteômica *label-free* consistem na identificação de peptídeos, detecção de características e correspondência dessas características com identidades de peptídeos. O processamento dos dados brutos da espectrometria de massa é essencial para a precisão e sensibilidade da quantificação (Zhao *et al.*, 2020).

A **Figura 5** representa o fluxo de trabalho típico de uma análise proteômica por espectrometria de massas. Inicia-se com a obtenção de uma amostra biológica contendo proteínas, que são extraídas e digeridas em peptídeos menores. Esses peptídeos são separados por cromatografia líquida, processo que utiliza uma coluna para diferenciá-los com base em suas propriedades químicas. Em seguida, os peptídeos são ionizados, gerando íons que passam por uma etapa de fragmentação, essencial para determinar suas sequências de aminoácidos. Na etapa de análise de massas, os fragmentos ionizados são separados conforme suas razões massa/carga e detectados. Os dados obtidos pelo espectrômetro de massas são então processados e analisados por um software, permitindo a identificação das proteínas presentes na amostra.

Figura 5. Etapas da proteômica label-free LC/MSMS.



Fonte: Autora (2024)

Diferentes metodologias proteômicas, essenciais para entender a expressão e função das proteínas em sistemas biológicos, incluem a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) seguida de espectrometria de massa, que permite a comparação quantitativa de misturas complexas de proteínas (Simula *et al.*, 2009; Strohkamp; Gemoll; Habermann, 2016; Guo *et al.*, 2023; Lee; Saraygord-Afshari; Low, 2020). A proteômica *shotgun*, tanto do tipo bottom-up quanto top-down, oferece uma análise mais direta de peptídeos resultantes da digestão de proteínas, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (Dupree *et al.*, 2020; Brown *et al.*, 2020). A abordagem *label-free*, uma técnica analítica poderosa, tem sido aplicada na pesquisa oncológica, permitindo a identificação de proteínas diferencialmente expressas em câncer gástrico (Song *et al.*, 2020) e biomarcadores em exossomos de pacientes com câncer de endométrio (Sommella *et al.*, 2022). Além disso, estudos sobre resistência a medicamentos em câncer de pulmão identificaram proteínas com potencial valor terapêutico e diagnóstico (Efeogl *et al.*, 2022). Pesquisas sobre mecanismos de ação de compostos antitumorais revelaram interações proteicas significativas, como a proteína HMGB1 em resposta à cisplatina e a indução de alterações na expressão proteica mediada por paládio (Du *et al.*, 2014; Tušek-Božić *et al.*, 1998). A identificação da nicotinamida N-metiltransferase (NNMT) como um modulador metabólico nos fibroblastos associados ao

câncer destaca sua relevância na regulação do microambiente tumoral (Eckert *et al.*, 2019) (Tabela 01)

Tabela 01. Técnicas proteômicas identificadas em diferentes estudos

Metodologia	Descrição	Referências
2D-PAGE seguida de espectrometria de massa (<i>Tandem MS</i>)	Separação de proteínas por eletroforese em gel, seguida por espectrometria de massa (EM). Desafio ocorre pela presença de múltiplas proteínas nos <i>spots</i> .	Simula et al., 2009; Strohkamp et al., 2016
Proteômica <i>shotgun</i> (<i>bottom-up</i>)	Conhecida como "proteômica de peptídeos". Utiliza-se cromatografia líquida e EM em <i>tandem</i> .	Dupree et al., 2020
Proteômica <i>shotgun</i> (<i>top-down</i>)	Avalia proteínas intactas, sem digestão prévia. As proteínas ionizadas são analisadas por EM, identificando isoformas e modificações pós-traducionais.	Brown et al., 2020
Proteômica <i>label-free</i>	Quantifica proteínas sem uso de marcadores. Emprega EM de massa de alta resolução e análise computacional.	Song et al., 2020 Sommella et al., 2022 Efeogl et al., 2022 Du et al., 2014 Eckert et al., 2019

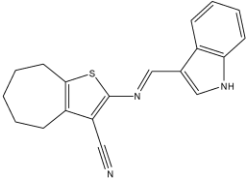
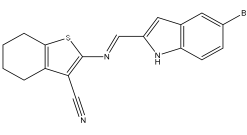
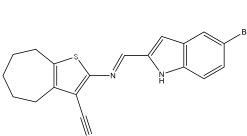
No presente estudo, foi adotada uma metodologia *label-free* Nano-LC/MSMS, em que inicialmente ocorre a digestão proteica, envolvendo a redução das ligações dissulfeto, posterior fragmentação por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) e conversão das proteínas em íons através de uma fonte de ionização. Em seguida, os íons são detectados com base na sua relação massa/carga (m/z) pelo espectrômetro de massas, utilizando o tempo de voo (TOF). Por fim, os espectros são gerados por meio do analisador de massas, seguido pela análise dos dados obtidos.

4. MÉTODOS

4.1 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Para a análise do efeito antitumoral e dos respectivos mecanismos de ação, foram empregados os derivados tiofênicos SB200, SB44 e SB83, os quais foram sintetizados previamente por Mendonça-Júnior *et al.*, (2011) e cedidos em colaboração pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Estadual da Paraíba. As informações referentes ao nome químico, fórmula molecular e massa molar dos derivados estão presentes no **Quadro 1**.

Quadro 1. Caracterização dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200.

Derivados tiofênicos	Nome do derivado	Fórmula estrutural	Fórmula Molecular	Massa molar (g/mol)
SB44	2-[(1H-Indol-3-ylmethylene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile		C ₁₉ H ₁₇ N ₃ S	319,11
SB83	2-[(5-Bromo-1H-indol-2-ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]thiophene-3-carbonitrile		C ₁₈ H ₁₄ BrN ₃ S	384,29
SB200	2-(((5-Bromo-1H-indol-2-yl)methylene)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile		C ₁₉ H ₁₆ BrN ₃ S	398,32

Fonte: A autora (2024).

4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM LEUCÊMICA HL-60/MX1

A linhagem leucêmica HL-60/MX1, proveniente do banco de células do *American Type Cell Culture* (ATCC®; EUA), foi utilizada nesse estudo. Essa linhagem celular exibe resistência ao mitoxantrona (39 nM), resistência a múltiplas drogas (MDR) atípica, atividade catalítica de

topoisomerase II alterada e níveis reduzidos das telomerasas II α e β . Adicionalmente, esta célula apresenta resistência cruzada à teniposido, bisantreno, actinomicina, daunorrubicina e doxorubicina.

No tocante ao cultivo e manutenção da linhagem, as células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®, UK), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®, UK), HEPES 10 mM (Gibco®, UK), 200 U/mL de estreptomicina e penicilina (Gibco®, UK), e incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C. É importante mencionar que a troca de meio foi realizada sempre que necessário, com intuito da manutenção da viabilidade celular, tendo em vista que o *double time* (tempo de duplicação) da linhagem HL-60/MX1 é de 28 horas.

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS LEUCÊMICAS

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada pelo método colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®) em cristais de formazan. As células da linhagem HL-60/MX1 foram plaqueadas com 4×10^6 células por poço em uma placa de 96 poços e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram tratadas com os compostos SB200, SB44 e SB83 em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 10, 25 e 50 μ M) por 72 horas (37°C; 5% de CO₂). Além disso, utilizou-se como veículo na diluição dos compostos e controle negativo o DMSO 0,1%, além do quimioterápico etoposídeo na concentração de IC₅₀ (5,32 μ M) (Sigma-Aldrich®, EUA) como controle positivo nos experimentos. Decorrido o período de tratamento, 20 μ L de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço, e as placas foram incubadas novamente em estufa (37°C; 5% de CO₂) por um período de três horas. Em seguida, 130 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% foram adicionados em cada poço. Após a dissolução completa dos cristais de formazan, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Fisherbrand™ AccuSkan™ FC, Fisher Scientific®) (Biotek®, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

Antes da realização do ensaio, as células foram expostas ao corante azul de tripan a 0,4%, diluído em PBS. Este corante é capaz de penetrar nas células com membranas comprometidas, ligando-se às proteínas intracelulares e conferindo uma coloração azulada a essas células. Posteriormente, as células foram contabilizadas manualmente, confirmando a viabilidade das mesmas. Os experimentos foram realizados em triplicata, e a média da viabilidade de cada experimento foi calculada com base no valor obtido para o controle contendo DMSO a 0,1% dissolvido em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%.

A partir das viabilidades celulares, a concentração inibitória 50% (IC₅₀) dos compostos foi determinada com auxílio do GraphPad Prism 8 e do Microsoft Office Excel 2016.

4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E DIGESTÃO TRÍPTICA

As células da linhagem HL-60/MX1 foram tratadas com os derivados tiofênicos SB200, SB44 e SB83 nas concentrações de IC₅₀ e, após 72 h, as proteínas produzidas foram extraídas a partir da homogeneização com 200 µL de tampão de lise frio contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), 10 mM de ácido etilenoglicol-bis(β-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), 50 mM NaF, 20 mM KCl e 250 mM NaCl suplementado com 1 µL de coquetel inibidor de protease (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) e inibidor de fosfatase (20 mM ortovanato de sódio (Na₃VO₄) e 1 µM ácido ocladaico). Após 1 hora de incubação a 4°C, as amostras foram submetidas ao processo de congelamento e descongelamento por duas vezes em nitrogênio líquido. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 12.000 g por 30 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado -80°C. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Após a quantificação das proteínas, as amostras foram concentradas 39× e tiveram o tampão trocado por bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ 50 mM) usando um dispositivo de ultrafiltração de 3 kDa (Millipore, Billerica, MA). No total, 200 µg de proteína foi desnaturada (0,1% RapiGest SF a 60°C por 15 min; Waters, Milford, MA), reduzida com ditioneitol (DTT) 10 mM a 60°C por 30 min, alquiladas com iodoacetamida 10 mM por 30 min à temperatura ambiente no escuro, e digerido enzimaticamente com tripsina a uma proporção de 1:50 enzima/proteína (Promega, Madison, WI). A digestão foi interrompida pela adição de 10 µL de 5% de TFA. Como padrão interno foi utilizado o álcool desidrogenase de levedura (ADH; P00330, Waters), adicionado a uma concentração final de 10 fmol/µL para quantificação absoluta.

4.5 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA LABEL-FREE POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS

Os experimentos qualitativos e quantitativos nano UPLC ESI HDMSE foram conduzidos com um sistema ACQUITY UPLC (Waters), como descrito previamente por Panis *et al.* (2014), com algumas modificações. No tocante à primeira dimensão, uma coluna de troca

catiônica forte (SCX) (Waters) com enchimento de um 5 um polySulfoethyl aspartamida (PolyLC, Columbia, MD) foi utilizada. As amostras foram eluídas em nove frações a partir da coluna SCX utilizando um gradiente salino (2 μ L de tampão salino contendo 50, 100, 150 e 200 de formiato de amônio mM (NH₄FA) com 5% de ACN, seguido por um gradiente de fase reversa (RP). Os peptídeos libertados foram capturados por uma coluna RP de armadilha (180 μ m $\times$ 20 mm, 5 μ m Simetria C18, Waters). Depois da captura dos peptídeos, a coluna de armadilha foi posicionada alinhada com uma outra coluna analítica RP (100 μ m $\times$ 100 mm, 1,8 μ m C18, nanoACQUITY UPLC HSS T3, Waters). RP um gradiente de 5-40% de ACN (contendo 0,1% de ácido fórmico v/v) em 58 min foi usado para a segunda dimensão com uma taxa de fluxo de 600 mL.min⁻¹. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização do tipo nanoelectrospray em modo de íons positivo nanoESI(+) e uma fonte de ionização NanoLockSpray (Waters). O espectrômetro de massa foi calibrado com uma solução de peptídeo Glu-1-fibrinopeptídeo B (Glu-Fib) (Sigma-Aldrich) (100 fmol.mL⁻¹) entregue através do pulverizador de referência da fonte NanoLockSpray. A aceleração ortogonal do tempo de voo (OA-TOF) MSE foi adquirida a partir de m/z 50 até 2000. O perfil de MS foi ajustado para garantir que os dados de LC-MS de baixa energia foram efetivamente adquiridos a partir de m/z 400-2000. Para assegurar a reprodutibilidade e robustez experimental, nesta metodologia, as amostras foram analisadas em triplicata.

4.6 PESQUISA DE BANCO DE DADOS

A identificação das proteínas foi gerada por algoritmos adequados e pesquisando contra um banco de dados específico humano. As bases de dados empregadas foram randomizadas "*on-the fly*" durante as consultas ao banco de dados, sendo posteriormente integradas as bases originais para a avaliação da taxa de falsos positivos na identificação. A taxa de descoberta falsa (do inglês, FDR) de até 1% foi considerada. As condições adequadas de processamento e procurando banco de dados espectrais, foi utilizado um v.2.5.2 ProteinLynxGlobalServer (PLGs) com a informática ExpressionE v.2.5.2. UniProtKB (liberar 2013_11). Apenas as proteínas identificadas em todas as três repetições de cada condição, obtidas na etapa de análise com o software IdentityE PLGs, foram consideradas para a análise de expressão, que foi realizada utilizando a ferramenta ExpressionE. As proteínas obtidas foram organizadas pelo algoritmo ferramenta PLGs ExpressionE em uma lista estatisticamente significativa correspondente ao aumento e diminuição da regulação entre os diferentes grupos em comparação com amostras de controle. Procedimento de filtragem adicional foi realizado para

selecionar apenas as proteínas que apresentaram níveis de expressão diferenciais com valor de p inferior a 0,05. As interações entre as proteínas das principais rotas moleculares foram analisadas usando o software GeneGo MetaCore (GeneGo, Encinitas, CA).

4.7 ANÁLISE DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Para a avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio, as células da linhagem HL-60/MX1 foram cultivadas em placas de 12 poços (5×10^5 /poço) e mantidas em incubadora a 37°C sob uma atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas nas concentrações de IC50 obtidas nos ensaios de citotoxicidade, com todas as condições em duplicata e uma condição sem marcação para controle do experimento. Ainda sobre as condições utilizadas neste ensaio, foram adicionados poços de controle positivo (etoposídeo) (5,32 μ M), controle negativo (DMSO 0,1%) e controle sem tratamento (NT). Após o tempo de tratamento (24h e 48h), foi adicionado 200 μ L da solução de diidroetídio (DHE) na concentração de 4 μ M (Santa Cruz Biotechnology®, EUA) ao pellet de células com marcação e as amostras foram incubadas no escuro à 37°C por 25 minutos. Após a marcação, as amostras foram ressuspensas em 200 μ L de PBS 1x e foi feita a aquisição de 10.000 eventos através do citômetro Attune (Thermo Ficher Scientific®). A análise dos resultados foi feita através do software FlowJo™ (v10.8.1), em que os valores de intensidade mediana de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*) foram obtidos.

4.8 IMUNOFENOTIPAGEM

Para a caracterização imunológica de HL60/MX1, as células foram distribuídas em placas de 12 poços (3×10^5 /poço) e foi utilizada a concentração de IC50 obtida nos ensaios de citotoxicidade para os derivados SB44, SB83 e SB200. Com 48 e 72h de tratamento, as amostras celulares foram lavadas com PBS e marcadas com os anticorpos monoclonais contidos no seguinte painel: CD11C – FITC; HLA-DR – PE; CD56 – PECy7; CD45RA – APC e CD16 – APC-H7 (Pharmingens TM), os quais foram selecionados para este ensaio por estarem ligados ao processo leucêmico e serem amplamente utilizados na clínica. Ademais, foram utilizadas como controle negativo as células não tratadas, não marcadas e células não tratadas, marcadas, além do DMSO com controle veículo (0,1%). A marcação ocorreu durante 25 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada uma última etapa de lavagem

e aquisição no citômetro de fluxo BD FACS Aria™ II (BD Biosciences, CA), no qual foram adquiridos 20.000 eventos celulares. A análise dos resultados foi feita através do software FlowJo™ (v10.8.1), em que os valores de intensidade mediana de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*) foram obtidos.

4.9 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Foram plaqueadas 1×10^5 de células HL60/MX1 em uma placa de 6 poços e logo após foi adicionado 10 μ L do reagente CellLight ER-GFP (Invitrogen). Após 16 horas, os poços receberam o tratamento com o derivado SB200 nas concentrações de $\frac{1}{2}$ IC50 e IC50, o qual foi selecionado para este ensaio por ter apresentado o melhor índice de seletividade (IS) em células HL-60/MX1. Além disso, foram incluídas as condições com células marcadas e sem marcação e o etoposídeo como controle positivo em uma concentração de IC50 de 5,32 μ M. Com 48 horas de incubação, os eventos celulares foram adquiridos por meio do citômetro FACSARIA II (BD™) e a análise foi feita através do FlowJo™ (v10.8.1), em que os valores de intensidade mediana de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*) foram obtidos.

