

HUGO PASSOS VICARI

**Investigação do potencial antineoplásico de novos fármacos que modulam a
dinâmica de microtúbulos em leucemias agudas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2024

HUGO PASSOS VICARI

**Investigação do potencial antineoplásico de novos fármacos que modulam a
dinâmica de microtúbulos em leucemias agudas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto

Versão Original

São Paulo
2024

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Passos Vicari, Hugo

Investigação do potencial antineoplásico de novos fármacos que modulam a dinâmica de microtúbulos em leucemias agudas / Hugo Passos Vicari; orientador João Agostinho Machado Neto. -- São Paulo, 2024.

159 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leucemias Agudas. 2. Microtúbulos. 3. Stathmin 1. 4. Resistência. 5. Biologia do Câncer. I. Machado Neto, João Agostinho, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Hugo Passos Vicari

Título da Dissertação/Tese: Investigação do potencial antineoplásico de novos fármacos que modulam a dinâmica de microtúbulos em leucemias agudas

Orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1145/2020** referente ao projeto intitulado: **"Investigação funcional de Stathmin 1 na proliferação, diferenciação e apoptose em modelo de leucemia promielocítica aguda"**, sob a responsabilidade do(a) aluno(a) **Hugo Passos Vicari**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **João Agostinho Machado Neto**, do Departamento de Farmacologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 29 de outubro de 2020.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
CoordenadoraCEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
CoordenadoraCEPSH ICB/USP

Ao meu pai, Rogério, minha mãe, Eneida, e aos meus irmãos Caio e Laura.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (USP), a melhor universidade do país, por me proporcionar a oportunidade de realizar meu Doutorado nesta instituição de excelência. O sonho de ser estudante da USP permeia a mente de muitos - ou quase todos - os estudantes das mais diversas áreas. Nesse sentido, tive a felicidade de realizar esse sonho durante minha pós-graduação, aproveitando toda a sua estrutura e recursos.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) pelo esforço contínuo em produzir conhecimento científico e desenvolver pesquisas de altíssima qualidade a nível mundial. Sou extremamente grato pela infraestrutura do instituto, especialmente os laboratórios de pesquisa. Manifesto minha profunda gratidão a todos os professores, pesquisadores, técnicos e funcionários do instituto, cuja dedicação e empenho contribuem significativamente para a grandeza e importância desta instituição

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agência de fomento referência nacional, que provê aos institutos e aos pesquisadores bolsistas auxílios e oportunidades. Um prazer ter sido bolsista desta agência sólida e importante para a pesquisa nacional. O presente trabalho foi financiado pela FAPESP através dos processos 2019/01700-2 e 2021/01460-1.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do qual fui bolsista por um breve período durante o Doutorado (processo: 140043/2022-5), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que também me concedeu bolsa e apoiou o presente trabalho (Código de Financiamento 001).

Ao meu professor orientador, João Agostinho Machado Neto. Desde o começo de minha iniciação científica, sob sua supervisão, percebi a sorte que tive ao tê-lo como orientador. Sempre disposto a auxiliar em todos os aspectos, sem medir esforços, desde os procedimentos e técnicas até orientações e conselhos. Sua confiança em mim e seu apoio ao longo desses quase sete anos juntos foram fundamentais. Guardo comigo a lembrança de, ao final de 2018, após perder a prova de ingresso ao mestrado, João me dizer: 'você já é meu aluno', demonstrando o cuidado e carinho que tem por seus orientandos. Agradeço imensamente, Professor!

À minha família: meu pai, Rogério; minha mãe, Eneida; e meus irmãos, Caio e Laura. Vocês sempre fizeram tudo por mim e, por isso, eu nunca deixaria de retribuir da mesma forma. Obrigado, pais, por todo o estímulo, motivação, confiança, amor e carinho que sempre me deram. Se cheguei até este momento, foi graças à ajuda e ao companheirismo de vocês. Vocês fazem parte desta conquista. Obrigado pela educação e pelas oportunidades que me proporcionaram. Obrigado, Caio, meu irmão mais velho, por nunca deixar de demonstrar amor por mim. Obrigado, Laura – ou melhor, Laurinha – simplesmente por existir. Você é a melhor surpresa que a vida trouxe a esta família. Amo vocês.

À Princesa (sim, ela está aqui), minha cachorra de estimação. Através desses animaizinhos, descobrimos os verdadeiros significados de amor, companheirismo e fidelidade. Você surgiu em minha vida no início da minha pós-graduação (em 2019) e foi responsável por me alegrar em incontáveis momentos. Obrigado por me receber em casa com tanta festa nos dias cansativos de experimentos e pela companhia durante os meses difíceis da pandemia. Agradeço por sua presença diária e por tornar cada dia mais especial.

À Mariana, minha namorada, amiga e companheira. Agradeço por todos esses anos ao seu lado. Você foi a maior surpresa que a pós-graduação poderia me proporcionar. Meu doutorado não seria o mesmo sem você. Você esteve presente nos momentos de alegria, risadas, carinho e descontração, mas também nos momentos difíceis, onde me deu força e apoio. Obrigado por acreditar em mim e por sempre me motivar. Saiba que pode contar comigo sempre. Amo você.

Ao Jorge, meu primeiro colega no laboratório 210. Agradeço por tantas conversas, risadas, momentos divertidos e pelo companheirismo ao longo desses anos. Obrigado pela sua ajuda em diversos experimentos e por compartilharmos momentos desde o início até o fim do meu Doutorado. Sua amizade é muito importante para mim. Obrigado.

Ao Jean. Sua chegada ao laboratório inicialmente gerou desconfiança, já que entrou em um grupo pequeno de forma inesperada. No entanto, essa desconfiança logo se foi assim que nos conhecemos. Desde então, descobri uma das pessoas mais positivas e dispostas que já tive o prazer de conhecer. Agradeço por ser um companheiro e amigo tão dedicado, e por todos os momentos cheios de risadas que

compartilhamos. E, é claro, obrigado por toda a ajuda nos cálculos de diluição ou no congelamento de células (risos).

À Keli. Você me ajudou por diversas vezes em inúmeros experimentos e situações. Sua ajuda foi fundamental para um melhor desenvolvimento do meu trabalho. Obrigado por sempre se abrir comigo e sempre se mostrar uma amiga. Desejo o melhor a você. Obrigado!

Às minhas colegas Bruna e Lívia. Bruna, obrigado por sua delicadeza de sempre ao ajudar as pessoas. Lívia, obrigado pelas risadas e por ser uma pessoa sincera sempre. Vocês são uma ótima companhia e eu agradeço por ter compartilhado alguns anos junto de vocês.

A todos os meu colegas de laboratório que me proporcionaram momentos de descontração, mas também de ajuda, companhia e atenção. Obrigado Giovana por ser uma IC extremamente divertida e ter tornado alguns dos meus experimentos mais leves; obrigado Isabele por ser muito educada e atenciosa; obrigado Natália por ser uma pessoa leve e empolgada, sua empolgação contagia; obrigado Maria Fernanda pela educação de sempre e companhia; obrigado Anali pelos mimos que sempre leva ao laboratório e pelas várias vezes que me sanou dúvidas. Por fim, obrigado Gustavo por ser um colega com uma energia ótima e que me garantiu boas risadas. Obrigado a todos vocês.

À Carmen, técnica do laboratório que, ao assumir o posto, passou a auxiliar todos os alunos do laboratório com absoluta boa vontade e atenção.

À Regina e ao Douglas. Agradeço por me incentivarem a estudar inglês e por todo o apoio que me deram para que eu conseguisse concluir meu doutorado; a ajuda de vocês foi fundamental. Além disso, sou imensamente grato pelo carinho constante que sempre demonstraram por mim.

À Vitória, por ter se tornado uma amiga em que posso confiar. Obrigado por diversos momentos engraçados e alegres que pudemos compartilhar.

À Denise, minha tia e madrinha, que sempre me incentivou e apoiou. Sua demonstração de carinho tem um valor inestimável para mim. Muito obrigado.

À Eliane, minha tia e à Nathália e Nicole, primas. Vocês são como minha segunda mãe e irmãs para mim. Mesmo que nossos encontros presenciais não sejam

frequentes, tê-las por perto é reconfortante e me faz muito bem. Agradeço por todo o amor e apoio.

Ao Laboratório de Farmacologia Marinha (LAFARMAR) e à supervisora do mesmo, Professora Letícia Costa Veras Lotufo. Agradeço imensamente por todo o apoio às atividades conduzidas no laboratório 210. Sou grato por abrir as portas do seu laboratório e por se preocupar com a qualidade de nossas pesquisas. A generosidade ao fornecer e compartilhar materiais, praticamente sem restrições, é inestimável, assim como a ajuda intelectual que recebi ao longo de todo o meu doutorado.

Ao Laboratório de Sinalização Redox, à professora Lucia Lopes Rosseti e ao técnico Sidnei. Gostaria de expressar minha sincera gratidão pelos ambientes do laboratório frequentemente cedidos a nós. Isso foi fundamental para o sucesso dos meus experimentos em sala de cultura. Sidnei, obrigado pelo suporte e prontidão em responder às minhas dúvidas.

Ao Laboratório de Nanofármacos e Sistema de Liberação, e às professoras Luciana e Eli. A colaboração de vocês na minha pesquisa foi de grande relevância. Isso engloba não apenas a assistência intelectual, mas também o compartilhamento de materiais e equipamentos.

À Mônica, secretária do departamento, que está sempre disposta a sanar dúvidas da maneira mais rápida possível sobre questões relativas ao curso. Obrigado por sua prontidão em me ajudar sempre que necessário.

Ao professor Fernando Coelho e seus alunos Daniara e Ralph. Este grupo sintetizou e cedeu compostos inéditos, cujo mecanismo de ação foi explorado por mim e meu grupo de pesquisa. Esta colaboração foi essencial para o bom andamento do meu projeto e para gerar boa parte do conhecimento aqui documentado.

Ao Tales, amigo de infância, que tive diversos encontros durante a pós-graduação. Ter você próximo durante este período foi muito importante. Obrigado pelas extensas conversas, discussões, risadas e pelo apoio.

Ao Hector, amizade que surgiu pouco antes do início de minha pós-graduação e que foi a cada ano estreitando-se. Hoje sei que você é um amigo que posso contar sempre que precisar. Obrigado pela confiança em mim depositada e sempre enaltecida.

À Universidade São Judas Tadeu, instituição que tenho orgulho e admiração. Universidade onde meu pai teve oportunidade de lecionar por quase 30 anos e que pude, graças a ele, me formar biomédico. Obrigado a todos os professores que me transmitiram aprendizados e conhecimento que carrego comigo até hoje; vocês têm um papel crucial na minha jornada acadêmica.

Ao Colégio Presbiteriano Mackenzie, onde estudei por 14 anos, desde o jardim de infância até o 3º ano do colegial. O Mackenzie tem uma importância muito significativa para mim. Foi nessa instituição, com sua missão, metodologia de ensino e professores dedicados, que fui moldado com princípios éticos e adquiri conhecimentos fundamentais. A aprendizagem proporcionada ao longo dos anos foi essencial para meu bom desempenho durante a graduação. Obrigado, Mackenzie!

À Alyne Simões, que me concedeu a oportunidade de realizar Treinamento Técnico (FAPESP) pela Faculdade de Odontologia da USP por 15 meses. A Professora Alyne foi fundamental para despertar meu interesse e ingresso na pesquisa científica. Durante esse período de treinamento, adquiri muitos aprendizados e cresci tanto científica quanto pessoalmente.

Ao Fernando Godoy, que me introduziu ao curso de biomedicina e me convidou para estagiar em seu laboratório de análises clínicas. Agradeço por ter me apresentado a esse curso pelo qual me apaixonei. Nossa conversa, em que você me incentivou a seguir a biomedicina, foi fundamental para minha formação atual. Muito obrigado.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através dos processos 2019/01700-2 e 2021/01460-1 e teve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

RESUMO

VICARI, H.P. **Investigação do potencial antineoplásico de novos fármacos que modulam a dinâmica de microtúbulos em leucemias agudas.** 2023. 165p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

As leucemias agudas representam um desafio contínuo na prática clínica devido às altas taxas de recidiva e à resistência aos tratamentos quimioterápicos. Os microtúbulos emergem como alvos farmacológicos importantes no tratamento do câncer, incluindo as leucemias, devido à sua função essencial na divisão celular. Nesse contexto, a descoberta e o reposicionamento de fármacos antimicrotúbulos surgem como estratégias promissoras para ampliar o arsenal antineoplásico e superar a resistência terapêutica. A stathmin 1 (STMN1), proteína reguladora da dinâmica dos microtúbulos, desponta como possível alvo terapêutico, dada sua relevância no fenótipo proliferativo leucêmico e sua integração em diversas vias de sinalização associadas às neoplasias hematológicas. O objetivo do presente estudo é investigar o potencial terapêutico de agentes antimicrotúbulos em leucemias agudas, com enfoque na expressão e atividade da proteína stathmin 1 (STMN1) e nos efeitos celulares e moleculares do composto 2 (C2E1), derivado inédito dos ciclopenta[β]indóis sintéticos, e da eribulina, inibidor de microtúbulos proposto para reposicionamento. Dividido em três partes, o estudo primeiramente revelou alta expressão de STMN1 em pacientes com leucemia promielocítica aguda (LPA), com análises de bioinformática associando essa alta expressão a assinaturas gênicas de proliferação e metabolismo em LPA. A inibição de STMN1 por shRNA resultou em redução na clonogenicidade celular, enquanto a estabilização dos microtúbulos com paclitaxel induziu morte celular, inclusive de células resistentes ao tratamento padrão com ácido all-transretinóico (ATRA). Na segunda parte, três compostos sintéticos inéditos da classe dos ciclopenta[β]indóis foram testados em modelos celulares de LPA, e o C2E1 apresentou citotoxicidade seletiva através da interrupção da dinâmica de microtúbulos. A investigação ampliada dos efeitos celulares e moleculares do ciclopenta[β]indol C2E1 sobre o fenótipo leucêmico em amplo painel, molecularmente heterogêneo, de linhagens celulares de leucemias agudas demonstrou sua alta citotoxicidade, redução da clonogenicidade, indução de apoptose e parada do ciclo celular. Por fim, a terceira parte investigou o efeito da eribulina em modelos experimentais de neoplasias hematológicas, demonstrando alta citotoxicidade e eficácia na redução da viabilidade celular pela perturbação da dinâmica de microtúbulos, levando a catástrofe mitótica e morte celular. A expressão e ativação de MDR1 (ABCB1 e ABCC1), PI3K/AKT e NF κ B mostraram-se potenciais biomarcadores de resposta à eribulina e o tratamento combinado de eribulina com elacridar potencializou os efeitos da eribulina e foi capaz de superar a resistência em neoplasias hematológicas. Em conjunto, o trabalho fornece perspectivas sobre o papel da STMN1 e dos agentes inibidores de microtúbulos no tratamento das leucemias agudas, oferecendo evidências pré-clínicas na identificação de potenciais novos agentes terapêuticos e estratégias para superar a resistência a tratamentos convencionais.