4.10 CICLO CELULAR

As células da linhagem HL-60/MX1 (5×10^5 /poço) foram cultivadas em placas de 12 poços, com posterior incubação em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. Após 24h, as células foram tratadas com as respectivas doses de IC50 dos derivados tiofênicos previamente calculadas para cada linhagem e incubadas novamente em estufa nas mesmas condições já mencionadas por um período de 24 e 48 horas. Em seguida, as células foram lavadas e fixadas em etanol 70% (Êxodo Científica) por 24 h a temperatura -20°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2800 rpm por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS 1X e o pellet celular foi marcado com 250 μ L da solução de iodeto de propídeo (PI) (FxCycle™ PI/RNase Staining Solution, Invitrogen®) e incubado por 20 minutos sob proteção da luz. Após a incubação, as células foram lavadas para retirar o excesso de PI e em seguida foram adquiridas no citômetro de fluxo Attune™ (ThermoFisher Scientific; Carlsbad, CA, USA). A análise dos resultados foi realizada pelo software FlowJo™ (v10.8.1), onde foram obtidos os valores em % das populações. Foram realizados 3 experimentos independentes, nos quais o DMSO a 0,1% e as células não tratadas foram utilizadas como controle para os ensaios.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

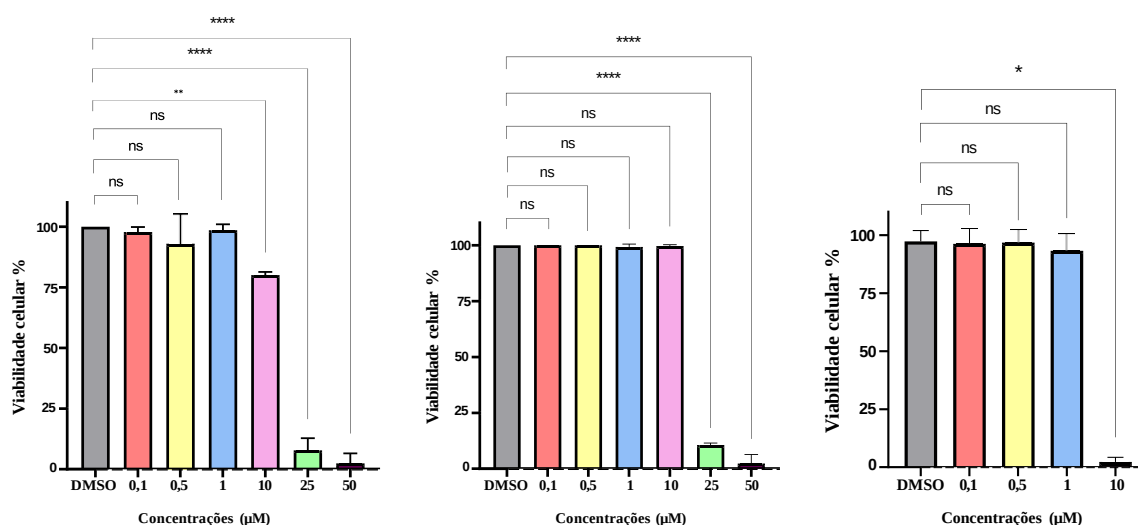
As análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste de D'Agostino foi utilizado para avaliar a normalidade das amostras. A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi realizada por médias e/ou desvios-padrão. Para verificar possíveis diferenças entre as médias, o teste “t” de Student foi utilizado para amostras independentes, quando a distribuição é Gaussiana. Nos casos em que o conjunto amostral não passou no teste de normalidade, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Os ensaios de MTT foram empregados para avaliar o nível de citotoxicidade dos derivados SB44, SB83 e SB200 em células da linhagem HL-60/MX1. O SB44 e o SB83 foram citotóxicos nas concentrações de 25 e 50 μM , com uma média de viabilidade de $7,79\% \pm 5,0$ e $2,42\% \pm 4,12$ para o SB44, e $10,6\% \pm 0,8$ e $2,33\% \pm 4,04$, para o SB83, respectivamente, quando comparadas ao DMSO (**Figura 6 A e B**). O SB200 apresentou citotoxicidade na concentração de 10 μM com uma média de viabilidade de $2,27\% \pm 1,98$, o que demonstra significância em relação ao DMSO. (**Figura 6 C**).

Figura 6. Avaliação da citotoxicidade dos derivados tiofênicos na linhagem HL-60/MX1. As figuras A, B e C exibem a viabilidade dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200, respectivamente na linhagem HL-60/MX1 comparadas ao controle negativo (DMSO) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$).



Fonte: A autora, (2024).

Além disso, a partir dos experimentos independentes, encontramos valores de IC₅₀ para cada derivado analisado. Os valores de IC₅₀ para os tiofênicos SB44, SB83 e SB200 foram de 13,94 μM ±1,09, 19,19 μM ±2,57 e 2,58 μM ±0,36, respectivamente. Além destes, foram realizados três ensaios independentes para a avaliação da citotoxicidade do etoposídeo nas concentrações de 0,5, 0,75, 1 e 10 μM. Os valores de IC₅₀ obtidos foram de 4,78μM, 9,47μM e 2,73 μM para cada experimento e a média final foi de 5,32 μM ±2,56.

5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA *LABEL-FREE* POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

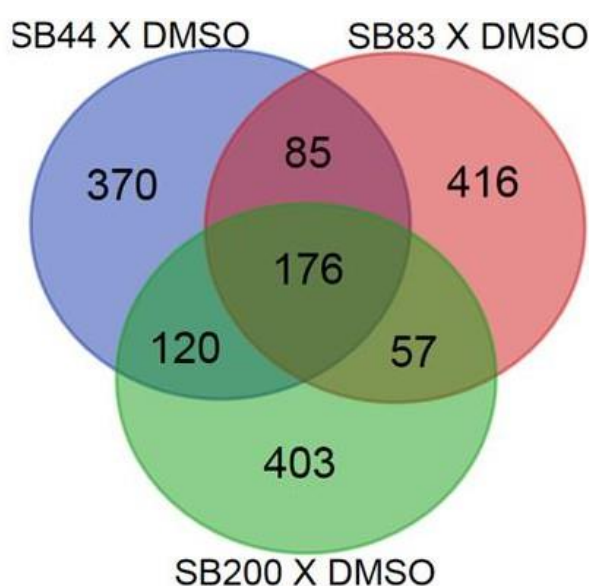
Neste estudo, empregamos a abordagem de proteômica quantitativa *label-free* para caracterizar as alterações no perfil de expressão proteica na linhagem HL-60 MX1, tratada com os compostos SB200, SB83 e SB44 nas concentrações de IC₅₀ obtidas na análise de citotoxicidade em comparação com células resistentes não tratadas.

5.2.1 Análise de expressão diferencial de proteínas em células HL60/MX1 tratadas com os compostos SB44, SB83 e SB200 e não tratadas

Com o intuito de identificar o perfil de expressão de proteínas nas células tratadas com os derivados tiofênicos SB200, SB44 e SB83 em comparação com células leucêmica não tratadas, foi realizado uma análise proteômica quantitativa *label free*. Nossa análise identificou 1627 proteínas nas três amostras avaliadas, com uma taxa de FDR inferior a 4%. Essas proteínas foram, portanto, selecionadas para análise de expressão utilizando o software PLGS (Waters).

Na **Figura 7**, o diagrama de Venn ilustra o número de proteínas expressas exclusivamente nas amostras dos grupos tratados (SB44, SB83 e SB200) comparadas ao controle negativo (DMSO), bem como o número de proteínas identificadas em comum para os derivados nas amostras avaliadas.

Figura 7 - Diagrama de Venn demonstrando a distribuição de proteínas entre as amostras tratadas (SB44, SB83 e SB200) em comparação com o controle negativo (DMSO).



Fonte: A autora, (2024).

5.2.2 Análise *in silico* de processos biológicos e vias de sinalização

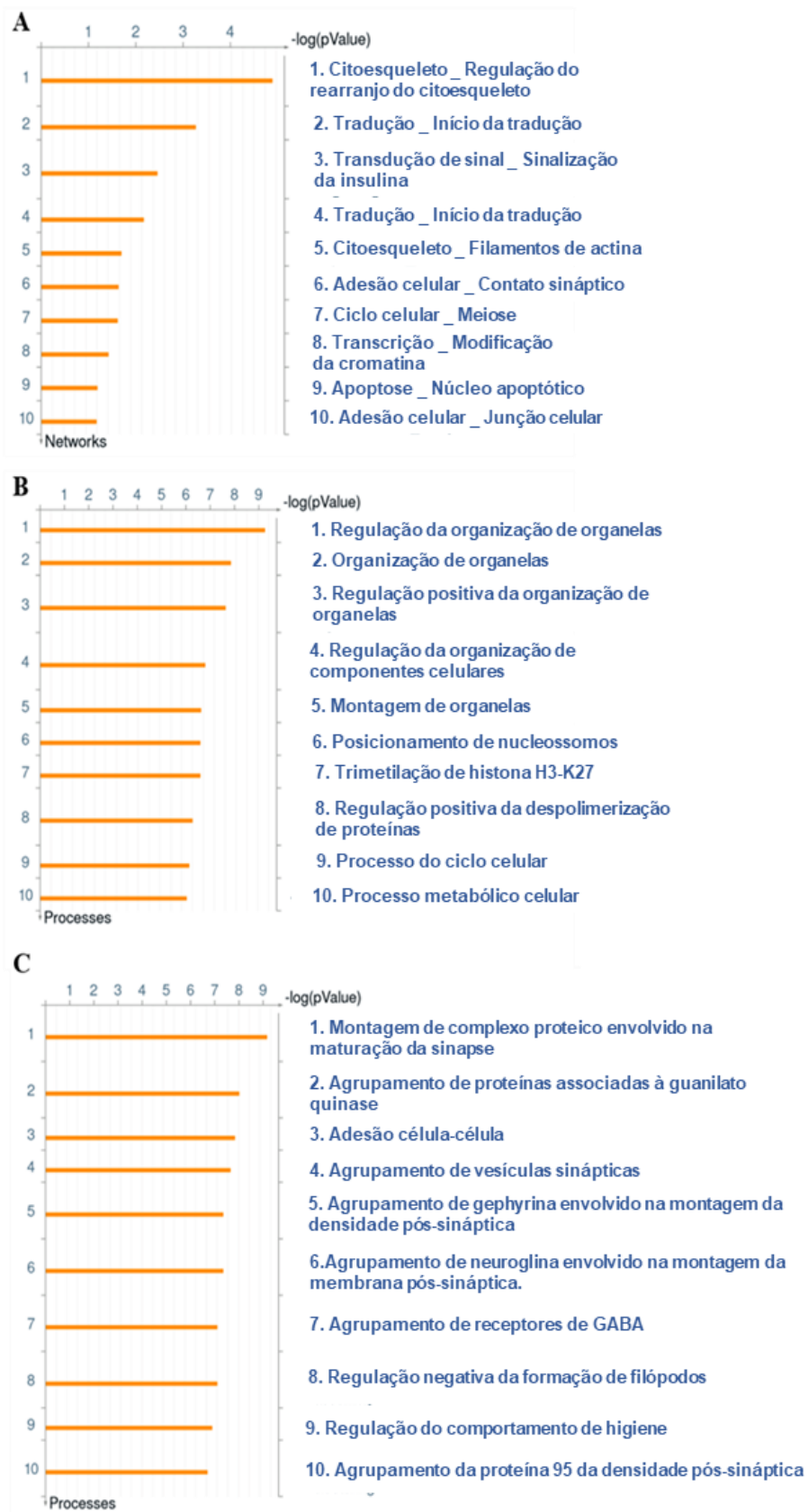
O proteoma das células HL-60/MX1 tratadas com os compostos SB44, SB83 e SB200 nas concentrações de IC50 obtidas no ensaio de citotoxicidade foi comparado com o das células não tratadas, visando estabelecer a ontologia gênica (sigla do inglês, GO) e vias de sinalização celular e respostas metabólicas afetados pelo tratamento. Por meio das análises de GO, os contextos biológicos nos quais se incluem as proteínas diferencialmente expressas puderam ser explorados, sendo identificados processos que possuem níveis de atuação e ativação/inativação que diferem segundo o tratamento testado. Na análise de GO, células tratadas com o composto SB44 apresentaram processos biológicos estatisticamente relevantes, incluindo termos relacionados à regulação do citoesqueleto e ao rearranjo celular (como a regulação do rearranjo do citoesqueleto e dos filamentos de actina), à regulação da expressão gênica e tradução (iniciação da tradução), à sinalização e ao metabolismo celular (sinalização da insulina), à

regulação do ciclo celular (como a regulação da iniciação, meiose e formação do núcleo apoptótico) e à organização molecular e estrutural (envolvendo contato sináptico, modificação da cromatina e junções celulares) (**Figura 8-A**).

Já na análise GO das proteínas diferencialmente expressas presentes em células tratadas com o composto SB83, os processos biológicos mais relevantes encontrados foram a organização e montagem de organelas (regulação da organização e montagem de organelas), regulação e montagem de componentes celulares (regulação do componente celular, montagem de nucleossomos, trimetilação de histona H3-K27), regulação da dinâmica proteica (regulação positiva da despolarização proteica) e processos celulares e metabólicos (processo do ciclo celular e processo metabólico celular; **Figura 8-B**).

Na **Figura 8-C**, observa-se que os termos da ontologia gênica estão relacionados ao desenvolvimento e maturação sináptica (montagem de complexo proteico envolvido na maturação da sinapse, agrupamento de proteínas associadas à guanilato quinase, agrupamento de vesículas sinápticas, agrupamento de gephrin envolvido na montagem da densidade pós-sináptica, agrupamento de neuroligina envolvido na montagem da membrana pós-sináptica, agrupamento de receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) envolvido na montagem da sinapse), bem como a adesão celular e interação celular (adesão célula-célula). Além disso, foi observado a regulação do citoesqueleto e da morfologia celular. Por fim, foi identificado a organização molecular e estrutural, incluindo o agrupamento da proteína de densidade pós-sináptica 95, quando as células foram tratadas com o composto SB200.

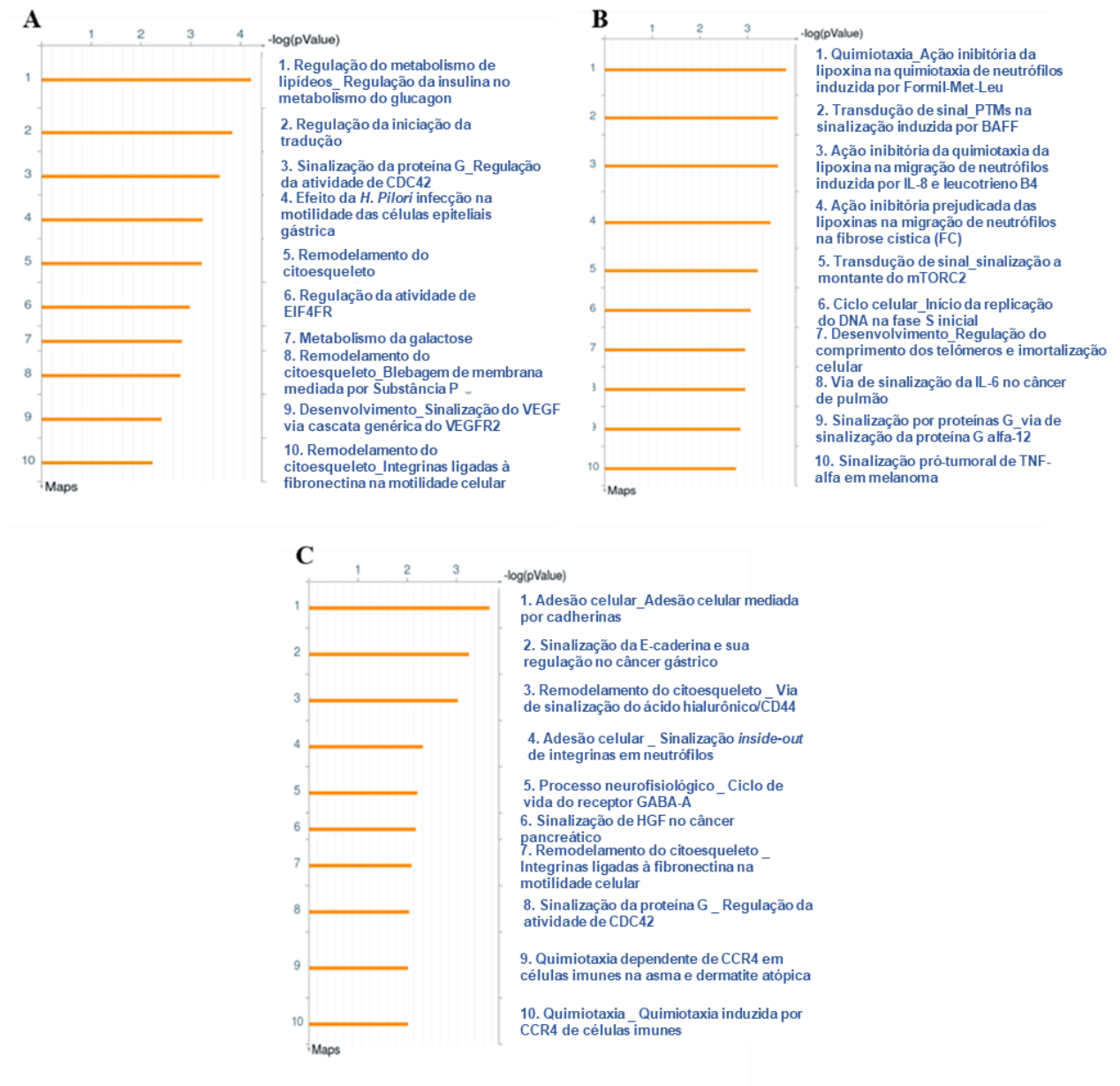
Figura 8 - Análise de ontologia gênica das proteínas diferencialmente expressas reguladas pelo tratamento com os compostos SB44 (A), SB83 (B) e SB200 (C) de acordo com o programa MetaCore. As barras laranja indicam o nível de significância das proteínas com processo biológico descrito.