Palavras-chave: Leucemias Agudas; Microtúbulos; Stathmin 1; Resistência; Biologia do Câncer.

ABSTRACT

VICARI, H.P. **Investigation of the antineoplastic potential of new drugs that modulate microtubule dynamics in acute leukemias**. 2023. 165p. Thesis (Ph.D. Thesis in Pharmacology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2024.

Acute leukemias represent a continuous challenge in clinical practice due to high rates of relapse and resistance to chemotherapy treatments. Microtubules emerge as important pharmacological targets in cancer treatment, including leukemias, due to their essential role in cell division. In this context, the discovery and repositioning of antimicrotubule drugs arise as promising strategies to expand the anti-neoplastic arsenal and overcome therapeutic resistance. Stathmin 1 (STMN1), a microtubule dynamics regulator protein, stands out as a potential therapeutic target, given its relevance in the leukemic proliferative phenotype and its integration into various signaling pathways associated with hematologic neoplasms. The objective of this study is to investigate the therapeutic potential of antimicrotubule agents in acute leukemias, focusing on the expression and activity of stathmin 1 (STMN1) and the cellular and molecular effects of compound 2 (C2E1), a novel derivative of synthetic cyclopenta[β]indoles, and eribulin, a microtubule inhibitor proposed for repositioning. Divided into three parts, the study initially revealed high expression of STMN1 in patients with acute promyelocytic leukemia (APL), with bioinformatics analyses associating this high expression with proliferation and metabolism gene signatures in APL. Inhibition of STMN1 by shRNA resulted in reduced cellular clonogenicity, while microtubule stabilization with paclitaxel induced cell death, including in cells resistant to standard treatment with all-transretinoic acid (ATRA). In the second part, three novel synthetic compounds of the cyclopenta[β]indole class were tested in cellular models of APL, and C2E1 showed selective cytotoxicity through microtubule dynamics interruption. Expanded investigation of the cellular and molecular effects of cyclopenta[β]indole C2E1 on the leukemic phenotype in a broad, molecularly heterogeneous panel of acute leukemia cell lines demonstrated its high cytotoxicity, reduced clonogenicity, induction of apoptosis, and cell cycle arrest. Finally, the third part investigated the effect of eribulin in experimental models of hematologic neoplasms, demonstrating high cytotoxicity and effectiveness in reducing cell viability by disrupting microtubule dynamics, leading to mitotic catastrophe and cell death. The expression and activation of MDR1 (ABCB1 and ABCC1), PI3K/AKT, and NF κ B were identified as potential biomarkers of response to eribulin, and combined treatment of eribulin with elacridar potentiated eribulin effects and overcame resistance in hematologic neoplasms. Overall, the study provides insights into the role of STMN1 and microtubule inhibitor agents in the treatment of acute leukemias, offering preclinical evidence in the identification of potential new therapeutic agents and strategies to overcome resistance to conventional treatments.

Keywords: Acute Leukemias; Microtubules; Stathmin 1; Resistance; Cancer Biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática do processo da hematopoiese	31
Figura 2. Representação esquemática da origem das leucemias agudas e crônicas	34
Figura 3. Dinâmica de microtúbulos e fármacos que atuam no processo	45
Figura 4. Via de sinalização da Stathmin 1.....	49
Figura 5. STMN1 é altamente expresso em pacientes com leucemia promielocítica aguda.....	66
Figura 6. Genes identificados como diferencialmente expressos entre pacientes com LPA com alta e baixa expressão de STMN1	69
Figura 7. Funções moleculares associadas à expressão diferencial de STMN1.....	70
Figura 8. STMN1 está associada a assinaturas gênicas relacionadas à proliferação e ao metabolismo na leucemia promielocítica aguda	72
Figura 9. STMN1 é altamente expressa em progenitores hematopoiéticos iniciais e reduz durante a diferenciação celular	73
Figura 10. O ATRA induz diferenciação granulocítica e reduz STMN1 em células NB4, mas não em células NB4-R2.....	74
Figura 11. STMN1 é modulada durante a progressão do ciclo celular em linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda.....	75
Figura 12. O silenciamento de STMN1 reduz a viabilidade celular e potencializa os efeitos do ATRA em células NB4.	76
Figura 13. O silenciamento de STMN1 reduz a clonogenicidade das células NB4 e NB4-R2	77
Figura 14. Efeito do silenciamento de STMN1 sobre a apoptose induzida por ATRA nas células NB4 e NB4-R2.....	78
Figura 15. Efeito do silenciamento de STMN1 sobre a diferenciação celular induzida por ATRA nas células NB4 e NB4-R2	79
Figura 16. A inibição de STMN1 potencializa ligeiramente a apoptose induzida por olaparibe em linhagens celulares de LPA	80

Figura 17. O paclitaxel reduz a viabilidade celular de células de leucemia promielocítica aguda.....	81
Figura 18. O paclitaxel potencializa a apoptose induzida por ATRA em células de leucemia promielocítica aguda.....	82
Figura 19. O paclitaxel reduz o crescimento clonal autônomo de células de leucemia promielocítica aguda.....	83
Figura 20. O paclitaxel induz marcadores de dano ao DNA, apoptose e catástrofe mitótica em células NB4 e NB4-R2	84
Figura 21. Caracterização da atividade citotóxica de ciclopenta[β]indóis sintéticos em linhagens celulares de leucemia mieloide aguda	86
Figura 22. Curvas dose-resposta para colchicina após 72 h de exposição em células NB4 e NB4-R2	87
Figura 23. O C2 não afeta a viabilidade celular de leucócitos normais.....	87
Figura 24. O C2 inibe o crescimento clonal autônomo e induz a apoptose em células NB4 e NB4-R2	88
Figura 25. O C2 leva à parada do ciclo celular nas fases S e G ₂ /M em células de leucemia aguda.....	90
Figura 26. O C2 induz forte parada do ciclo celular nas fases G ₂ /M em células de leucemia aguda.....	91
Figura 27. O C2 induz marcadores moleculares de danos no DNA e apoptose em células NB4 e NB4-R2	93
Figura 28. O C2 modula CDKN1A, PMAIP1, GADD45A e XRCC3 em células NB4 e NB4-R2	94
Figura 29. O tratamento com C2 gera mitoses aberrantes e instabilidade de microtúbulos em linhagens celulares de leucemia	96
Figura 30. O tratamento com C2 induz instabilidade dos microtúbulos e falha na mitose completa nas linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda	97
Figura 31. O tratamento com C2 reduz a polimerização dos microtúbulos em linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda.....	98

Figura 32. Docking molecular e principais interações do C2 ao sítio da colchicina da tubulina	98
Figura 33. Estruturas químicas dos enantiômeros C2E1 e C2E2	99
Figura 34. Impacto dos compostos C2E1 e C2E2 na polimerização da tubulina ...	100
Figura 35. Docking molecular da simulação de acoplamento molecular para C2E1 e C2E2.....	100
Figura 36. C2E1 reduz a viabilidade celular de um amplo painel de células neoplásicas hematológicas.....	101
Figura 37. C2E1 reduz a viabilidade celular e exibe atividade citotóxica dependente da concentração e do tempo.....	102
Figura 38. C2E1 induz morte celular em células de leucemia mieloide e linfóide aguda	103
Figura 39. C2E1 desencadeia a parada do ciclo celular nas fases G ₂ /M em células de leucemia aguda.....	104
Figura 40. C2E1 induz mitoses aberrantes em células de leucemia aguda	105
Figura 41. C2E1 reduz o potencial clonogênico e a migração de células leucêmicas	106
Figura 42. C2E1 induz marcadores moleculares de dano ao DNA e apoptose em células de leucemia aguda.....	107
Figura 43. C2E1 modula genes relacionados ao citoesqueleto em células de leucemia aguda.....	108
Figura 44. A resposta ao C2E1 não está associada à resposta a agentes antimicrotúbulos em uso clínico ou a marcadores de resistência em células de neoplasias hematológicas	109
Figura 45. A eribulina reduz a viabilidade celular de linhagens celulares de neoplasias hematológicas.....	111
Figura 46. A eribulina não exibe atividade citotóxica em leucócitos normais	112
Figura 47. A eribulina exibe atividade citotóxica seletiva dependente da concentração e do tempo em células malignas mielóides e linfóides	112

Figura 48. A eribulina desencadeia apoptose em células leucêmicas	114
Figura 49. A eribulina bloqueia o ciclo celular em G ₂ /M em células de leucemia... ..	115
Figura 50. Mitoses aberrantes são observadas após exposição à eribulina em células de leucemia aguda.....	116
Figura 51. A eribulina reduz a clonogenicidade das células leucêmicas mieloides e linfoides.....	117
Figura 52. A eribulina induz marcadores moleculares de danos no DNA e apoptose em células de leucemia aguda	118
Figura 53. Determinação da expressão gênica de ABCB1, ABCC1, TUBB3 e STMN1, e da expressão/ativação das vias PI3K/AKT e NF-κB	120
Figura 54. A resistência à eribulina está associada à alta expressão/ativação de MDR1, NF-κB e AKT em células neoplásicas sanguíneas	121
Figura 55. O inibidor da glicoproteína-P, elacridar, potencializa a apoptose induzida pela eribulina em células Kasumi-1	122
Figura 56. O tratamento combinado de elacridar e eribulina não induz apoptose em leucócitos normais	123
Figura 57. Representação esquemática dos achados do papel da Stathmin 1 em leucemia promielocítica aguda.	126
Figura 58. Representação esquemática dos efeitos do composto 2 sobre os modelos celulares de leucemia mieloide e linfóide aguda.	132
Figura 59. Representação esquemática dos efeitos da eribulina e elacridar sobre os modelos celulares leucêmicos.	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel de linhagens celulares de neoplasias hematológicas e suas alterações genéticas	55
Tabela 2. Sequência e concentração dos iniciadores utilizados no PCR quantitativo	60
Tabela 3. Análise univariada e multivariada para sobrevida livre de doença, sobrevida global e remissão completa de pacientes com LPA de acordo com características clínico-laboratoriais e expressão de <i>Stathmin 1</i>	67
Tabela 4. Comparação das características clínicas e laboratoriais de pacientes com LPA de acordo com a expressão do gene <i>Stathmin 1</i>	68
Tabela 5. Análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA) para grupos de alta <i>versus</i> baixa expressão de <i>STMN1</i> de pacientes com leucemia promielocítica aguda.....	71
Tabela 6. Genes relacionados a danos no DNA modulados pelo Composto 2.	95
Tabela 7. Características das linhagens celulares e sua sensibilidade à eribulina.	111

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Å	Ångström
ACTB	Beta-actina
AKT	<i>Protein Kinase B, activated by phosphoinositide 3-kinase</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRA	Ácido All-Trans Retinóico
AURKA	Aurora quinase A
AURKB	Aurora quinase B
BAX	<i>BCL2 Associated X</i>
BBC3	<i>Bcl-2 binding component 3</i>
BCR::ABL1	<i>Breakpoint Cluster Region - Abelson</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Cd11b	<i>Cluster of Differentiation 11b</i>
CD34	<i>Cluster of Differentiation 34</i>
CD63	<i>Cluster of Differentiation 63</i>
CDKN1A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
CDKN1B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B</i>
cDNA	DNA complementar
CHCK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CLIP2	<i>CAP-Gly Domain Containing Linker Protein 2</i>
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico

CO ₂	Dióxido de carbono
CTTN	<i>Cortactin</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>
CYFIP1	<i>Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 1</i>
CYFIP2	<i>Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 2</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
E2F	<i>Enhancer 2 Factor</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido Etilenoglicol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERCC1	<i>Excision Repair Cross-Complementing 1</i>
ES	<i>Escore Enrichment</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FSCN1	<i>Fascin Actin-Bundling Protein 1</i>
g	grama
GADD45A	<i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible Protein Alpha</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HPRT1	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IC-APL	<i>International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia</i>
IL-3	Interleucina-3
IL-7	Interleucina-7
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IQGAP2	<i>IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 2</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
LIMK1	<i>LIM kinase 1</i>
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MARK2	<i>Microtubule Affinity Regulating Kinase 2</i>
Me ₂ SO ₄	Dimetilsulfato
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSH3	<i>MutS Homolog 3</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
N	Normal
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio
Na ₄ P ₂ O ₇	Pirofosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio

NCK1	<i>NCK Adaptor Protein 1</i>
NES	<i>Normalized Enrichment Score</i>
NF- κ B	<i>Factor Nuclear Kappa B</i>
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
nm	Nanômetros
p-AKT	Fosfo Proteína quinase B
PARP1	Poli (ADP-ribose) polimerase 1
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDTC	Pyrrolidinedithiocarbamate
PE	Phycoerythrin
pH	Potencial hidrogeniônico
PHLDB2	<i>Pleckstrin Homology Like Domain Family B Member 2</i>
PI	Iodeto de Propídeo
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIPES	Piperazina-N, N'-bis(2-etanosulfônico)
PMAIP1	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PML	<i>Promyelocytic Leukemia Protein</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
P-NF- κ B	<i>Phospho-Factor Nuclear Kappa B</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAR α	<i>Retinoic Acid Receptor Alpha</i>
RDX	<i>Radixin</i>

RHOA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNAse A	Ribonuclease A
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i>
RNases	Ribonucleases
RNF168	<i>Ring Finger Protein 168</i>
RNF8	<i>Ring Finger Protein 8</i>
RPA1	<i>Replication Protein A1</i>
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SG	Sobrevida Global
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
SLD	Sobrevida Livre de Doença
STMN1	Stathmin 1
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TUBB3	<i>Tubulin beta 3</i>
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
WAS	<i>Wiskott-Aldrich syndrome</i>

WASF	<i>Wiskott–Aldrich syndrome protein family</i>
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum Group C</i>
XRCC3	<i>X-ray Repair Cross Complementing Protein 3</i>
α -MEM	<i>alpha Minimum Essential Medium</i>
γ -H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	30
1.1. Hematopoiese	30
1.2. Leucemias agudas	34
1.3. Leucemia promielocítica aguda	39
1.4. Microtúbulos como alvo farmacológico para o tratamento do câncer	42
1.5. Stathmin 1	47
2. OBJETIVO	50
2.1. Objetivo geral	50
2.2. Objetivos específicos.....	50
3. METODOLOGIA	51
3.1. Dados de expressão gênica e pacientes	51
3.2. Análise genômica funcional	51
3.3. Silenciamento de STMN1 por shRNA mediado por lentivírus	52
3.4. Análise de diferenciação celular	59
3.5. Sincronização do ciclo celular	59
3.6. Cultura celular	54
3.7. Reagentes químicos	55
3.8. Amostras de doadores saudáveis.....	56
3.9. Ensaio de viabilidade celular	56
3.10. Ensaio de formação de colônias.....	57
3.11. Ensaio de apoptose	57
3.12. Análise do ciclo celular	57
3.13. Análise da morfologia celular	58
3.14. Western Blot.....	58