Fonte: A autora (2024).

Dentre as principais vias canônicas de sinalização celular e metabólica identificadas, encontram-se a regulação metabólica, a regulação da expressão gênica e tradução, a regulação do citoesqueleto e motilidade celular, a sinalização de peptídeos e moléculas de sinalização e a sinalização angiogênica, observadas em células HL60/MX1 quando expostas ao composto SB44 (**Figura 9-A**). Por outro lado, o tratamento da linhagem celular HL60/MX1 com o composto SB83 resultou em alterações nas vias de sinalização relacionadas à imunomodulação e inflamação, regulação do crescimento e proliferação celular, regulação genômica e longevidade celular, transdução de sinal G-proteico e regulação da resposta imune (**Figura 9-B**). Além disso, as modificações nas vias de sinalização induzidas pelo composto SB200 foram associadas à adesão celular e sinalização de caderinas, sinalização por receptores e matriz extracelular, regulação da atividade celular e quimiotaxia, sinalização neurotransmissora, sinalização de integrinas em neutrófilos (**Figura 9-C**).

Figura 9 – Vias canônicas de sinalização celular e metabólica das proteínas significativamente expressas. As vias de sinalização em células HL60/MX1 foram modificadas em resposta ao tratamento com os compostos SB44 (A), SB83 (B) e SB200 (C). As barras laranja indicam o nível de significância das proteínas com processo biológico descrito.

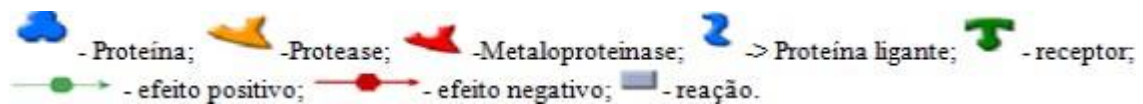


Fonte: A autora, (2024).

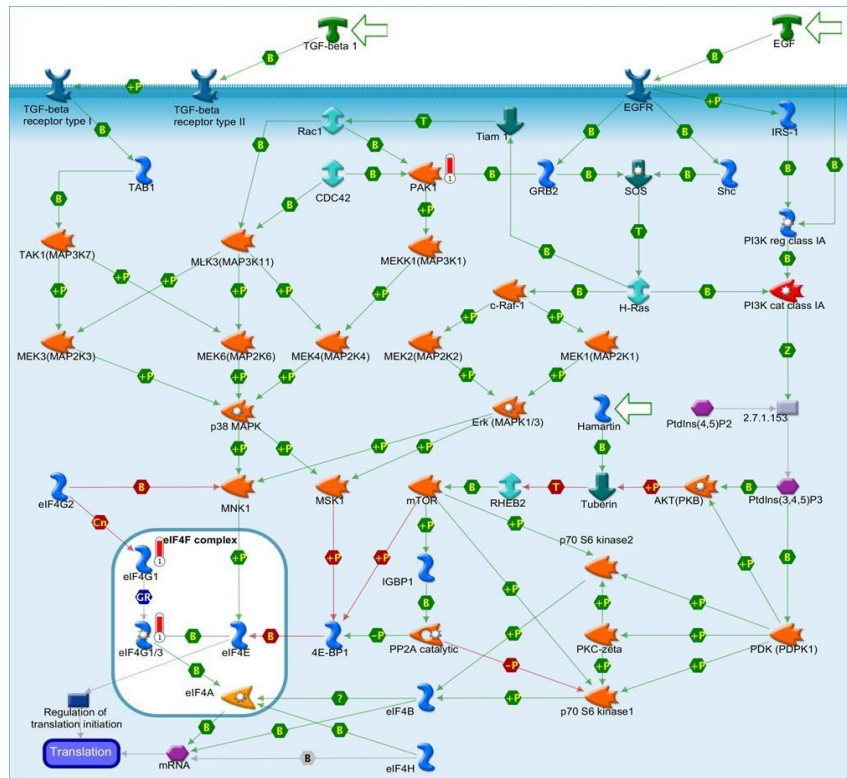
As análises obtidas no MetaCore permitiram o detalhamento das rotas moleculares envolvidas no tratamento com os derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200 em células HL-60/MX1. O tratamento com o derivado SB44 modulou a via do complexo eIF4F (fator de iniciação da tradução eucariótica 4E), primordial na inicialização da tradução celular. O SB44 foi capaz de modular os três componentes principais do complexo: eIF4E, responsável por reconhecer e recrutar o mRNA para a tradução, eIF4G, um fator de ligação e eIF4A, que desenrola as estruturas secundárias do mRNA, facilitando a ligação do ribossomo (**Figura 10-A**).

Após o tratamento com o derivado SB83, foi possível identificar alterações em vias importantes do ciclo celular, mais precisamente na rota que promove o início da replicação do DNA na fase S inicial. A modulação ocorreu em vias como, a da proteína CDC18L (do inglês, Cell Division Cycle 18-like) e da proteína MCM4 (**Figura 10-B**). Finalmente, o derivado SB200 promoveu mudanças na regulação da cascata de C-Src, uma tirosina quinase essencial na remodelação do citoesqueleto. Essa modulação altera, consequentemente, a expressão de GTPases da família Rho, uma vez que C-Src atua como um modulador *upstream* dessas proteínas (**Figura 10-C**).

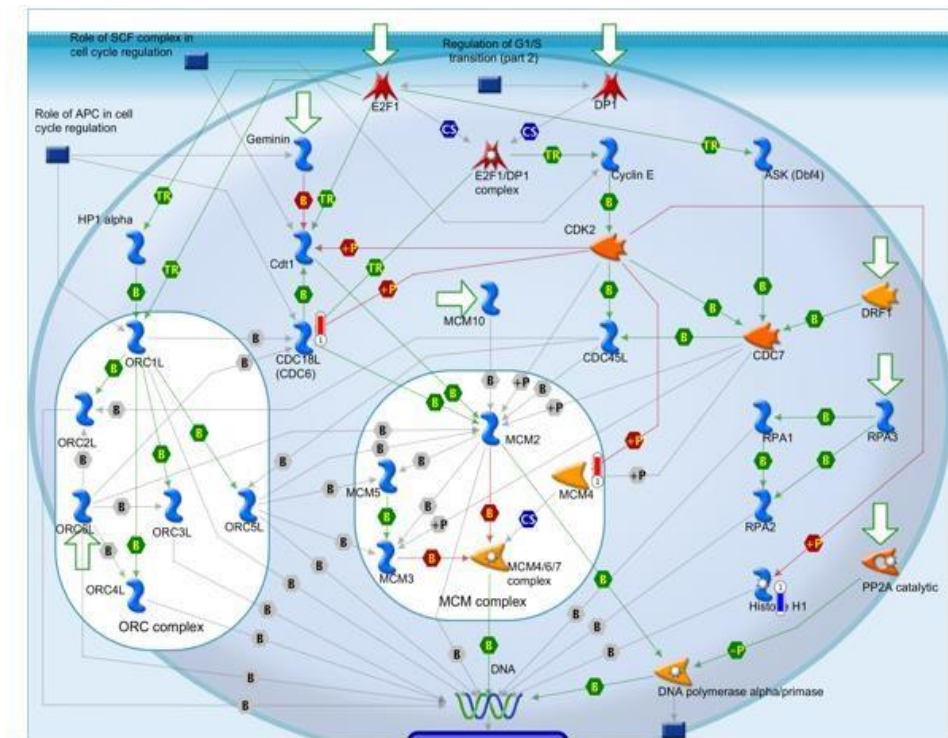
Figura 10 – Principais rotas moleculares envolvidas com o tratamento com o SB44 (A), SB83 (B) e SB200 (C) em células HL-60/MX1 obtidas através da análise no MetaCore. Os termômetros em vermelho representam as proteínas com expressão aumentada e os termômetros em azul indicam as proteínas com expressão diminuída em células HL-60/MX1. Abaixo segue a legenda completa de todos os símbolos que contém na figura.



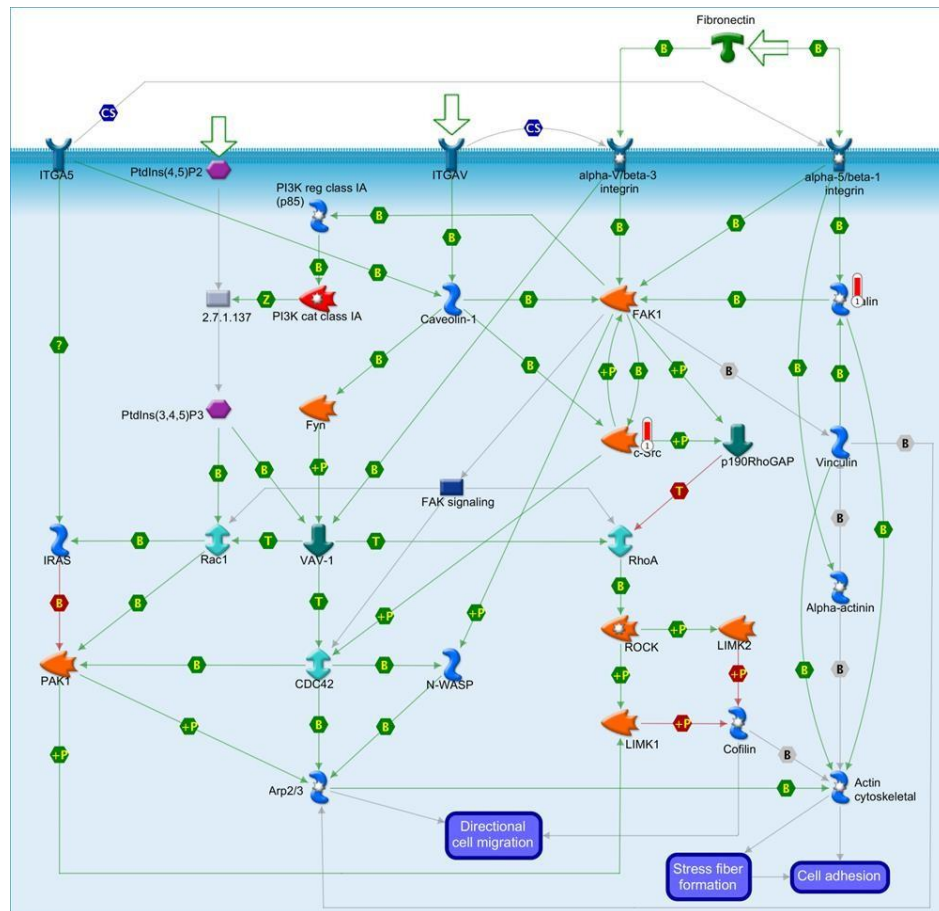
A) Tradução - Regulação da atividade EIF4F



B) Ciclo celular - Início da replicação do DNA na fase S inicial



C) Remodelação do citoesqueleto - Integrinas de ligação à fibronectina na motilidade celular.



Com base nos resultados obtidos na análise proteômica, foram determinados os níveis de ROS, imunofenotipagem com o painel CD11c, HLA-DR, CD56, CD45RA e CD16, estresse do retículo endoplasmático e ciclo celular visando compreender as alterações moleculares resultantes dos tratamentos com os derivados tiofênicos nas células HL60/MX1. Os níveis de ROS são essenciais, pois trazem respostas sobre o estresse oxidativo induzido por esses compostos e suas implicações para a sobrevivência celular e a ativação de vias de sinalização. A imunofenotipagem complementa essa abordagem ao explorar a modulação da resposta imune e a proliferação celular.

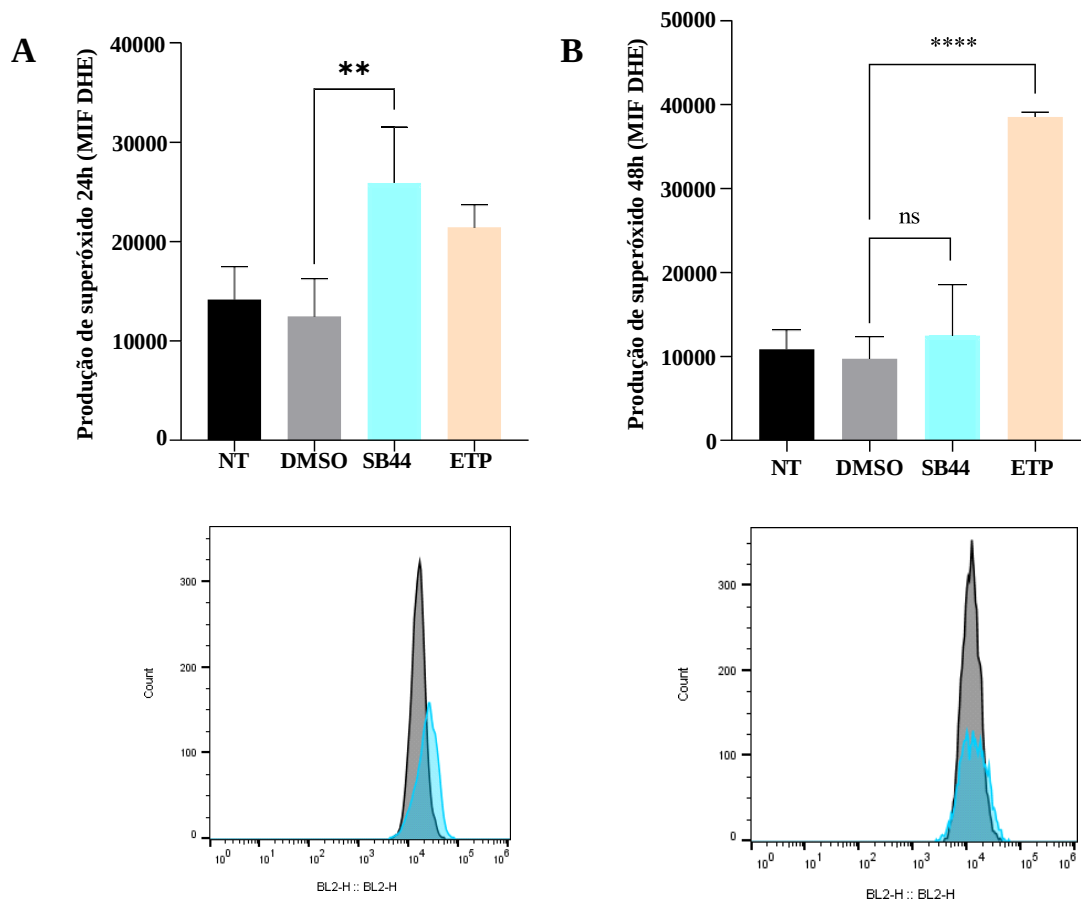
Além disso, a análise do estresse do retículo endoplasmático é fundamental para entender como os compostos afetam a homeostase celular e a viabilidade, dado que esse evento pode estar associado com a indução de apoptose e a imunomodulação e inflamação. Por fim, a análise do ciclo celular auxilia na compreensão de como essas alterações influenciam o

progresso das células nas diferentes fases do ciclo, evidenciando potenciais mecanismos de controle da proliferação e morte celular.

5.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ROS

Buscamos investigar os efeitos do tratamento com os derivados tiofênicos nas concentrações de IC50 em relação à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células HL-60/MX1. A produção de superóxido foi identificada utilizando o reagente DHE e analisado através da citometria de fluxo. Em relação ao derivado SB44, foi observado uma significativa produção de superóxido nas células no tempo de tratamento de 24h; ($p = 0,0043$) quando comparado ao controle veículo (DMSO). (**Figura 11-A**). Observou-se uma produção significativa de superóxido nas células após tratamento com o etoposídeo no tempo de 48h; ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle veículo (DMSO). Não encontramos alterações significativas da produção de superóxido nas células tratadas com os tiofenos no tempo de 48 horas (**Figura 11-B**).

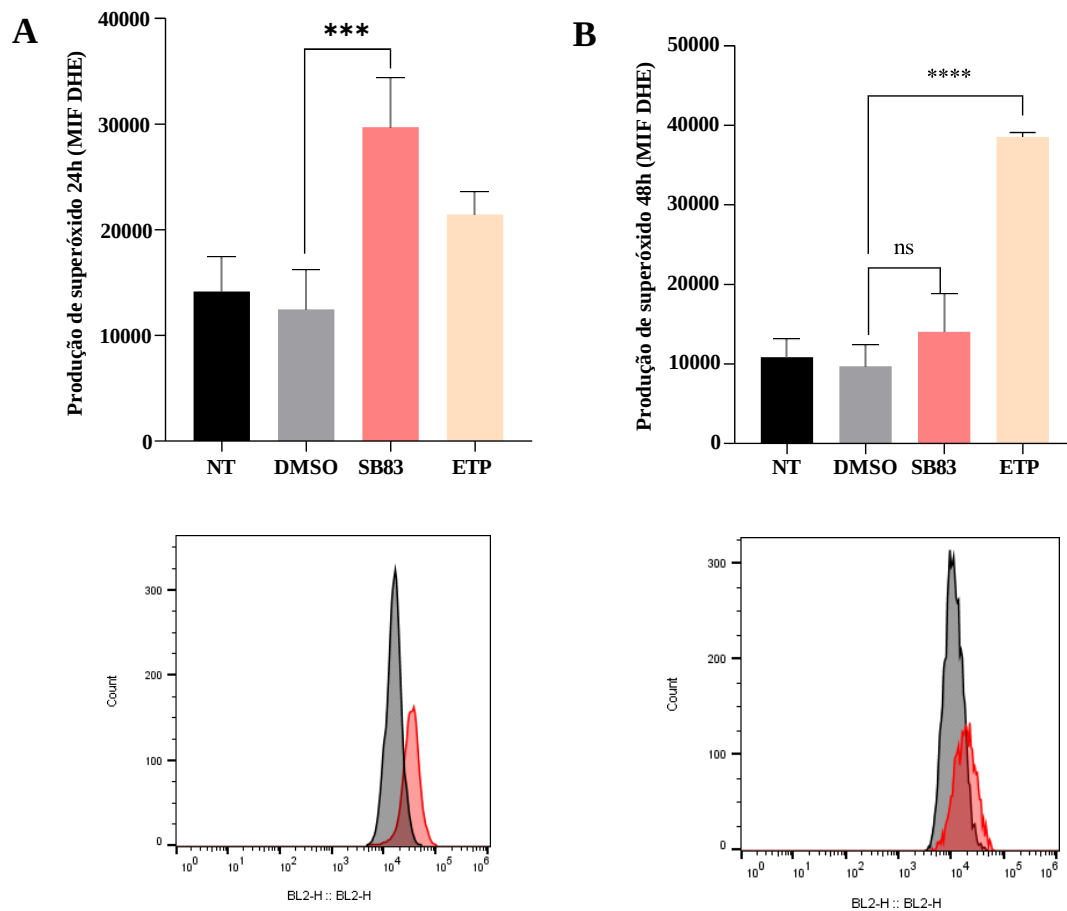
Figura 11: Produção de superóxido induzido pelo derivado SB44 na linhagem HL-60/MX1. Uma produção significativa de superóxido induzida foi induzida pelo derivado SB44 na concentração de IC50 (13,94 μM) em células HL-60/MX1 em comparação com o controle veículo, DMSO 0,1%, após um período de incubação de 24 (A) e 48 (B) horas. ($*p < 0,05$).



Fonte: A autora (2024).

Em relação ao derivado SB83, também encontramos alterações significativas na produção de superóxido nas células no tempo de tratamento de 24h; ($p = 0,0004$) quando comparada ao DMSO (**Figura 12-A**). Observou-se uma produção significativa de superóxido induzida nas células após tratamento com o etoposídeo no tempo de 48h; ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle veículo (DMSO). Não encontramos alterações significativas da produção de ROS nas células tratadas com os derivados no tempo de 48 horas após o tratamento com os derivados tiofênicos (**Figura 12-B**).

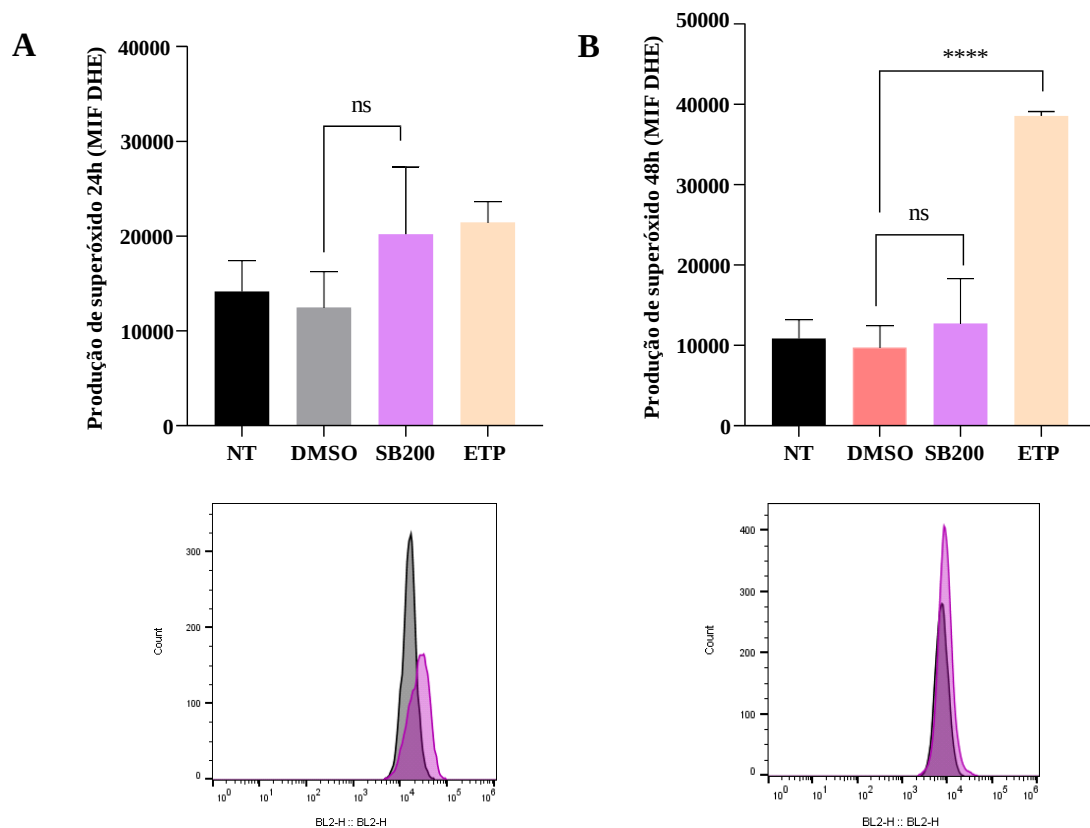
Figura 12: Produção de superóxido induzido pelo derivado SB83 na linhagem HL-60/MX1. Uma produção significativa de superóxido induzido pelo derivado SB83 na concentração de IC_{50} (19,19 μM) em células HL-60/MX1 em comparação com o controle veículo, DMSO 0,1%, após um período de incubação de 24 (A) e 48 (B) horas ($*p < 0,05$).



Fonte: A autora (2024).

Em relação ao SB200, não foram encontradas alterações significativas na produção de superóxido nos tempos de 24 e 48 horas (**Figura 13, A e B**). Já em 48h, observou-se uma produção significativa de superóxido nas células após tratamento com o etoposídeo; ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle veículo (DMSO).

Figura 13: Produção de superóxido induzido pelo derivado SB200 na linhagem HL-60/MX1. As células da linhagem HL-60/MX1 foram tratadas com o derivado SB200 na concentração de IC₅₀ (2,58 µM). As células foram incubadas por 24 (A) e 48 (B) horas. Além disso, foram utilizados os controles veículo (DMSO 0,1%) e não tratado (NT). (* $p < 0,05$).



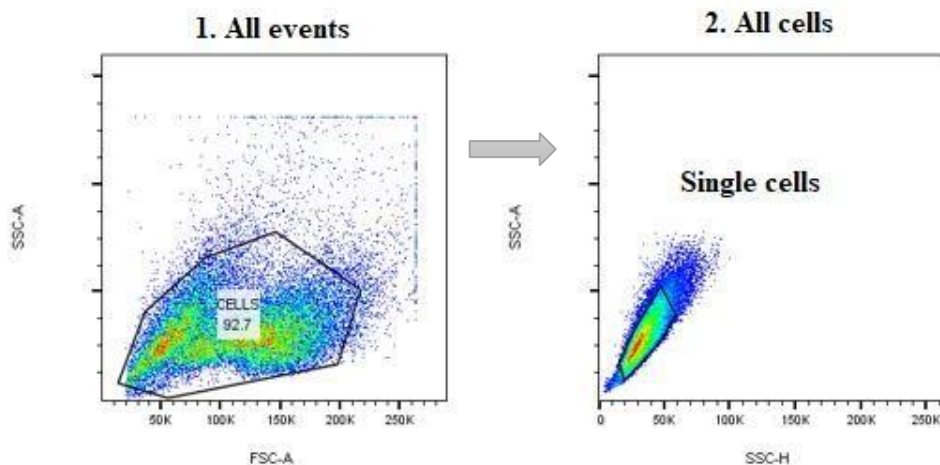
Fonte: A autora, (2024).

Dando continuidade à investigação do mecanismo de ação dos compostos, o próximo passo foi a imunofenotipagem. Esta técnica nos permite caracterizar as células da linhagem HL-60/MX1, resultando em uma compreensão das alterações fenotípicas que ocorrem em resposta ao tratamento com os derivados tiofênicos.

5.4 IMUNOFENOTIPAGEM

A partir da montagem do painel CD11C; HLA-DR; CD56; CD45RA e CD16, foi possível a caracterização do perfil imunológico da linhagem HL-60/MX1 como forma de entender as modulações induzidas pelos derivados, as quais foram destrinchadas no tópico 5.2. A **Figura 14** representa a estratégia de *gates* utilizada para a citometria de fluxo, em que é considerada a dispersão frontal (FSC), que indica o tamanho ou volume celular, e a dispersão lateral (SSC), correlacionada com a complexidade interna ou granulosidade.

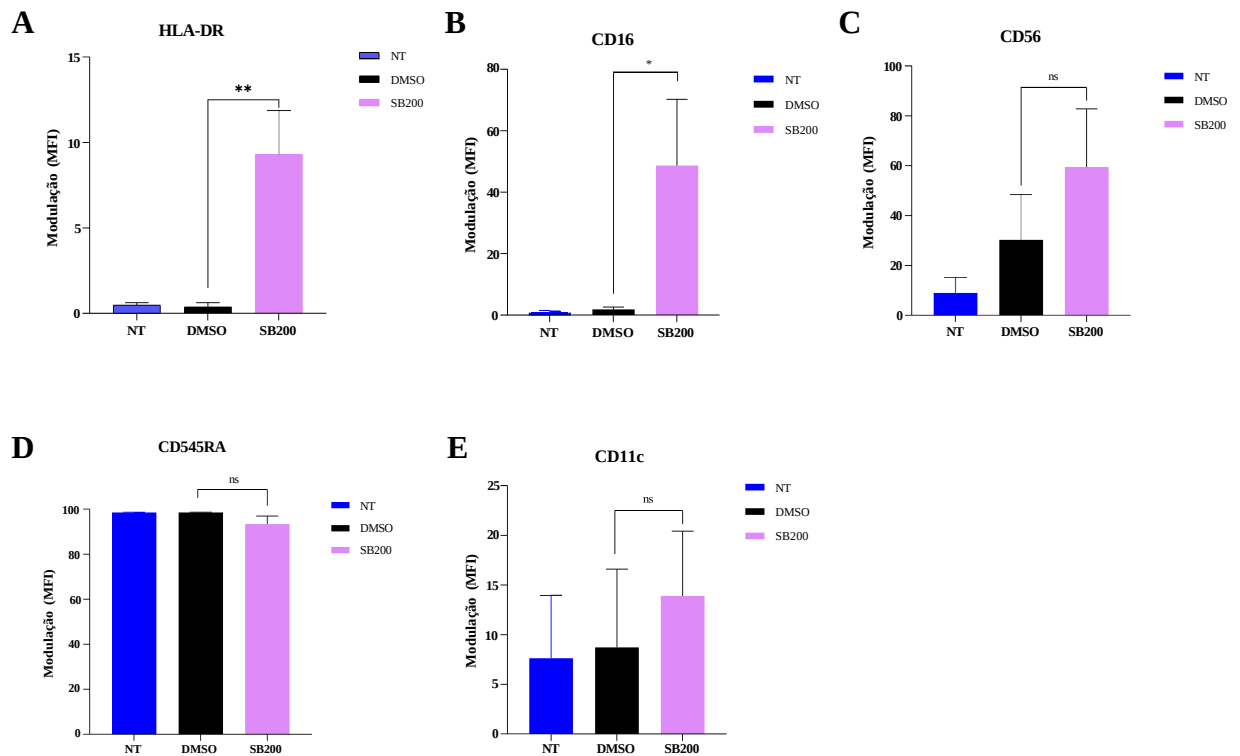
Figura 14 – Estratégia de *gates* para a imunofenotipagem. Gráficos em formato de *dot plot* contendo os *gates* para *all cells* (1) e *single cells* (2) que são comuns para todos os testes de imunofenotipagem.



Fonte: A autora (2024).

Os resultados da análise dos marcadores CD11C, HLA-DR, CD56, CD45RA e CD16 demonstraram diferenças significativas no perfil de expressão das células quando tratadas com os derivados SB200, SB44 e SB83 nas respectivas concentrações de IC50 em relação ao controle veículo (DMSO). Quanto ao SB200, observou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão de HLA-DR ($p = 0,0030$) (**Figura 15-A**) e CD16 ($p = 0,0222$) (**Figura 15-B**) quando comparadas ao controle veículo. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas nos marcadores CD11C, CD56 e CD45RA, indicando uma resposta seletiva do derivado SB200 em relação a esses marcadores específicos.

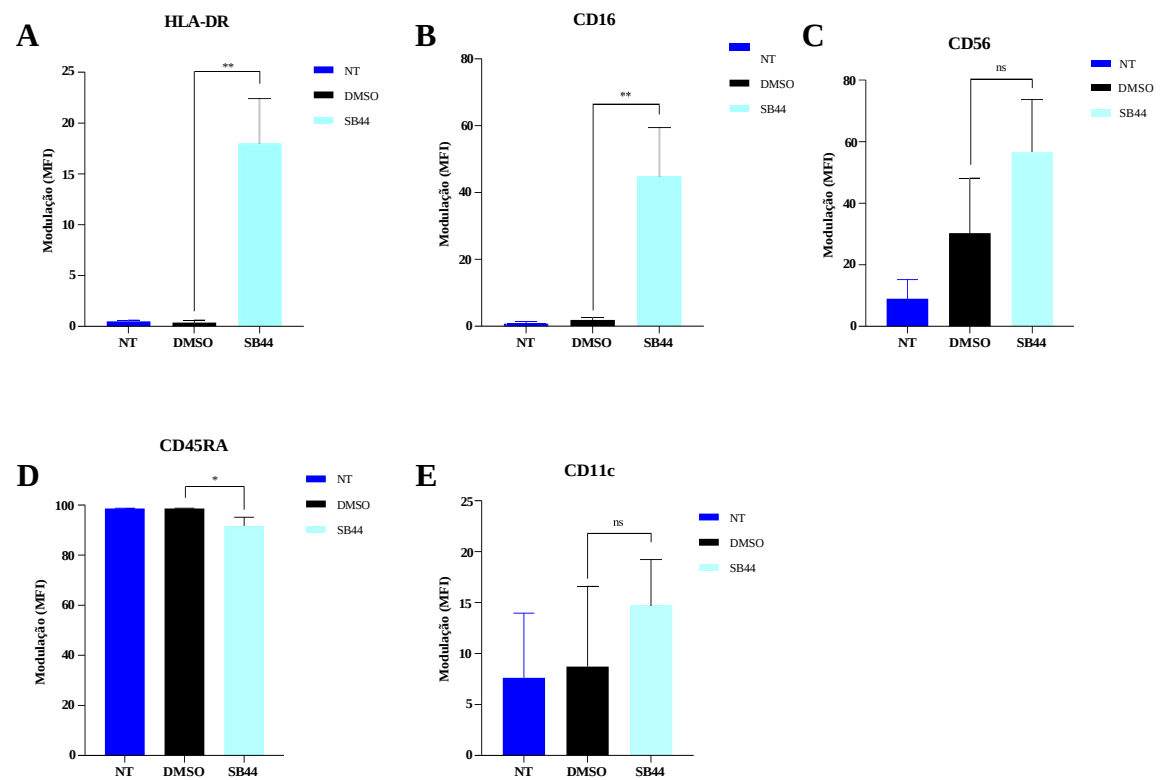
Figura 15 - Perfil de expressão de marcadores imunológicos na linhagem HL-60/MX1 quando tratadas com o derivado tiofeno SB200. (A) HLA-DR; (B) CD16; (C) CD56, (E) CD45RA e (F) CD11c. As barras representam a média de expressão dos marcadores e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle veículo ($*p < 0,05$).



Fonte: A autora (2024).

Em relação ao SB44, também foram observadas diferenças estatisticamente significativas no perfil de expressão celular dos marcadores analisados. Após o tratamento com o derivado em comparação ao DMSO houve um aumento significativo na expressão de HLA-DR ($p = 0,0022$) (**Figura 16-A**) e CD16 ($p = 0,0058$) (**Figura 16-B**) e uma diminuição da expressão de CD45RA ($p = 0,0310$) (**Figura 16-D**) quando comparadas ao controle veículo. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos marcadores CD11c e CD56 após o tratamento com SB44.