3.15. PCR quantitativo.....	59
3.16. Microscopia de imunofluorescência.....	61
3.17. Análise intracelular da polimerização de microtúbulos.....	61
3.18. Docking molecular	61
3.19. Ensaio de polimerização da tubulina	62
3.20. Ensaio de migração celular	69
3.21. PCR array.....	69
3.22. Análises estatísticas	64
4. RESULTADOS.....	65
PARTE I	65
4.1. STMN1 é altamente expresso e está associado a assinaturas de genes relacionados à proliferação e metabolismo em LPA.....	65
4.2. STMN1 é regulado negativamente durante a diferenciação granulocítica induzida por ATRA, e sua atividade é modulada durante a progressão do ciclo celular das células de LPA.....	71
4.3. O silenciamento gênico de STMN1 reduz o crescimento clonal autônomo em células de LPA	81
4.4. O agente estabilizador de microtúbulos, paclitaxel, reduz a viabilidade celular e a clonogenicidade em células de LPA	86
PARTE II.....	91
4.5. Ciclopenta[β]indol C2 apresenta citotoxicidade seletiva em células de leucemia promielocítica aguda.....	91
4.6. C2 reduz o crescimento clonal autônomo e promove apoptose e parada do ciclo celular em células NB4 e NB4-R2	94
4.7. C2 reduz a expressão/atividade de STMN1 e induz a apoptose e marcadores de dano ao DNA em células NB4 e NB4-R2.....	98
4.8. C2 causa instabilidade dos microtúbulos e gera aberrações mitóticas em células NB4 e NB4-R2	101
4.9. C2E1 exibe potente atividade de despolimerização de tubulina	105

4.10. C2E1 reduz a viabilidade celular de um amplo painel de linhagens celulares de neoplasias hematológicas.....	107
4.11. C2E1 induz morte celular e causa parada do ciclo celular em células de leucemia aguda	108
4.12. C2E1 reduz a clonogenicidade e a migração celular leucêmica	111
4.13. C2E1 induz marcadores moleculares de dano ao DNA e apoptose em células de leucemia mieloide e linfóide	112
4.14. C2E1 modula genes relacionados à regulação do citoesqueleto em células de leucemia linfoblástica aguda	113
4.15. C2E1 não se correlaciona com biomarcadores de resistência a microtúbulos	114
PARTE III.....	116
4.16. Eribulina reduz a viabilidade celular de linhagens celulares de neoplasias hematológicas.....	116
4.17. Eribulina promove apoptose e parada do ciclo celular e reduz a clonogenicidade em células de leucemia aguda	119
4.18. Eribulina induz marcadores moleculares de dano ao DNA e apoptose em células de leucemia mieloide e linfóide aguda	123
4.19. A glicoproteína-P e as vias mediadas pelo NF-κB estão relacionadas à resistência à eribulina em neoplasias hematológicas.....	125
5. DISCUSSÃO	124
PARTE I	124
PARTE II.....	127
PARTE III.....	133
6. CONCLUSÃO	136
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
ANEXO	156

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hematopoiese

A formação das células sanguíneas ocorre através de um processo hierárquico no qual uma célula tronco pluripotente - denominada célula-tronco hematopoiética (CTH) - dá origem a todas as outras células do sangue através de uma cascata de diferenciação; a esse processo dá-se o nome de hematopoiese (1).

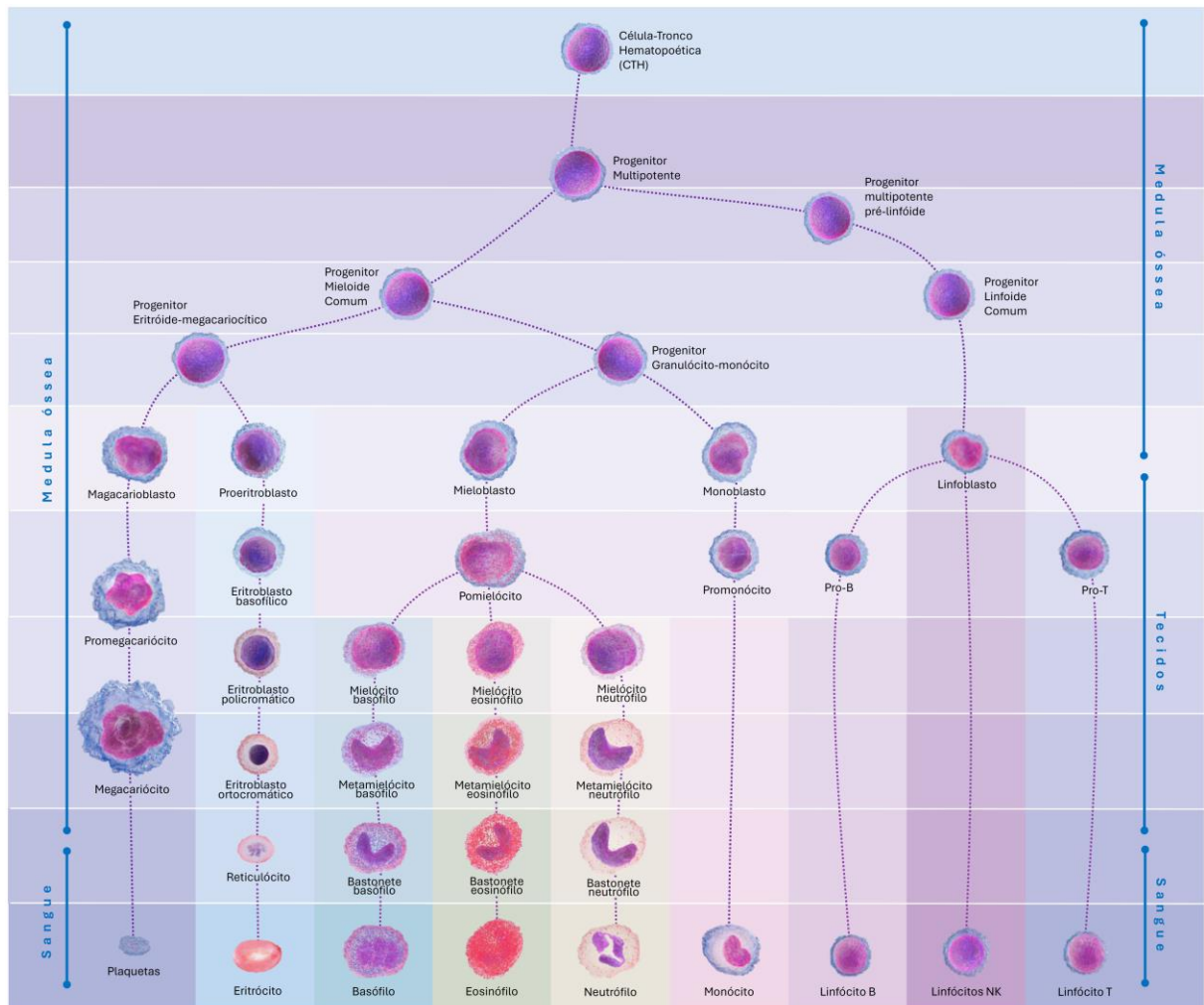
A hematopoiese inicia-se durante a vida embrionária, no desenvolvimento intrauterino, onde nas primeiras semanas de gestação o processo acontece no saco vitelínico. Da sexta semana de vida fetal até aproximadamente o sexto mês, o fígado e o baço, embora temporários, tornam-se os principais órgãos hematopoiéticos e continuam produzindo as células sanguíneas até a segunda semana após o nascimento. A partir do sétimo mês de vida fetal, quando iniciada a calcificação óssea, a medula óssea, localizada no interior dos ossos, torna-se o sítio mais importante na produção das células sanguíneas que durante a infância e vida adulta passa a ser o único local onde ocorre a hematopoiese. No adulto, a medula óssea é confinada ao esqueleto central e às extremidades proximais do fêmur e úmero (1).