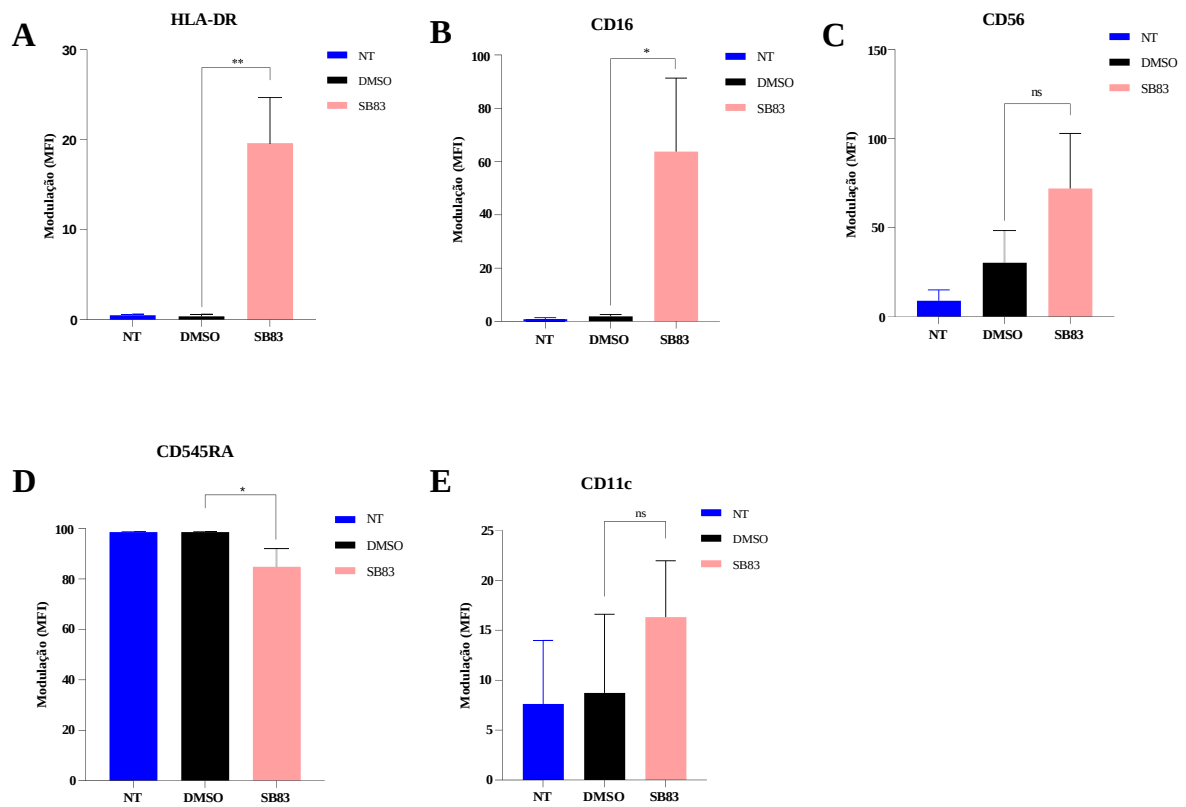
Figura 16 - Perfil de expressão de marcadores imunológicos na linhagem HL-60/MX1 quando tratadas com o derivado tiofeno SB44. (A) HLA-DR; (B) CD16; (C) CD56, (E) CD45RA e (F) CD11c. As barras representam a média de expressão dos marcadores e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle veículo (* $p < 0,05$).



Fonte: A autora (2024).

Por fim, também investigamos o perfil imunológico das células da linhagem HL-60/MX1 quando tratadas com o derivado SB83. Também foi possível observar que o derivado induziu a um aumento da expressão de HLA-DR ($p = 0,0028$) (**Figura 17-A**), e CD16 ($p = 0,0195$) (**Figura 17-B**) e diminuição da expressão CD45RA ($p = 0,0299$) (**Figura 17-D**). Não foram observadas alterações significativas nos marcadores CD11c e CD56 após o tratamento com SB83.

Figura 17 - Perfil de expressão de marcadores imunológicos na linhagem HL-60/MX1 quando tratadas com o derivado tiofeno SB83. (A) HLA-DR; (B) CD16; (C) CD56, (E) CD45RA e (F) CD11c. As barras representam a média de expressão dos marcadores e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle veículo ($*p < 0,05$).



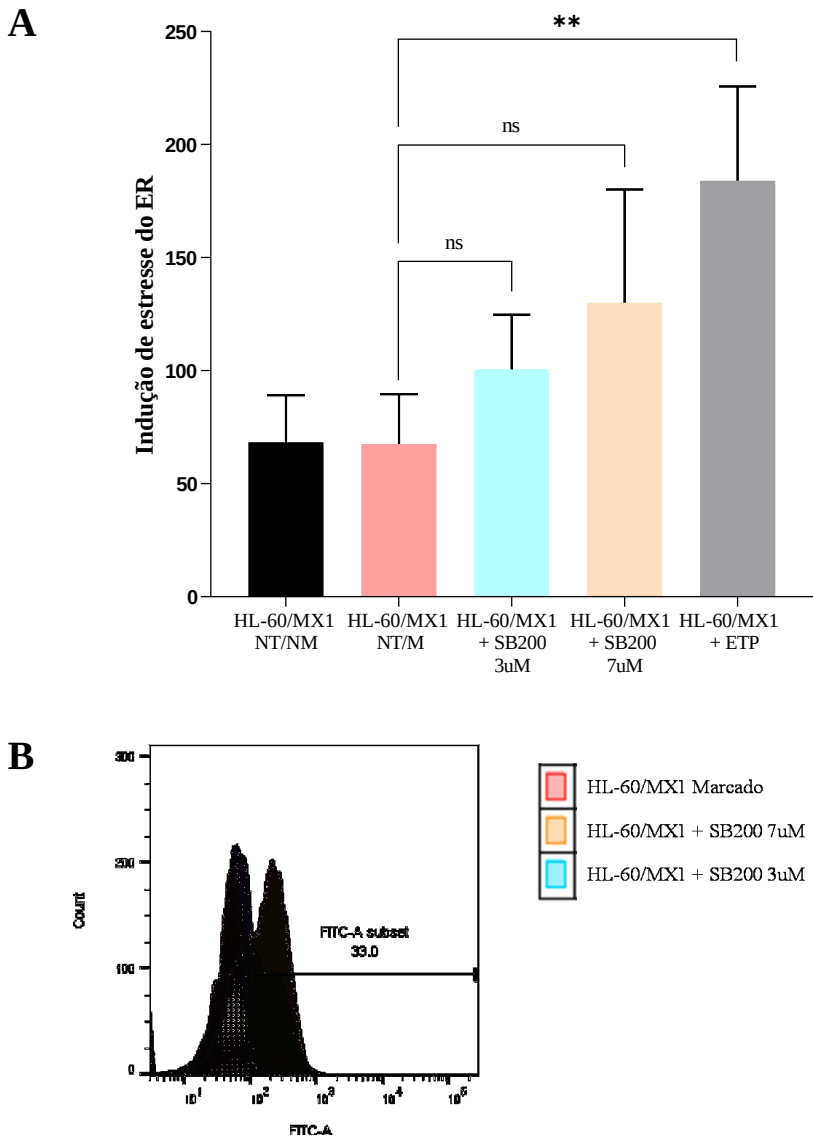
Fonte: A autora (2024).

Como próxima etapa, investigamos a indução do estresse do retículo endoplasmático induzido pelo derivado SB200, uma vez que o aumento desse tipo de estresse pode resultar em morte celular das células leucêmicas resistentes.

5.5 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Após a caracterização fenotípica induzida pelos derivados tiofênicos na linhagem HL-60/MX1, avaliou-se a indução do estresse no retículo endoplasmático induzido pelo derivado tiofênico SB200. Após a marcação com o CellLight ER-GFP identificamos que o tratamento com SB200 não resultou em alterações significativas na expressão da proteína GFP no retículo endoplasmático em comparação à condição controle (HL-60/MX1 - NT/M). O controle positivo (etoposídeo) conseguiu induzir de forma significativa o estresse do retículo endoplasmático ($p = 0,0059$) quando comparado à condição controle (HL-60/MX1 - NT/M). Podemos observar na **Figura 18-A**, a quantificação de intensidade de fluorescência em cada uma das condições de tratamento demonstrada em gráficos de barras e na **Figura 18-B** a sobreposição de histogramas referente às diferentes condições.

Figura 18 - Análise do estresse do retículo endoplasmático em células HL-60/MX1 tratadas com o derivado SB200. As células da linhagem HL-60/MX1 foram marcadas com o Cell Light ER-GFP por 16 horas e tratadas em seguida com o derivado SB200 com a concentração de IC₅₀ e ½ IC₅₀ por 48 horas e então analisadas por citometria de fluxo. (A) Gráfico da indução do estresse do ER em diferentes condições analisadas. (B) Representação da Intensidade de Fluorescência através de histograma, exibindo as condições analisadas – HL-60/MX1 marcada com o CellLight ER-GFP e as células HL-60/MX1 marcada com o CellLight ER-GFP e tratadas com o derivado SB200 nas concentrações de ½ IC₅₀ e IC₅₀.



HL-60/MX1 NT/NM: Células da linhagem HL-60/MX1 que não foram tratadas e não foram marcadas com qualquer fluoróforo; HL-60/MX1 NT-M: Células não tratadas e marcadas com o CellLight ER-GFP; HL-60/MX1 SB200 3uM: Células tratadas com o SB200 na concentração de ½ IC₅₀ e marcadas com o CellLight ER-GFP e HL-60/MX1 SB200 7uM: Células tratadas com o SB200 na concentração de IC₅₀ e marcadas com o CellLight ER-GFP. ETP – Etoposídeo.

Fonte: A autora (2024).

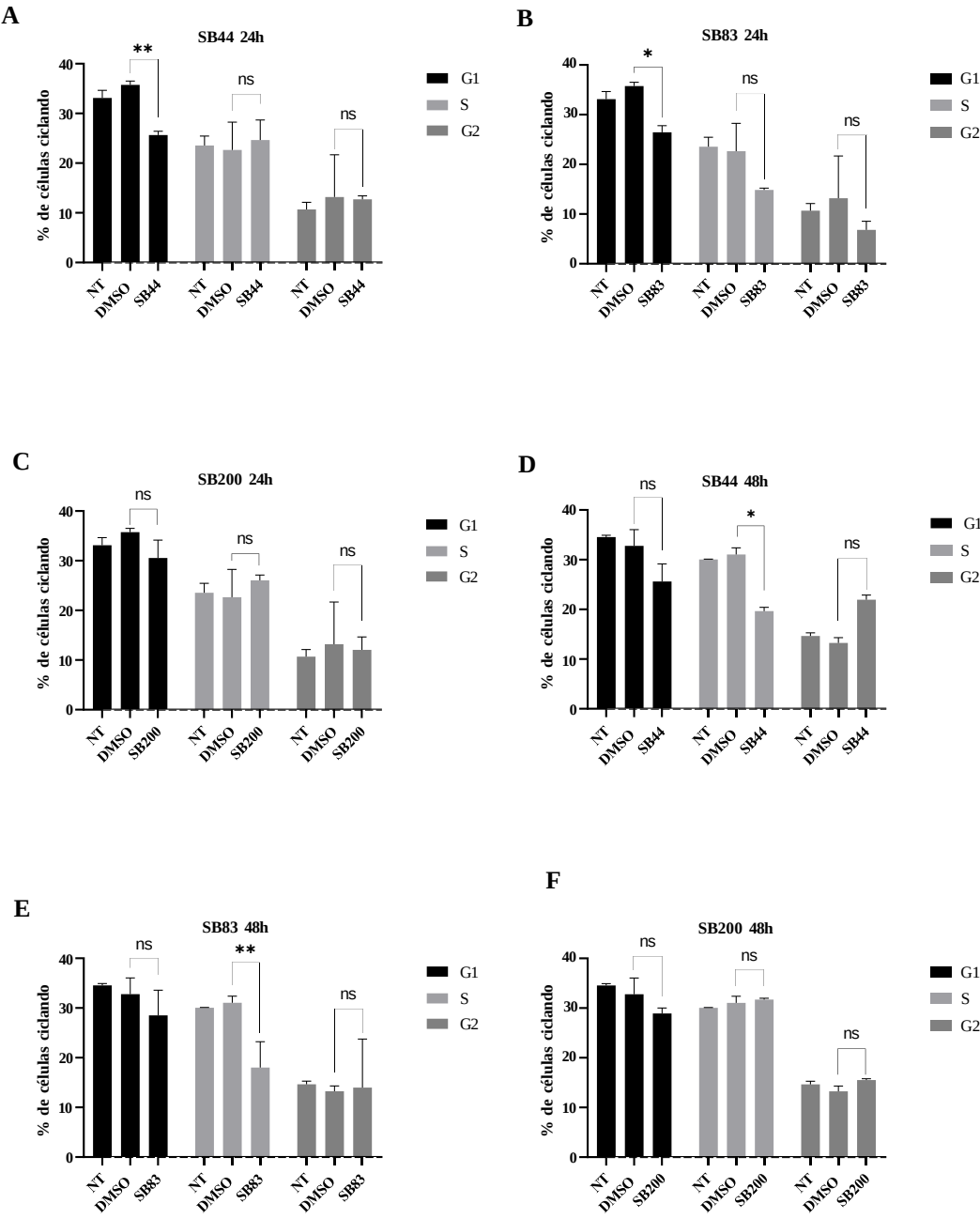
Por fim, investigamos as alterações promovidas pelos derivados tiofênicos na progressão do ciclo celular das células da linhagem HL-60/MX1, uma vez que perturbações neste processo podem conferir uma diminuição na proliferação das células leucêmicas e/ou indução da morte celular.

5.6 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para investigar os efeitos dos derivados tiofênicos em relação a sua atuação antineoplásica, realizamos o estudo dos derivados na progressão do ciclo das células das linhagens HL-60/MX1. Como pode ser observado na **Figura 19**, os derivados induziram modificações no ciclo celular. Observou-se que no tempo de 24 h, 35,75% ($\pm 0,7$) das células tratadas com DMSO se encontravam na fase G1 do ciclo celular e o derivado tiofênico SB44 diminuiu significativamente o percentual de células nessa fase do ciclo para 25,65% ($\pm 0,7$) ($p = 0,009$) (**Figura 19-A**). Também foi observado que no tempo de 24 h, 35,75% ($\pm 0,7$) das células tratadas com DMSO se encontravam na fase G1 do ciclo celular e o derivado tiofênico SB83 diminuiu significativamente o percentual de células nessa fase do ciclo para 26,45% ($\pm 1,3$) ($p = 0,013$) (**Figura 19-B**).

Com relação ao tempo de tratamento de 48 h, observou-se que o mesmo derivado induziu a alterações em outra fase do ciclo celular. Na fase S do ciclo celular das células HL-60/MX1, 31,05% ($\pm 1,3$) das células não tratadas se encontravam na fase S e após tratamento com o derivado SB44, houve uma diminuição significativa do percentual de células para 19,65% ($\pm 0,7$) ($p = 0,01$) (**Figura 19-D**). Essa mesma alteração, na mesma fase do ciclo e com o mesmo tempo de tratamento foi observada quando as células foram tratadas com o derivado SB83. 31,05% ($\pm 1,3$) das células não tratadas se encontravam na fase S do ciclo celular e o derivado SB83 diminuiu significativamente o percentual de células nessa fase do ciclo para 18% ($\pm 5,23$) ($p = 0,009$) (**Figura 19-E**). O tratamento com o derivado SB200 não apresentou alterações significativas na progressão do ciclo celular em células HL-60/MX1, tanto em 24h, quanto em 48h (**Figura 19-C e 19-F**, respectivamente).

Figura 19- Efeito dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200 e DMSO no ciclo celular das células HL-60/MX1 após 24 e 48 horas de tratamento. (A), (B) e (C) representam as condições: células não tratadas, DMSO (0,1%) e células tratadas com os derivados tiofênicos (IC₅₀) por 24 horas, (D), (E) e (F) representam células não tratadas, DMSO (0,1%) e células tratadas com os derivados tiofênicos (IC₅₀) por 48h. **p* < 0.05.



Fonte: A autora (2024).

6. DISCUSSÃO

A LPA é uma patologia complexa e agressiva caracterizada pela proliferação descontrolada de células promielocíticas na medula óssea. A resistência à terapia é um desafio significativo no tratamento da LPA, uma vez que a maioria dos pacientes responde à quimioterapia inicial, mas a doença refratária e a recidiva são comuns. Sendo assim, a identificação de novas terapias na LPA é de extrema importância devido aos desafios associados ao tratamento dessa doença, especialmente em relação à resistência à terapia. Nosso estudo teve como objetivo investigar a ação de derivados tiofênicos nas vias de sinalização celular em uma linhagem de leucemia aguda resistente ao tratamento quimioterápico. Os tiofenos são compostos heterocíclicos contendo enxofre que se ligam a uma ampla gama de alvos proteicos específicos de câncer, dependendo de sua natureza (Archna *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de citotoxicidade pelo método do MTT revelaram diferenças na atividade citotóxica dos derivados tiofênicos SB44, SB83 e SB200 sobre a linhagem celular leucêmica resistente HL-60/MX1. O composto SB200 apresentou o menor valor de IC₅₀, indicando uma maior eficácia citotóxica em comparação com SB44 e SB83. Esses dados sugerem que SB200 possui um melhor potencial terapêutico, exigindo concentrações menores para atingir 50% de inibição do crescimento celular em relação aos outros derivados testados.

As diferenças observadas nos resultados de citotoxicidade podem ser atribuídas às variações estruturais dos compostos analisados. As três moléculas compartilham um anel heterocíclico de cinco membros contendo enxofre (tiofeno). No entanto, suas distinções estruturais residem nos substituintes. Os derivados SB83 e SB200 diferem no tamanho de seus anéis alifáticos, sendo ciclo-hexano e ciclo-heptano, respectivamente. Já o derivado SB44 é caracterizado pela presença de um anel indol substituído por um átomo de bromo. O composto SB200 exibiu o menor valor de IC₅₀ frente à linhagem HL-60/MX1, e essa maior atividade pode ser atribuída à presença de seu anel ciclo-heptano, que o distingue estruturalmente do SB83, sugerindo que essa modificação estrutural desempenha um papel significativo em sua citotoxicidade aprimorada.

Nossos resultados corroboram com o estudo realizado por Volodina *et al.* (2021), que investigaram o potencial antiproliferativo de 15 derivados tiofênicos em linhagens tumorais, leucêmicas e variantes resistentes a medicamentos, utilizando o ensaio de MTT após 72 horas de tratamento. Nesse estudo, os valores de IC₅₀ variaram entre 0,2 µM e 20 µM, dependendo

da molécula testada, evidenciando a eficácia dos compostos tiofênicos em diferentes linhagens tumorais.

Um estudo prévio reportado por nosso grupo de pesquisa demonstrou a citotoxicidade dos mesmos compostos tiofênicos em célula mononuclear do sangue periférico (do inglês, PBMC) (Quirino *et al.*, 2016). A partir dos dados de IC₅₀ desse estudo, foi possível determinar o índice de seletividade (IS) dos derivados tiofênicos, calculado a partir da razão entre IC₅₀ de cada composto em PBMC e a linhagem neoplásica HL-60/MX1 ($IS = IC_{50} \text{ cél. normais} / IC_{50} \text{ cél. neoplásicas}$). Indrayanto *et al.*, (2021) sugerem que um $IS \geq 3$ é considerado promissor para o desenvolvimento de moléculas com atividade antineoplásica. No nosso estudo, o derivado tiofênico SB200 ($IS = 4,65$) obteve o melhor índice de seletividade contra as células da linhagem HL-60/MX1 quando comparados aos outros derivados avaliados. Diversos trabalhos avaliaram derivados tiofênicos e seus potenciais efeitos antineoplásicos em linhagens leucêmicas (Bilik *et al.*, 2001; Lisboa *et al.*, 2019; Pinna *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). Contudo, é clara a necessidade por trabalhos que abordem o mecanismo de ação de derivados capazes de destruir estas células leucêmicas.

No presente estudo, utilizamos a proteômica quantitativa *label-free* para investigar as alterações no perfil proteico da linhagem leucêmica resistente HL-60/MX1, após o tratamento com os compostos SB83, SB44 e SB200. Conclusões baseadas no estudo do proteoma são valiosas para identificar os mecanismos de ação de novos fármacos, proporcionando uma compreensão mais profunda de suas interações com proteínas e suas influências nos processos celulares. Além disso, essas análises são essenciais para o monitoramento do surgimento de resistência, permitindo intervenções mais eficazes e o desenvolvimento de terapias mais direcionadas.

A análise proteômica foi realizada com base nos valores de IC₅₀ obtidos na análise de citotoxicidade e foi realizada através da metodologia *label-free* LC/MS-MS. Nossa análise identificou um total de 1627 proteínas em todas as amostras, e a partir de uma análise comparativa dos proteomas das células tratadas e não tratadas, foi avaliado a GO com intuito de explorar os processos biológicos associados às proteínas diferencialmente expressas em resposta a cada tratamento, assim como as alterações nas vias de sinalização celular e processos metabólicos induzidos pelos derivados tiofênicos avaliados.

Na análise dos resultados de GO das células HL60/MX1 tratadas com os compostos SB44, SB83 e SB200, observou-se que cada composto influenciou diferentes vias de sinalização e processos biológicos, destacando-se a relevância das proteínas diferencialmente

expressas em processos celulares e metabólicos específicos. Ademais, a análise através do MetaCore permitiu a identificação das principais rotas moleculares moduladas que estão envolvidas nestes processos.

Os resultados da análise de GO em células HL60/MX1 tratadas com o composto SB44 evidenciaram efeitos significativos na regulação do citoesqueleto, no rearranjo celular, na expressão gênica e nos processos de sinalização celular, fornecendo importantes aspectos sobre os mecanismos subjacentes à resistência de células leucêmicas à quimioterapia. O citoesqueleto é fundamental para a morfologia, migração e divisão celular (Ong *et al.*, 2020). Na leucemia, alterações nesta rede proteica complexa favorecem a invasão tecidual, metástase e resistência à quimioterapia. O composto SB44 pode ter regulado o rearranjo dos filamentos de actina, interferindo na plasticidade das células leucêmicas, reduzindo sua migração e proliferação em ambientes desfavoráveis, como a medula óssea, diminuindo a resistência à quimioterapia, tornando as células mais suscetíveis às drogas.

Além de regular o citoesqueleto, o SB44 também impactou a expressão gênica e a iniciação da tradução. Células leucêmicas resistentes exibem perfis gênicos que favorecem a sobrevivência, como maior expressão de proteínas antiapoptóticas. Esse resultado sugere que o tratamento com o composto SB44 pode ter induzido a apoptose e limitando a síntese de proteínas que sustentam a resistência, favorecendo a produção de proteínas que induzem a morte celular. O tratamento do composto SB44 também teve impacto significativo nas vias de sinalização celular, incluindo a da insulina, que está associada à resistência à quimioterapia em leucemias. Alterações nessas vias promovem a sobrevivência das células leucêmicas e ao interferir na sinalização da insulina, o composto SB44 pode diminuir a capacidade dessas células de escapar da morte celular induzida (Szablewski, *et al.*, 2024).

Os resultados obtidos com o tratamento das células HL60/MX1 com o composto SB83 na análise de GO demonstraram uma significativa regulação da organização e montagem de organelas, bem como alterações na trimetilação da histona H3-K27. A trimetilação da histona H3-K27 é uma modificação epigenética que está frequentemente associada ao silenciamento de genes. Na leucemia, a regulação epigenética desempenha um papel fundamental na modulação da expressão gênica, afetando a proliferação celular e a resistência a tratamentos (Sadida *et al.*, 2024). O impacto do SB83 sobre a trimetilação pode sugerir que esse composto tem a capacidade de reverter ou modificar padrões epigenéticos associados à resistência das células leucêmicas. Isso pode levar à reativação de genes supressores de tumor ou à desregulação de genes envolvidos em vias de sobrevivência, aumentando a sensibilidade das células leucêmicas aos tratamentos convencionais.

A regulação positiva da dinâmica proteica e a despolarização proteica observadas no tratamento com SB83 também podem ter implicações importantes na resistência à quimioterapia. A dinâmica proteica alterada em leucemias contribui para este evento, uma vez que a superexpressão de proteínas antiapoptóticas e a regulação inadequada da degradação proteica, por exemplo, podem dificultar a eficácia do tratamento (Sarkar *et al.*, 2014). Nesse sentido, compreender como essas alterações impactam o processo leucêmico pode fornecer novos *insights* para terapias mais eficazes.

Células leucêmicas resistentes muitas vezes desenvolvem mecanismos que alteram o turnover de proteínas, permitindo a acumulação de proteínas que promovem a sobrevivência celular, como as chaperonas e as proteínas antiapoptóticas (Neophytou *et al.*, 2021). De acordo com a análise de GO, o tratamento com o composto SB83 foi capaz de promover o turnover proteico, podendo induzir um estresse proteotóxico nas células leucêmicas e resultar em apoptose ou em uma maior vulnerabilidade a agentes quimioterápicos.

No tratamento com o composto SB200, a análise de GO revelou sua influência na maturação sináptica, com termos GO relacionados à montagem de complexos proteicos, incluindo o agrupamento de receptores de GABA. Um estudo conduzido por Li *et al.*, (2023) evidenciou a associação do sistema nervoso com a regulação do microambiente imunológico do tumor. A avaliação em modelo *in vivo* de câncer de mama, mostrou que o crescimento e a progressão do câncer foram acelerados após a estimulação do nervo simpático nos tumores, enquanto a estimulação do nervo parassimpático reduziu esse processo (Li *et al.*, 2023). Além disso, a ativação de receptores de GABA pôde provocar a regulação positiva na atividade das células imunes inflamatórias, como monócitos, macrófagos, linfócitos T, células dendríticas e células *natural killer* (NK), importantes para a imunidade antitumoral (Li *et al.*, 2023).

O SB200 também afetou a adesão celular, a interação célula-célula e a regulação do citoesqueleto, indicando que essa molécula pode impactar significativamente a organização celular. Na leucemia, as células hematopoiéticas perdem sua capacidade de diferenciação adequada, resultando na proliferação descontrolada de células imaturas (Siegel *et al.*, 2020). O crescimento anormal das células é acompanhado por alterações no citoesqueleto e na adesão celular, que influenciam diretamente a capacidade dessas células de migrar, se proliferar e interagir com o microambiente celular (Röselová *et al.*, 2018; Windisch *et al.*, 2019).

Portanto, o impacto do SB200 na regulação do citoesqueleto e da adesão célula-célula pode ter implicações cruciais no comportamento das células leucêmicas. Alterações no citoesqueleto podem afetar a plasticidade celular, a capacidade de invasão e a resistência ao tratamento (Bhat *et al.*, 2024), enquanto mudanças na adesão celular podem influenciar a

interação com o nicho da medula óssea, onde as células leucêmicas podem apresentar resistência à quimioterapia (Windisch *et al.*, 2019).

Os resultados da análise proteômica demonstraram que os compostos SB44, SB83 e SB200 nas células HL60/MX1 modulam diferentes vias de sinalização celular e processos biológicos. O tratamento com o composto SB44 influenciou a modulação de vias de regulação metabólica e gênica, influenciou a organização e regulação do citoesqueleto, a sinalização celular e ciclo celular, bem como alterou a via de sinalização de VEGF e modulou a regulação de peptídeos. Nossos resultados demonstram que o tratamento com composto SB44 resultou em modulação principalmente das vias relacionadas à regulação metabólica, expressão gênica e sinalização angiogênica.

A despeito da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), a via de sinalização do VEGF promove a sobrevivência das células leucêmicas, uma vez que constrói o arcabouço necessário para o suprimento nutricional deste tumor. O aumento da angiogênese no microambiente leucêmico está frequentemente relacionado com um prognóstico ruim e resistência ao tratamento, portanto, estratégias terapêuticas que visem frear este processo devem ser investigadas com afinco (Fiori *et al.*, 2023).

Por outro lado, o tratamento com composto SB83 induziu alterações nas vias associadas à imunomodulação, inflamação e regulação do crescimento celular. Além disso, nós observamos alterações na adesão celular, sinalização por receptores e quimiotaxia em resposta ao tratamento com SB83. Nossos resultados destacam o impacto diferencial dos compostos SB44 e SB83 na sinalização celular e metabólica em células HL60/MX1. A especificidade desses efeitos sugere que esses compostos podem ser potencialmente utilizados como estratégia terapêutica direcionada à LPA. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar o potencial terapêutico desses compostos em modelos *in vivo* e em ensaios clínicos.

Dentre os processos biológicos e vias de sinalização celulares alterados quando as células HL-60/MX1 foram tratadas com o composto SB83, podemos destacar a organização de organelas e regulação de componentes celulares, seguida pela dinâmica proteica, processos metabólicos, imunomodulação, inflamação e crescimento celular. Compreender os mecanismos pelos quais o SB83 atua pode oferecer informações importantes para o desenvolvimento de terapias direcionadas a condições específicas, especialmente aquelas relacionadas à regulação celular, como a resistência das células leucêmicas à quimioterapia.

No nosso trabalho, os processos biológicos e as vias de sinalização celular relacionados ao tratamento das células HL60/MX1 pelo composto SB200 apresentaram uma predominância de proteínas associadas à adesão celular e regulação do citoesqueleto, morfologia celular,

organização molecular e estrutural. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram uma relação entre as proteínas diferencialmente expressas e os processos envolvidos na maturação sináptica, incluindo a formação do complexo proteico.

As análises do MetaCore inferem que o tratamento com SB44 alterou a regulação da atividade do complexo EIF4F, o qual é responsável pela regulação da tradução de proteínas que controlam a expressão de proteínas oncogênicas. Além disso, o complexo eIF4F facilita a tradução de proteínas que conferem resistência à quimioterapia, tornando as células leucêmicas mais resilientes às terapias convencionais (Koscioczuk *et al.*, 2017). Em situações de estresse oxidativo, o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ativar mecanismos que inibem a formação do complexo eIF4F. Esse processo envolve a fosforilação de proteínas inibitórias, como as proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BP), que bloqueiam a interação de eIF4E com outros componentes do complexo, impedindo sua formação e a consequente tradução de proteínas pró-sobrevivência (Guo *et al.*, 2020).

A proteína CDC18L é fundamental no controle do ciclo celular, particularmente no processo de replicação do DNA e na transição para a fase de mitose, mantendo a estabilidade genômica. Durante o processo tumoral, a expressão aberrante desta proteína parece perturbar o processo pré-replicação, uma vez que esta proteína é um regulador-chave da fase G1 (Kanno *et al.*, 2023). As alterações na regulação de CDC18L, causadas pelo tratamento com o derivado SB83, podem diminuir a capacidade das células tumorais de replicar seu DNA e se proliferarem. Em contrapartida, as modificações na expressão de C-Src provocadas pelo tratamento com o derivado SB200 indicam que este composto atua fortemente na organização dos filamentos de actina e na migração celular e podem ser investigados por seu envolvimento direto na mobilidade tumoral (Lee *et al.*, 2020).

Os resultados da análise proteômica evidenciam a existência de distintos mecanismos de ação para os derivados tiofênicos investigados. A identificação desses mecanismos é de grande relevância terapêutica, pois possibilita a utilização combinada ou seletiva desses compostos em diferentes contextos clínicos, otimizando a eficácia e minimizando os efeitos adversos associados ao tratamento de leucemias resistentes. Assim, a caracterização dos mecanismos moleculares e celulares afetados pelos compostos SB44, SB83 e SB200 em células HL-60/MX1 por meios de ensaios biológicos adicionais poderá fornecer importantes informações para o desenvolvimento de terapias direcionadas. Nesse contexto, desenvolver novos compostos que atuem em múltiplos alvos terapêuticos, ao afetar diferentes vias moleculares simultaneamente, é interessante, pois reduz a probabilidade de desenvolvimento

de resistência, dificultando a adaptação das células leucêmicas à terapia e potencializando os resultados clínicos.

Os mecanismos de resistência a medicamentos antitumorais são complexos, e resulta em alterações celulares e moleculares que permitem às células tumorais evadir o efeito terapêutico das drogas. Entre os principais mecanismos, destacam-se a superexpressão de proteínas de efluxo, como as bombas de resistência multidrogas (MDR), que diminuem a concentração intracelular do fármaco, e a ativação de vias de sinalização de sobrevivência celular, promovendo a proliferação e sobrevivência das células tumorais (Bukowski *et al.*, 2020). Além disso, mutações em genes-alvo e mudanças epigenéticas nas células tumorais podem reduzir a afinidade da droga pelo seu alvo, reduzindo assim sua eficácia. Sendo assim, novas drogas que atuem em diferentes alvos moleculares tornam-se estratégicos, pois ao interferirem em múltiplas vias e processos celulares, dificultam a capacidade adaptativa das células tumorais, minimizando o risco de resistência e prolongando a eficácia terapêutica.

A geração de ROS desempenha um papel crucial em vários processos celulares, incluindo sinalização celular, regulação do ciclo celular e resposta imune, além disso, indica uma perturbação na homeostase, e seu acúmulo promove apoptose (Swain *et al.*, 2023). Neste estudo, investigamos os efeitos do tratamento com derivados de tiofeno na geração de ROS em células HL-60/MX1, evento que está diretamente envolvido com alguns processos celulares identificados após o tratamento com os compostos na análise de GO discutidos anteriormente, como expressão gênica, processos relacionados à apoptose e ciclo celular.