A medula óssea humana gera bilhões de células sanguíneas diariamente, partindo de células-tronco, o que faz do sangue um dos tecidos mais regenerativos do corpo humano (2). Para uma hematopoiese ser considerada normal, faz-se necessária a regulação de três principais funções: proliferação celular, diferenciação celular e maturação para células funcionais. As células-tronco hematopoiéticas sustentam a produção de todas as células sanguíneas devido à sua alta capacidade de autorrenovação e proliferação, o que as capacita para diferenciação de suas duas linhagens sanguíneas, sendo elas mieloide e linfoide, possibilitando a reconstituição hematopoiética a partir de uma única célula (3).

No modelo hierárquico da hematopoiese, as CTHs estão no topo da cascata. Estas dão origem a células progenitoras multipotentes (CPM) que possuem um potencial de linhagem completo, mas uma capacidade de autorrenovação limitada. As CPMs dão origem a progenitores oligopotentes: os progenitores mieloides comuns (PMC) e os progenitores multilinfoides (PMLs). As PMCs diferenciam-se em progenitores de granulócitos/macrófagos (PGMs) e progenitores de

megacariócitos/eritrócitos (PEMs) que então dão origem a progenitores de unilinhagem e precursores maduros. As PMLs são capazes de gerar PGMs e progenitores linfoides comuns, que se diferenciam em precursores de células B, T e NK (3, 4). O esquema da hematopoiese está representado na **Figura 1**.

Figura 1. Ilustração esquemática do processo da hematopoiese



O gradiente de cor reflete o potencial de progenitores precoces e intermediários de seguir os destinos de diferentes células. As células-tronco hematopoéticas (CTH) têm o potencial de autorrenovação e diferenciação para qualquer linhagem hematopoética. O Progenitor Multipotente é capaz de originar qualquer linhagem de células sanguíneas. Progenitor Multipotente pré-linfoide é a célula progenitora que diferencia ao longo da linhagem linfóide; com potencial para assumir o destino mieloide. O Progenitor Linfóide Comum é um progenitor precoce comprometido com a linhagem linfóide, que origina precursores de linfócitos T e B, e NK. Os progenitores linfóides deixam a medula óssea para maturação no timo e nos gânglios linfáticos. O Progenitor Mieloide Comum é o progenitor precoce capaz de diferenciar-se em qualquer célula mieloide. O Progenitor Granulócito-Monócito é o progenitor intermediário comprometido com as linhagens monocítica e granulocítica. O Progenitor Megacariocítico-Eritroide é o progenitor intermediário que só pode diferenciar-se em eritrócito ou megacariócito. Imagem do autor. Adaptado de: Ceredig R, Rolink AG and Brown G. (2009): Models of haematopoiesis: Seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol.* 9(4): 293–300 (5) e <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/haematopoiesis/> (6).

Vários fatores de transcrição – fatores que regulam a expressão gênica pelo controle da transcrição de genes específicos ou de famílias de genes – atuam na regulação da hematopoiese como, por exemplo, SCL, GATA2, NOTCH1, que regulam a sobrevivência das células-tronco hematopoiéticas, além de PU.1, família CEBP, GATA1 e FOG1, que regulam a diferenciação ao longo das principais linhagens celulares. Os fatores de transcrição induzem a síntese de proteínas específicas para cada linhagem celular. Mutações, deleções ou translocações de fatores de transcrição são a causa subjacente de muitos casos de neoplasias hematológicas, que são distúrbios que afetam a produção de células sanguíneas, devido a um crescimento descontrolado de células maduras ou precursoras, incluindo leucemias, linfomas e mielomas múltiplos (7).

Além dos fatores de transcrição, diversos fatores de crescimento regulam a viabilidade, proliferação e a diferenciação de diferentes linhagens de células hematopoiéticas. Esses reguladores incluem citocinas, chamadas de fatores estimuladores de colônias (CSFs) e interleucinas (ILs). Existe uma rede de interações de citocinas, que possui reguladores positivos, como CSFs e ILs, e reguladores negativos, como fator de crescimento transformador $\beta 3$ (TGF $\beta 3$) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essa rede multigênica de citocinas, que fornece flexibilidade dependendo de qual parte da rede está ativada e permite a amplificação da resposta a um estímulo específico. Os fatores de crescimento também podem estimular a maturação celular, prevenir apoptose e afetar as funções de células maduras (8).

A hierarquia na hematopoiese permite a produção rápida de células após processos infecciosos ou perda de sangue, além de proteger o sistema hematopoiético da aquisição de mutações, pois a maioria das células se diferenciara terminalmente e morrerá. Entretanto, com o passar do tempo, as CTHs, que se dividem lentamente, podem adquirir mutações que são passadas para a próxima geração de células, promovendo o aumento da autorrenovação das células-tronco, aumento da proliferação e/ou redução da morte celular, expandindo o clone CTH em uma taxa desproporcional em comparação com outros clones, podendo representar um estado permissivo antecedente para o desenvolvimento leucêmico (9-13).

Uma combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos - incluindo fatores associados ao local em que as CTHs residem (nichos), vias de transdução de sinal, fatores de transcrição e modificadores de cromatina - contribui para o equilíbrio

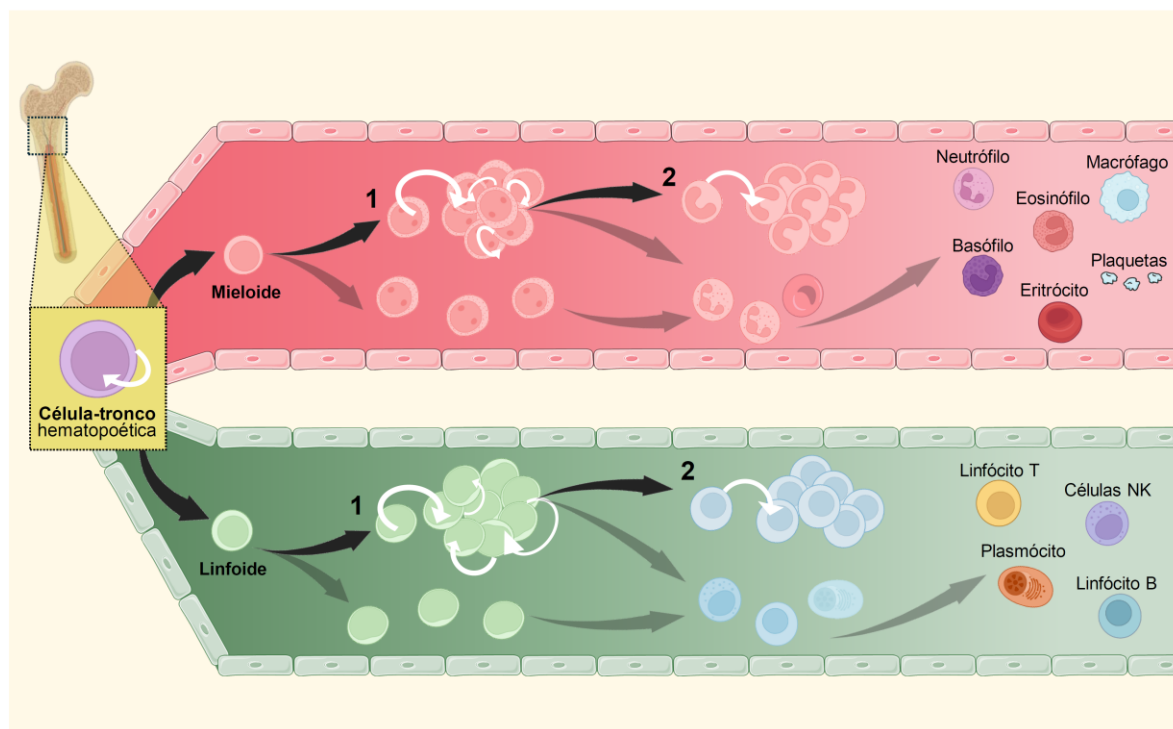
dinâmico entre a autorrenovação e o potencial de diferenciação multipotente de CTHs. A interrupção e a desregulação desses processos têm o potencial de ocasionar distúrbios hematológicos (2, 14).

As neoplasias hematológicas podem surgir durante qualquer estágio do desenvolvimento das células sanguíneas, podendo afetar sua produção e função, com consequências que incluem a incapacidade de combater infecções ou a suscetibilidade a hemorragias. A perturbação da diferenciação hematopoiética normal pode resultar em um dos principais tipos de neoplasia hematológica na clínica: a leucemia. A leucemia é causada por uma produção excessiva de leucócitos anormais na medula óssea, resultando em células leucêmicas circulantes no sangue. Com base na linhagem das células neoplásicas e no curso clínico, a leucemia pode ser categorizada em leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crônica (LCC) e leucemia mieloide crônica (LMC) (15).

1.2. Leucemias agudas

Neoplasias hematológicas são doenças malignas que envolvem proliferação e diferenciação anormais de células sanguíneas maduras ou precursoras na medula óssea e nos tecidos linfoides. Estas condições surgem de alterações moleculares nas células-tronco hematopoéticas (CTHs), resultando em uma hematopoiese anormal (16, 17) (**Figura 2**). Destacam-se, entre essas neoplasias, as leucemias, dada sua complexidade e incidência.

Figura 2. Representação esquemática da origem das leucemias agudas e crônicas



Em cada etapa do processo de diferenciação, a gama de destinos disponíveis para uma célula progenitora diminui. As leucemias podem ocorrer em qualquer estágio deste processo. As células-tronco sanguíneas multipotentes podem gerar células sanguíneas de qualquer tipo, mas não células que não sejam do sangue. Estas células são autorrenováveis (indicadas por setas brancas) e podem originar células da linhagem mieloide ou linfóide. (1) As leucemias agudas ocorrem na fase de blastos, fazendo com que a célula afetada se autorrenove rapidamente. (2) Nas leucemias crônicas, células progenitoras cancerígenas continuam a amadurecer, mas não conseguem se desenvolver em células sanguíneas completamente funcionais. Imagem do autor. Adaptado de: Elert E. Living with leukaemia. *Nature*. 2013;498(7455):S2-3 (18).

No Brasil, a estimativa de novos casos de leucemia para cada ano do triênio de 2023 a 2025 é de 11.540 casos, correspondendo a um risco de 5,33 por 100 mil habitantes. Desse total, 6.250 casos são em homens e 5.290 em mulheres, resultando

em um risco estimado de 5,90 novos casos por 100 mil homens e 4,78 por 100 mil mulheres (19). Mundialmente, em 2020, estimou-se que ocorreram 475 mil casos de leucemia, representando 2,5% de todos os tipos de câncer. Entre os homens, foram 270 mil novos casos, com um risco estimado de 6,30 por 100 mil homens. Entre as mulheres, foram 205 mil casos de leucemia, correspondendo a 4,50 por 100 mil mulheres (20). Em relação à mortalidade, em 2020, ocorreram, no Brasil, 6.738 óbitos por leucemia (3,18 por 100 mil). Nos homens 3.703 óbitos (3,58 por 100 mil) e, nas mulheres, 3.035 óbitos (2,80 por 100 mil) (21).

As leucemias podem ser agudas ou crônicas, com características distintas em termos de desenvolvimento, sintomas e tratamento. As leucemias agudas envolvem um crescimento rápido de células imaturas na medula óssea, resultando em sintomas intensos que requerem tratamento imediato com quimioterapia intensiva, onde o prognóstico varia (22). As leucemias crônicas progridem mais lentamente e podem não apresentar sintomas graves inicialmente. O tratamento geralmente envolve terapias menos agressivas para controlar a doença. O prognóstico também varia, com alguns pacientes vivendo por longos períodos sob tratamento contínuo. No entanto, a transformação para uma fase aguda é uma consideração importante (23).

As leucemias agudas possuem dois principais subtipos, sendo eles a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) que acometem as linhagens mieloides e linfoides, respectivamente.

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica maligna heterogênea causada pelo acúmulo de mutações e alterações moleculares nas células-tronco hematopoiéticas (CTH). Essas mutações impactam os processos normais de crescimento e diferenciação, causando um acúmulo de células mieloides anormais e imaturas na medula óssea e sangue periférico (24-29).

Existem dois sistemas principais para classificar subtipos de LMA: o da Organização Mundial da Saúde (OMS) e o da classificação Franco Americano Britânica (FAB). O sistema FAB define oito subtipos com base em características morfológicas e citoquímicas das células leucêmicas, enquanto o da OMS incorpora características genéticas, morfológicas, imunofenotípicas e clínicas (30, 31). Em 2022, a Classificação de Consenso Internacional (ICC) foi introduzida, ampliando as anormalidades genéticas definidoras de grupos específicos de LMA e introduzindo

novas categorias, como SMD/AML (32, 33). De maneira geral, o diagnóstico da LMA se dá através da presença de $\geq 20\%$ de blastos mieloides na medula óssea ou sangue periférico ou presença de anormalidades genéticas específicas (33, 34).

Apesar de sua etiologia pouco compreendida, vários fatores genotóxicos provocam alterações moleculares na patogênese da LMA, levando à proliferação clonal anormal e falha na diferenciação das células mieloides (27, 35, 36). Essas alterações, incluindo translocações cromossômicas, induzem a formação de proteínas quiméricas e mutações genéticas, promovendo vantagem proliferativa aos clones neoplásicos (37, 38). Mutações que ativam vias proliferativas, como em FLT3, K/NRAS, TP53 e KIT, são observadas em 50% dos casos e implicam em um pior prognóstico. Mutações em NPM1 e CEBP α alteram a diferenciação hematopoiética, traduzem-se em melhor prognóstico e aparecem em 27 e 6% dos casos, respectivamente. Mutações em genes relacionados a regulação epigenética, que apresentam efeitos na diferenciação e proliferação celular, podem ser identificadas em 40% dos casos de LMA, e incluem os genes DNMT3A, TET2, IDH1 e IDH2 (37).

Os principais sintomas da LMA resultam da falta de maturação das células mieloides e, conseqüentemente, da produção prejudicada de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Incluem fadiga, palidez, sangramento e infecções recorrentes (39).