Os resultados mostraram uma significativa produção de superóxido nas células tratadas com os derivados SB44 e SB83 no tempo de tratamento de 24 horas. Um estudo conduzido por Hess *et al.* (2022) explicitou que uma classe específica de compostos heterocíclicos, que possuem um anel de tiofeno fundido a um anel de pirazol, promoveu a produção de superóxido nas células HL-60 em concentrações de CC_{50} (0,95 μ M) e $2x$ CC_{50} (1,9 μ M) no período de 18 horas. Do mesmo modo, Swain *et al.* (2023) também avaliaram o mesmo potencial de produção de superóxido por derivados tiofênicos, contudo na linhagem CCRF-CEM e pelo mesmo período, observaram uma produção de superóxido nas células após o tratamento com o derivado F8, um composto metil 5-[(dimetilamino)carbonil]-4-metil-2-[(3-fenil-2-propinol)amino]-3-tiofenocarboxilato, com um grupo dimetilamino ligado a um carbonil ($-C(=O)N(CH_3)_2$), um grupo 4-metil no anel tiofeno e um grupo 3-fenil-2-propinol ($-C(=O)N(CH_3)C\equiv C-C_6H_5$) ligado

à estrutura do tiofeno, na concentração de CC_{50} e $2X\ CC_{50}$ ($2,89\ \mu M$ e $5,78\ \mu M$), sugerindo a contribuição de radicais de oxigênio para a apoptose.

O derivado F8 assim como os três derivados tiofênicos em questão, possuem em sua estrutura grupos nitrila ($-C \equiv N$), que por sua vez podem influenciar características biológicas. Os grupos nitrila são apontados na literatura devido a sua capacidade em induzir a produção de ROS, levando ao estresse oxidativo e à apoptose em células tumorais (Nizami *et al.*, 2023). Embora a melhor atividade citotóxica tenha sido induzida pelo derivado SB200, o mesmo não foi capaz de promover alterações nos níveis de ROS das células HL-60/MX1, diferentemente dos derivados SB83 e SB44. Sendo assim, podemos inferir que a presença do anel ciclo-hexano pode estar associada a essas perturbações nos níveis de ROS. Demonstrando ainda mais a importância da produção de superóxido na LPA, o ATO, medicamento amplamente utilizado na clínica contra a LPA, exerce seu efeito antitumoral por diferentes vias, incluindo a geração de ROS e apoptose das células neoplásicas (Jambrovics *et al.*, 2023).

Nas mitocôndrias, níveis fisiológicos de $\bullet O_2^-$ e H_2O_2 participam da sinalização redox, mas sua produção é significativamente aumentada durante condições de estresse oxidativo, produzindo um desequilíbrio entre a produção de ROS e a ação do sistema de defesa antioxidante (Juan *et al.*, 2021). Após 24 horas, as células podem ter atingido um pico na produção de ROS, e após esse tempo, podem ativar mecanismos de defesa antioxidante para neutralizar o excesso de ROS, levando a uma diminuição na sua concentração.

A homeostase redox prejudicada exerce papéis-chave no processo de leucemogênese em células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras. O aumento do estado redox correlaciona-se com eventos mutacionais promovendo a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, aumento do metabolismo aeróbico e disfunção mitocondrial (Zhang *et al.*, 2014a). Nas células LMA, altos níveis de ROS são compensados por sistemas antioxidantes robustos para evitar a produção excessiva de ROS e proteger as células leucêmicas da morte celular induzida pelo estresse oxidativo (Schieber *et al.*, 2014). Deduzimos, portanto, que a capacidade dos derivados tiofênicos avaliados neste estudo de elevar a carga de ROS além dos níveis observados no controle veículo superou os sistemas antioxidantes celulares e foi capaz de ativar a via apoptótica nessas células.

A caracterização do perfil imunológico da linhagem HL-60/MX1 utilizando os marcadores CD11C, HLA-DR, CD56, CD45RA e CD16 permitiu uma avaliação da modulação celular induzida pelos derivados tiofênicos. Os resultados mostraram que o tratamento com os derivados SB200 e SB83 aumentou significativamente a expressão de HLA-DR e CD16, enquanto o SB44 apresentou também uma redução na expressão de CD45RA. Essas respostas

indicam uma modulação mais seletiva dos derivados, especialmente em relação aos marcadores associados à ativação imune e diferenciação celular (Grotjans *et al.*, 2016).

Além disso, a modulação do estresse do retículo endoplasmático induzido pelo SB200 desperta uma ideia de que esse composto pode promover a morte de células leucêmicas resistentes por meio da indução de vias de estresse celular. Este achado possibilita que novas investigações sejam possíveis, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento de terapias que objetivam induzir vulnerabilidades específicas em células tumorais por meio da modulação de respostas imunes e do estresse celular (Philippe *et al.*, 2024).

Com relação a avaliação de estresse do retículo endoplasmático (ER), os resultados sugerem que o derivado tiofênico SB200 não conseguiu induzir alterações na linhagem HL-60/MX1. Em contrapartida, o etoposídeo, utilizado no ensaio como controle positivo, mostrou indução significativa de estresse no ER, validando o experimento. Embora o SB200 tenha mostrado efeitos imunomoduladores, como a modulação de HLA-DR e CD16, ele pode não atuar diretamente sobre as vias de estresse do retículo endoplasmático das células leucêmicas. Isso pode indicar que seus mecanismos de ação ocorrem por outras rotas celulares ou moleculares, o que abre novos questionamentos sobre os alvos específicos do SB200 e sua potencial aplicação terapêutica.

A estrutura química dos tiofênicos pode favorecer interações com alvos específicos, como receptores de superfície ou enzimas envolvidas em processos imunológicos, mas não necessariamente com proteínas diretamente relacionadas ao controle do estresse no ER (Xu *et al.*, 2019). Em nosso estudo, os derivados de tiofeno induziram alterações significativas no ciclo celular das células da linhagem HL-60/MX1. Os três derivados tiofênicos avaliados neste estudo apresentaram significativa citotoxicidade frente à linhagem HL-60/MX1, no entanto, foi possível observar uma atividade citotóxica mais potente no SB200. Além disso, notamos, a partir dos resultados da análise proteômica, que os três derivados, apesar de apresentarem semelhanças estruturais atribuídas ao anel tiofeno, promovem seus efeitos por mecanismos moleculares distintos. Essa constatação permite que, em estudos futuros, as investigações se aprofundem de forma específica para cada derivado.

Os trabalhos aqui discutidos indicam uma lacuna significativa na literatura científica em relação à avaliação de derivados de tiofeno na linhagem HL-60/MX1, pois os estudos anteriores aqui mencionados exploram tanto outras classes de moléculas, quanto outras linhagens mais sensíveis, destacando a necessidade de investigações adicionais nesse domínio. Os resultados produzidos e apresentados no presente trabalho não só oferecem dados inovadores e de relevância científica no campo da química medicinal, mas também se destacam por sua

importância social, uma vez que trazem evidências iniciais de que novas abordagens terapêuticas surgirão para pacientes com LPA no futuro. Com isso, aprofundar as investigações acerca do tema, além de avaliar a atividade antineoplásica dos derivados tiofênicos em modelos *in vivo* é fundamental.

7. CONCLUSÃO

- Os derivados tiofênicos demonstraram atividade citotóxica contra a linhagem HL-60/MX1;
- O composto SB44 demonstrou capacidade de modular vias de regulação metabólica e gênica, afetar a organização do citoesqueleto, a sinalização e o ciclo celular, além de influenciar processos de angiogênese e regulação de peptídeos em células HL60/MX1;
- O composto SB83 influenciou a organização celular influenciando a dinâmica proteica, processos metabólicos, vias de imunomodulação e inflamação, o crescimento celular e a resposta imune em células HL60/MX1;
- O composto SB200 influenciou a adesão celular, citoesqueleto, morfologia celular e organização molecular em células HL60/MX1;
- Os derivados SB44 e SB83 induziram aumento da expressão de Espécies Reativas de Oxigênio na linhagem HL-60/MX1;
- Os derivados tiofênicos SB44, SB83, SB200 induziram alterações fenotípicas nas células da linhagem HL-60/MX1;
- Foram observadas alterações no ciclo celular das células HL-60/MX1 induzidas pelos derivados SB44 e SB83.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ADAMS, Gregor B *et al.* The hematopoietic stem cell in its place. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 333-337, 20 mar. 2006.

ALAM, Mohammad Mahboob *et al.* Synthesis and anticancer activity of novel Eugenol derivatives against breast cancer cells. *Natural Product Research*, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 1632-1640, 25 jul. 2022.

ALIMBETOV, Dauren *et al.* Pharmacological targeting of cell cycle, apoptotic and cell adhesion signaling pathways implicated in chemoresistance of cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1690, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Leukemia**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/leukemia.html>. Acesso em 02 abr. 2024.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Leukemya**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/leukemia.html#:~:text=Leukemia%20is%20a%20cancer%20of,in%20other%20blood%20cell%20types>. Acesso em 02 Jun. 2024.

APPELBAUM, Frederick R. *et al.* Acute Myeloid Leukemia. **Hematology**, [S.L.], v. 2001, n. 1, p. 62-86, 1 jan. 2001.

ARBER *et al.* Daniel, Orazi A, Hasserjian R, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20): 2391-2405. **Blood**, [S.L.], v. 128, n. 3, p. 462-463, 21 jul. 2016a.

ARBER, Daniel A. *et al.* International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. **Blood**, [S.L.], v. 140, n. 11, p. 1200-1228, 15 set. 2022b.

ARCHNA *et al.* Thiophene-based derivatives as anticancer agents: an overview on decade's work. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 101, p. 104026, ago. 2020.

ARÉVALO, Cindy Mayerli *et al.* Plant-derived extracts and metabolic modulation in leukemia: a promising approach to overcome treatment resistance. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, 2023.

BAILLY, Christian. Etoposide: a rider on the cytokine storm. **Cytokine**, v. 168, p. 156234, 2023.

BALASUNDARAM, Nithya *et al.* Metabolic adaptation drives arsenic trioxide resistance in acute promyelocytic leukemia. **Blood advances**, v. 6, n. 2, p. 652-663, 2022.

BARNUM, Kevin J. *et al.* Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 29-40, 2014.

BEERMAN, Isabel *et al.* The evolving view of the hematopoietic stem cell niche. **Experimental Hematology**, [S.L.], v. 50, p. 22-26, jun. 2017.

BENVENISTE, Patricia *et al.* Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells with Extended but Time-Limited Reconstitution Potential. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 48-58, jan. 2010.

BHAT S. I, *et al.* Cancer cell plasticity: from cellular, molecular, and genetic mechanisms to tumor heterogeneity and drug resistance. **Cancer Metastasis Rev.** 2024 Mar;43(1):197-228.

BILIK, Petr *et al.* Novel Dications with Unfused Aromatic Systems: trithiophene and trifuran derivatives of furimidazoline. **Chembiochem**, [S.L.], v. 2, n. 7-8, p. 559-569, 27 jul. 2001.

BISPO, Jordan A. Baeker; PINHEIRO, Paulo S.; KOBETZ, Erin K. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 10, n. 6, p. a034819, 2020.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 68, n. 6, p. 394-424, 12 set. 2018.

BREITMAN, T. R.; SELONICK, Stuart E.; COLLINS, Steven J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 5, p. 2936-2940, 1980.

BROWN, Kyle A. *et al.* Top-down proteomics: challenges, innovations, and applications in basic and clinical research. Expert review of proteomics, v. 17, n. 10, p. 719-733, 2020.

BUKOWSKI, Karol *et al.* Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.

CARBONE, Antonino *et al.* Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Discovering Diseases—Defining Their Features. **Hemato**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 7-9, 13 maio 2020.

CARROLL, Dustin *et al.* Hematopoietic Stem Cells: normal versus malignant. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 29, n. 16, p. 1612-1632, dez. 2018.

CASEY, Stephanie C. *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. In: Seminars in cancer biology. **Academic Press**, 2015. p. S199-S223.

CASTELIJN, Daan AR *et al.* An Acute Promyelocytic Leukemia Resistant to All-Trans Retinoic Acid: A Case Report of the ZBTB16:: RARa Variant and Review of the Literature. **Case Reports in Oncology**, v. 16, n. 1, p. 1443-1450, 2023.

CHALE, Ravinder; ABAD, Andrea; JIMENEZ, Joaquin. Acute Promyelocytic Leukemia—A Review of the Literature. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 19, p. S236-S237, 2019.

CHEN, Jiaxin *et al.* Natural products as potential drug treatments for acute promyelocytic leukemia. **Chinese Medicine**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 01-19, 3 abr. 2024.

CICCONI, L. *et al.* Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 1474-1481, ago. 2016.

CINGAM, Shashank R.; KOSHY, Nebu V. Acute promyelocytic leukemia. 2017.

CONNEELY, Shannon *et al.* Advances in Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia. **Children**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 11, 2 fev. 2020.

COOMBS, C C *et al.* Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. **Blood Cancer Journal**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 304-304, 17 abr. 2015.

DA CRUZ, Ryldene Marques Duarte *et al.* Thiophene-based compounds with potential anti-inflammatory activity. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 7, p. 692, 2021.

DE OLIVEIRA SANTOS, Marceli *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.

DE OLIVEIRA, Jamerson Ferreira *et al.* Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 104, p. 148-156, 2015.

DEEP, Aakash *et al.* Thiophene scaffold as prospective central nervous system agent: A review. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)**, v. 16, n. 2, p. 158-164, 2016.

DING, Lei *et al.* Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. **Nature**, [S.L.], v. 495, n. 7440, p. 231-235, 24 fev. 2013.

DÖHNER, Hartmut *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 140, n. 12, p. 1345-1377, 2022.

DOS SANTOS, Flaviana Alves *et al.* Anticancer properties of thiophene derivatives in breast cancer MCF-7 cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 2, p. 157-166, 2018.

DU, Zhifeng *et al.* Mass spectrometric proteomics reveals that nuclear protein positive cofactor PC4 selectively binds to cross-linked DNA by a trans-platinum anticancer complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 8, p. 2948-2951, 2014.

DUPREE, Emmalyn J. *et al.* A critical review of bottom-up proteomics: the good, the bad, and the future of this field. **Proteomes**, v. 8, n. 3, p. 14, 2020.

ECKERT, Mark A. *et al.* Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. **Nature**, v. 569, n. 7758, p. 723-728, 2019.

EFEUGLU, Esen *et al.* Label-free quantitative proteomics analysis of adriamycin selected multidrug resistant human lung cancer cells. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, p. 1401, 2022.

ELEGHEERT, Jonathan *et al.* Structural mechanism for modulation of synaptic neuroligin-neurexin signaling by MDGA proteins. **Neuron**, v. 95, n. 4, p. 896-913. e10, 2017.

ELHABASHY, Hadeer *et al.* Exploring protein-protein interactions at the proteome level. **Structure**, v. 30, n. 4, p. 462-475, 2022.

EL-METWALLY, Souad A. *et al.* Novel tetrahydrobenzo [b] thiophene compounds exhibit anticancer activity through enhancing apoptosis and inhibiting tyrosine kinase. **Anti-Cancer**

Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), v. 18, n. 12, p. 1761-1769, 2018.

PHILIPPE, Céline *et al.* Pivotal role of the endoplasmic reticulum stress-related XBP1s/miR-22/SIRT1 axis in acute myeloid leukemia apoptosis and response to chemotherapy. **Leukemia**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 1764-1776, 22 jun. 2024.

GARCIAZ, Sylvain *et al.* Venetoclax Resistance in Acute Myeloid Leukemia. **Cancers**, v. 16, n. 6, p. 1091, 2024.

GARITANO-TROJAOLA, Andoni *et al.* Actin cytoskeleton deregulation confers midostaurin resistance in FLT3-mutant acute myeloid leukemia. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 799, 2021.

GHAVAMZADEH, Ardeshir *et al.* Phase II Study of Single-Agent Arsenic Trioxide for the Front-Line Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 29, n. 20, p. 2753-2757, 10 jul. 2011.

GHORAB, Mostafa M.; BASHANDY, Mahmoud S.; AL-SAID, MANSOUR S. Novel thiophene derivatives with sulfonamide, isoxazole, benzothiazole, quinoline and anthracene moieties as potential anticancer agents. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 4, p. 419-431, 2014.

GREENBAUM, Adam *et al.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. **Nature**, [S.L.], v. 495, n. 7440, p. 227-230, 24 fev. 2013.

GROHMANN, Theresa *et al.* Inhibition of NAMPT sensitizes MOLT4 leukemia cells for etoposide treatment through the SIRT2-p53 pathway. **Leukemia research**, v. 69, p. 39-46, 2018.

GROOTJANS, Joep *et al.* The unfolded protein response in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 469-484, 27 jun. 2016.

GUO, Yanting *et al.* Optimization of protein-level tandem mass tag (TMT) labeling conditions in complex samples with top-down proteomics. **Analytica chimica acta**, v. 1221, p. 340037, 2022.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HARTMANN, Luise *et al.* Molecular characterization of acute myeloid leukemia patients who relapse more than 3 years after diagnosis: an exome sequencing study of 31 patients. **Haematologica**, [S.L.], v. 105, n. 4, p. 157-159, 1 ago. 2019.

HESS, Jessica D. *et al.* Identification of a unique cytotoxic thieno [2, 3-c] pyrazole derivative with potent and selective anticancer effects in vitro. **Biology**, v. 11, n. 6, p. 930, 2022.

HILLESTAD, L K. Acute promyelocytic leukemia. **Acta medica Scandinavica**, v. 159, n. 3, p.189- 194, 1957.

HU, Jinyue *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) is involved in toll-like receptor (TLR)-mediated TNF- α production in monocytic THP-1 cells. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78832, 2013.

INDRAYANTO, Gunawan; PUTRA, Galih Satrio; SUHUD, Farida. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. **Profiles of drug substances, excipients and related methodology**, v. 46, p. 273-307, 2021.

INSTITUTO AC CAMARGO DE CÂNCER. **Leucemia em adultos**. Disponível em: <https://accamargo.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/leucemia-adulto>. Acesso em: 3 out. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Leucemia**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>. Acesso em 02 abr. 2024.

JAMBROVICS, Károly *et al.* ATO increases ROS production and apoptosis of cells by enhancing calpain-mediated degradation of the cancer survival protein TG2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 10938, 2023.

JIMENEZ, Joaquin J. *et al.* Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. **Oncotarget**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 992-1003, 17 mar. 2020.

JUAN, Celia Andrés *et al.* The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: outlining their role in biological macromolecules (dna, lipids and proteins) and induced pathologies. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 4642, 28 abr. 2021.

JORDAN, C T *et al.* Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. **Genes & Development**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 220-232, fev. 1990.

JULIUSSON, Gunnar *et al.* Leukemia. **Progress In Tumor Research**, [S.L.], p. 87-100, 2016.

JUNIOR, FJB Mendonça *et al.* Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4, 5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 8, p. 1492-1499, 2011.

KADAKERI, Shobhit *et al.* Protein synthesis and characterization. In: Artificial Protein and Peptide Nanofibers. **Woodhead Publishing**, 2020. p. 121-161.

KAKIZUKA, A. *et al.* Chromosomal translocation t (15; 17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor, PML. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 663-674, 1991.

KALEV-ZYLINSKA, Maggie L. *et al.* N-methyl-d-aspartate receptors in hematopoietic cells: What have we learned?. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 508065, 2020.

KANTARJIAN, Hagop M. *et al.* Acute myeloid leukemia: treatment and research outlook for 2021 and the md anderson approach. **Cancer**, [S.L.], v. 127, n. 8, p. 1186-1207, 18 mar. 2021.

KARABACAK, N. Murat *et al.* Sensitive and specific identification of wild type and variant proteins from 8 to 669 kDa using top-down mass spectrometry* S. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 846-856, 2009.

KAWAMOTO, H. *et al.* A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. **International Immunology**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 65-70, 6 jan. 2010.

KILBOURN, Michael R. Thiophenes as phenyl bio-isosteres: Application in radiopharmaceutical design—I. Dopamine uptake antagonists. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 16, n. 7, p. 681-686, 1989.

KOPYLOV, Arthur T. *et al.* Revelation of proteomic indicators for colorectal cancer in initial stages of development. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 619, 2020.

KOSAN, Christian *et al.* Genetic and Epigenetic Mechanisms That Maintain Hematopoietic Stem Cell Function. **Stem Cells International**, [S.L.], v. 2016, p. 1-14, 2016.

KOSCIUCZUK, Ewa M.; SALEIRO, Diana; PLATANIAS, Leonidas C. Dual targeting of eIF4E by blocking MNK and mTOR pathways in leukemia. **Cytokine**, v. 89, p. 116-121, 2017.

KUEK, Vincent *et al.* Therapeutic Targeting of the Leukaemia Microenvironment. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 13, p. 6888, 26 jun. 2021.

KUMAR, Neha Rani *et al.* Advances in the Chemistry of 2,4,6-Tri(thiophen-2-yl)-1,3,5-triazine. **Chemistryopen**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-32, jan. 2023.

KWON, Yang Woo *et al.* Application of proteomics in cancer: recent trends and approaches for biomarkers discovery. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 747333, 2021.

LAHSASNI, Siham *et al.* Synthesis, Characterization, and Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities of New Pyrimidine and Thiophene Derivatives. **Journal of Chemistry**, v. 2018, n. 1, p. 8536063, 2018.

LEE, Pey Yee; SARAYGORD-AFSHARI, Neda; LOW, Teck Yew. The evolution of two-dimensional gel electrophoresis-from proteomics to emerging alternative applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1615, p. 460763, 2020.

LI, Haitao *et al.* Analysis of early death in critically ill patients with acute promyelocytic leukaemia in the HICU. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 01-15, 28 ago. 2024.

LI, Jie *et al.* The association between the neuroendocrine system and the tumor immune microenvironment: emerging directions for cancer immunotherapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, p. 189007, 2023.

LISBOA, Thaís *et al.* Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 64, 24 dez. 2019.

LU, Rong *et al.* Sleeping Beauty Wakes Up the Clonal Succession Model for Homeostatic Hematopoiesis. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 677-678, dez. 2014.

LU, Sheng-ye *et al.* Oral etoposide combined with oral arsenic plus retinoic acid for two cases with newly diagnosed high-risk acute promyelocytic leukemia during COVID19 pandemic. **Leukemia Research Reports**, v. 16, p. 100258, 2021.

MACKLIN, Andrew; KHAN, Shahbaz; KISLINGER, Thomas. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. **Clinical proteomics**, v. 17, n. 1, p. 17, 2020.

MAJI, Sumit *et al.* Anticancer Potential of the S-Heterocyclic Ring Containing Drugs and its Bioactivation to Reactive Metabolites. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], p. 14-22, 19 jun. 2024

MARYANOVICH, Maria; TAKEISHI, Shoichiro; FRENETTE, Paul S. Neural regulation of bone and bone marrow. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 9, p. a031344, 2018.

MEDLINEPLUS. **Acute Myeloid Leukemia**. Disponível em:
<https://medlineplus.gov/acute/myeloidleukemia.html#:~:text=What%20is%20acute%20myeloid%20leukemia,red%20blood%20cells%2C%20or%20platelets>. Acesso em 02 Jun. 2024.

MENDELSON, Avital *et al.* Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 833-846, ago. 2014.

MISHRA, Raghav *et al.* Synthesis, properties and biological activity of thiophene: A review. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 4, p. 38-54, 2011.

MISHRA, Sushanta Kumar; MILLMAN, Scott E.; ZHANG, Lingbo. Metabolism in acute myeloid leukemia: mechanistic insights and therapeutic targets. **Blood**, v. 141, n. 10, p. 1119-1135, 2023.

MONTIRONI, Chiara *et al.* Hematopoietic versus Solid Cancers and T Cell Dysfunction: looking for similarities and distinctions. **Cancers**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 284, 14 jan. 2021.

MOTA, Clelia AX *et al.* A study of the antinociceptive, anti-inflammatory, and toxicological activity of a promising thiophene derivative. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 37, n. 3, p. 579-87, 2018.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Leukemia—Patient Version**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/leukemia>. Acesso em 02 abr. 2024.

NEOPHYTOU, Christiana M. *et al.* The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2053, 2021.

NIZAMI, Zohra Nausheen *et al.* Oxidative Stress Inducers in Cancer Therapy: preclinical and clinical evidence. **Antioxidants**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 1159, 26 maio 2023.

NOGUERA, Nélica Inés *et al.* Acute promyelocytic leukemia: update on the mechanisms of leukemogenesis, resistance and on innovative treatment strategies. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1591, 2019.

O'DONNELL, Margaret R. *et al.* Acute myeloid leukemia, version 2.2013. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 11, n. 9, p. 1047-1055, 2013.

ONG, Mei Shan *et al.* Cytoskeletal proteins in cancer and intracellular stress: a therapeutic perspective. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 238, 2020.

PADMAKUMAR, Devipriya *et al.* A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 111, p. 106727, 2021.

PAPAEMMANUIL, Elli *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 374, n. 23, p. 2209-2221, 9 jun. 2016.

PATHANIA, Shelly *et al.* Thiophene-based derivatives as anticancer agents: An overview on decade's work. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, p. 104026, 2020.

PELCOVITS, Ari; NIROULA, Rabin. Acute myeloid leukemia: a review. **Rhode Island medical journal**, v. 103, n. 3, p. 38-40, 2020.

PINNA, Giansalvo *et al.* Tricyclic pyrazoles part 7. Discovery of potent and selective dihydrothienocyclopentapyrazole derived CB2 ligands. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 85, p. 747-757, out. 2014.

QUIRINO, M. **Avaliação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de células leucêmicas resistentes a inibidores de topoisomerases**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Recife, Pernambuco, p. 47. 2016.

RAJPURKAR, Madhvi *et al.* Risk Markers for Significant Bleeding and Thrombosis in Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia; Report From the Children's Oncology Group Study AAML0631. **Journal Of Pediatric Hematology/Oncology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 51-55, jan. 2019.

RATOVITSKI, Edward. Anticancer natural compounds as epigenetic modulators of gene expression. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 175-205, 2017.

RIBATTI, Domenico *et al.* Hematopoiesis and Mast Cell Development. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 13, p. 10679, 26 jun. 2023.

ROMAN DIAZ, Jaime L.; VAZQUEZ MARTINEZ, Mariola; KHAMANI, Farhad. New Approaches for the Treatment of AML beyond the 7+ 3 Regimen: Current Concepts and New Approaches. **Cancers**, v. 16, n. 3, p. 677, 2024.

ROSELOVÁ P, *et al.* Adhesion structures in leukemia cells and their regulation by Src family kinases. **Cell Adh Migr**. 2018 May 4;12(3):286-298.

SACHS, Leo *et al.* Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. **Nature**, [S.L.], v. 274, n. 5671, p. 535-539, ago. 1978.

SADIDA, Hana Q. *et al.* Epigenetic modifications: Key players in cancer heterogeneity and drug resistance. **Translational oncology**, v. 39, p. 101821, 2024.

SALIMI-JEDA, Ali *et al.* Autophagy modulation and cancer combination therapy: a smart approach in cancer therapy. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 30, p. 100512, 2022.

SANZ, Miguel A. *et al.* History of Acute Promyelocytic Leukemia. **Clinical Hematology International**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 142, 2021a.

SANZ, Miguel A.; LO-COCO, Francesco. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 495-503, 2011b.

SARKAR, Ruma *et al.* Curcumin augments the efficacy of antitumor drugs used in leukemia by modulation of heat shock proteins via HDAC6. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 33, n. 3, 2014.

SCHIEBER, Michael *et al.* ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 453-462, maio 2014.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 17-48, jan. 2023.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2024. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 12-49, jan. 2024.

SIMULA, Maria Paola *et al.* Two-dimensional gel proteome reference map of human small intestine. **Proteome Science**, v. 7, p. 1-8, 2009.

SINGH, Atamjit; SINGH, Gurvinder; BEDI, Preet Mohinder Singh. Thiophene derivatives: A potent multitargeted pharmacological scaffold. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2658-2703, 2020.

SOMMELLA, Eduardo *et al.* A Label-free proteomic approach for the identification of biomarkers in the exosome of endometrial cancer serum. **Cancers**, v. 14, n. 24, p. 6262, 2022.

SONG, Yongxi *et al.* Screening of potential biomarkers for gastric cancer with diagnostic value using label-free global proteome analysis. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, v. 18, n. 6, p. 679-695, 2020.

STAHL, Maximilian *et al.* Acute promyelocytic leukemia (APL): remaining challenges towards a cure for all. **Leukemia & Lymphoma**, [S.L.], v. 60, n. 13, p. 3107-3115, 10 nov. 2019.

STROHKAMP, Sarah; GEMOLL, Timo; HABERMANN, Jens K. Possibilities and limitations of 2DE-based analyses for identifying low-abundant tumor markers in human serum and plasma. **Proteomics**, v. 16, n. 19, p. 2519-2532, 2016.

SWAIN, Risa Mia *et al.* Thiophene derivative inflicts cytotoxicity via an intrinsic apoptotic pathway on human acute lymphoblastic leukemia cells. **Plos one**, v. 18, n. 12, p. e0295441, 2023.

SZABLEWSKI, Leszek. Insulin Resistance: The Increased Risk of Cancers. **Current Oncology**, v. 31, n. 2, p. 998-1027, 2024.

SZTANKE, Małgorzata; RZYMOWSKA, Jolanta; SZTANKE, Krzysztof. Synthesis, structure elucidation and identification of antiproliferative activities of a novel class of thiophene bioisosteres bearing the privileged 7, 8-dihydroimidazo [2, 1-c][1, 2, 4] triazin-4 (6H)-one scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 3448-3456, 2015.

TESTA, Ugo *et al.* Leukemia stem cells. **Annals Of Hematology**, [S.L.], v. 90, n. 3, p. 245-271, 25 nov. 2010.

TREVIÑO, Lisa R *et al.* Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 1001-1005, 16 ago. 2009.

TUŠEK-BOŽIĆ, Ljerka *et al.* Spectroscopic and biological properties of palladium (II) complexes of ethyl 2-quinolylmethylphosphonate. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 72, n. 3-4, p. 201-210, 1998.

VAKITI, Anusha; MEWAWALLA, Prerna. Acute myeloid leukemia. 2018.

VALLAN, Lorenzo *et al.* Thiophene-Based Trimers and Their Bioapplications: an overview. **Polymers**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 1977, 16 jun. 2021.

VIEIRA, M. S. *et al.* Diagnóstico laboratorial de leucemia promielocítica aguda com uma translocação rara variante: relato de caso. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 45, p. S148-S149, 2023.

VILLANI, Alexandra-Chloé *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. **Science**, [S.L.], v. 356, n. 6335, p. 01-31, 21 abr. 2017.

VOLODINA, Yulia L. *et al.* Thiophene-2-carboxamide derivatives of anthraquinone: A new potent antitumor chemotype. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 221, p. 113521, 2021.

WEINBERG, Olga K. *et al.* The International Consensus Classification of acute myeloid leukemia. **Virchows Archiv**, v. 482, n. 1, p. 27-37, 2023.

WELCH, John S. *et al.* The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **Cell**, [S.L.], v. 150, n. 2, p. 264-278, jul. 2012.

WENZEL, Elizabeth S.; SINGH, Amareshwar T. K.. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. **In Vivo**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 1-5, 2 jan. 2018.

WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, Bernard W. World cancer report: cancer research for cancer prevention. **International Agency for Research on Cancer**. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020.

WINDISCH R, *et al.* C. Oncogenic Deregulation of Cell Adhesion Molecules in Leukemia. **Cancers** (Basel). 2019 Mar 5;11(3):311.

WOODS, Ashley C. *et al.* Differentiation Syndrome in Acute Leukemia: apl and beyond. **Cancers**, [S.L.], v. 15, n. 19, p. 4767, 28 set. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/news-events/who-classification-of-tumours-of-haematopoietic-and-lymphoid-tissues-2/>. Acesso em 02 Jun. 2024.

XU, Zhuyu *et al.* Novel HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugates of Trastuzumab Beyond T-DM1 in Breast Cancer: trastuzumab deruxtecan(ds-8201a) and (vic-)trastuzumab duocarmazine (syd985). **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 183, p. 111682, dez. 2019b.

YAN, Meng *et al.* Arsenic trioxide: applications, mechanisms of action, toxicity and rescue strategies to date. **Archives of Pharmacal Research**, v. 47, n. 3, p. 249-271, 2024.

YANG, Chengwen *et al.* Development of 3-Phenyl-N-(2-(3-phenylureido)ethyl)-thiophene-2-sulfonamide Compounds as Inhibitors of Antiapoptotic Bcl-2 Family Proteins.

Chemmedchem, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 1436-1452, 29 abr. 2014.

IYER, Sunil Girish *et al.* The treatment of acute promyelocytic leukemia in 2023: paradigm, advances, and future directions. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 12, p. 01-15, 18 jan. 2023.

YILMAZ, Musa *et al.* Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. **Blood Cancer Journal**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1-9, 30 jun. 2021.

ZENG, Wenjuan *et al.* Elevated N-glycosylation contributes to the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells revealed by membrane proteomic and glycoproteomic analysis.

Frontiers in pharmacology, v. 12, p. 805499, 2021.

ZHANG, Bei-bei *et al.* Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in cancer stem cells. **Familial cancer**, v. 14, p. 19-23, 2015a.

ZHANG, Lingtian *et al.* Discovery of imidazo[1,2-a]pyridine-thiophene derivatives as FLT3 and FLT3 mutants inhibitors for acute myeloid leukemia through structure-based optimization of an NEK2 inhibitor. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 225, p. 113776, dez. 2021b.

ZHANG, Pan *et al.* Single-cell RNA sequencing to track novel perspectives in HSC heterogeneity. **Stem Cell Research & Therapy**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 01-15, 29 jan. 2022c.

ZHAO, Lei *et al.* Comparative evaluation of label-free quantification strategies. **Journal of proteomics**, v. 215, p. 103669, 2020.

ZHOU, Bo O. *et al.* Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. **Nature Cell Biology**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 891-903, 17 jul. 2017.

ZHU, Gengjun *et al.* Proteomics of post-translational modifications in colorectal cancer: Discovery of new biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1877, n. 4, p. 188735, 2022.