O tratamento padrão para LMA, em uso há mais de 30 anos, consiste em duas fases: indução e consolidação (27, 40, 41). A fase de indução visa a remissão completa (menos de 5% de blastos na medula óssea, e recuperação das contagens celulares sanguíneas) e o desaparecimento dos sintomas (25, 42). O regime de indução mais comum é o “7+3”, que inclui citarabina contínua por 7 dias e antraciclina por 3 (40, 43, 44). Em pacientes idosos, utilizam-se agentes hipometilantes (decitabina ou azacitidina) (45, 46). Após a remissão completa, a terapia de consolidação visa eliminar células leucêmicas residuais e prevenir a recorrência da doença (47). Duas estratégias comuns são usadas: quimioterapia adicional com citarabina, ou transplante de medula óssea (TMO) (27, 48-50). No entanto, pacientes com LMA refratária frequentemente não são elegíveis para TMO e têm uma sobrevida inferior a 10% em 3 anos, representando um desafio no tratamento da doença (25, 51, 52).

Os avanços no entendimento molecular e tratamento da LMA melhoraram o prognóstico dos pacientes mais jovens, mas as taxas de cura nos idosos permanecem

baixas (5 a 15%) (27, 53). Como a maioria dos pacientes diagnosticados tem mais de 65 anos, as opções terapêuticas são limitadas, resultando em uma sobrevida global média de apenas 5 a 10 meses para 70% desses pacientes (25, 54, 55). Portanto, desenvolver novas opções terapêuticas e identificar marcadores moleculares prognósticos e vias de sinalização alvo-seletivas é crucial para o avanço no tratamento da LMA.

Já a leucemia linfoblástica aguda (LLA) trata-se de uma neoplasia cujas células linfoides imaturas invadem a medula óssea, sangue ou órgãos extramedulares devido a proliferação maligna (56). Na LLA, 80% dos casos acometem crianças, mas a doença mostra-se agressiva quando ocorre em adultos (57, 58). Embora a intensificação da quimioterapia tenha melhorado os resultados em crianças, o prognóstico para idosos permanece muito ruim, com apenas 30 a 40% alcançando remissão prolongada (59).

A classificação da LLA teve origem nos critérios FAB, subdividindo-a em três tipos (L1, L2 e L3) de acordo com a morfologia celular (30). Posteriormente, a OMS propôs uma classificação mais ampla em 1997, identificando LLA-B, LLA-T e leucemia de células de Burkitt (60). Em 2008, a leucemia de células de Burkitt foi eliminada, e a LLA-B foi dividida em LLA-B com anomalias genéticas recorrentes e LLA-B não especificada (61). Em 2016, novas entidades foram adicionadas à lista de anomalias genéticas recorrentes (31). Em 2022, tanto a Classificação de Consenso Internacional (ICC) quanto a classificação da OMS foram atualizadas, incorporando dados clínicos, citogenéticos e moleculares recentes (62, 63). Em adultos, a LLA-B representa cerca de 75% dos casos, enquanto a LLA-T compreende os restantes.

A patogênese da LLA envolve a proliferação e diferenciação anormais de células linfoides clonais. Síndromes genéticas podem predispor a alguns casos em crianças (64-67), assim como a exposição à radiação, pesticidas ou certos vírus (Epstein-Barr e HIV) também são fatores predisponentes (68, 69). A maioria dos casos de LLA surge como uma malignidade *de novo* em indivíduos previamente saudáveis. Aberrações cromossômicas são comuns, como translocações t(12;21) [ETV6::RUNX1], t(1;19) [TCF3::PBX1], t(9;22) [BCR::ABL1] e rearranjo de MLL (70). Variantes com perfil de expressão gênica semelhante à LLA Ph-positivo, mas sem rearranjo BCR::ABL1, tendem a apresentar um prognóstico pior (71). Mutações ativadoras de quinase são

observadas em 90% dos casos semelhantes à LLA Ph, envolvendo ABL1, JAK2, PDGFRB, CRLF2, EPOR, IL7R, FLT3 e deleção de SH2B3 (72).

A maioria dos sintomas da LLA reflete o acúmulo de células malignas na medula óssea, sangue e locais extramedulares. As manifestações clínicas incluem febre, perda de peso, suores noturnos, sangramentos, fadiga e infecções. A linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia são comuns, e o envolvimento de locais extramedulares ocorre em 20% dos pacientes (73, 74), e do sistema nervoso central (SNC) ocorre em 5–8% dos casos, manifestando-se como déficits dos nervos cranianos ou meningismo (59).

O diagnóstico é estabelecido pela presença de 20% ou mais de linfoblastos na medula óssea ou no sangue periférico (73). A avaliação da morfologia, imunofenotipagem, e testes citogenéticos são valiosos tanto para confirmar o diagnóstico quanto para estratificar o risco.

A avaliação precisa do prognóstico é crucial no tratamento da LLA. A estratificação de risco considera idade, contagem de leucócitos e alterações citogenéticas. Pacientes com mais de 60 anos têm um prognóstico desfavorável, com apenas 10-15% de sobrevida em longo prazo (75). Apesar da melhora da sobrevida com o uso de inibidores de tirosina quinase (TKIs), a presença do cromossomo Filadélfia, t(9;22), tem implicações significativas no prognóstico e tratamento, com uma sobrevida média em 1 ano de cerca de 10% (76). A LLA Ph-positiva está associada a uma resposta deficiente à quimioterapia, alta doença residual mínima, e baixa sobrevivência (72, 77, 78).

Embora a sobrevida a longo prazo na LLA pediátrica seja alta ($\approx 90\%$), em adultos é modesta. O tratamento inclui quimioterapia de indução, consolidação e manutenção, com profilaxia do sistema nervoso central durante a terapia. A indução visa atingir a remissão completa, combinando de medicamentos que incluem vincristina, corticosteroides, e antraciclina (79-81). Após a indução, alguns pacientes podem passar para TMO, enquanto outros continuam com intensificação e manutenção (82). A maioria (85-90%) dos pacientes entra em remissão após indução, porém, alguns são refratários e muitos recaem. Opções de tratamento para casos recidivantes/refratários incluem quimioterapia aumentada, agentes reformulados e novos anticorpos monoclonais.

1.3. Leucemia promielocítica aguda

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo de leucemia mieloide aguda (LMA) caracterizada pela infiltração da medula óssea por blastos leucêmicos semelhantes à promielócitos e corresponde - segundo a classificação FAB - aos subtipos M3 e M3 variante (M3v) de leucemia mieloide aguda (30), e ao subtipo de LMA associada à translocação entre os cromossomos 15 e 17 [t(15;17)] e variantes segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde das Neoplasias Mieloides (31, 83).

A LPA corresponde a 10%-15% das LMAs e apresenta morfologia celular característica, com promielócitos anormais com núcleo excêntrico e granulações profusas no citoplasma, além da presença de múltiplos bastonetes de Auer no citoplasma, formando feixes, o que dá a estas células a denominação de "*Faggot cells*" (células com maços ou feixes) (30). As células da LPA têm um padrão distinto de marcadores de superfície quando comparado a outras LMAs. Ocorre alta expressão de antígenos mielomonocíticos (CD13, CD15 e CD33) e ausência de expressão de antígenos monocíticos (CD14, incluindo My4, Leu M3 e Mo2) e HLA-DR (83-85).

Em cerca de 90% dos casos, a LPA está associada à translocação t(15;17)(q22;q21), que resulta na fusão dos genes PML (*promyelocytic leukemia*) e RAR α (receptor alfa do ácido retinóico) e cria o oncogene híbrido PML::RAR α (86). De forma menos comum, o RAR α encontra-se raramente fundido aos genes PLZF (*promyelocytic leukemia zincfinger*), NPM (*nucleophosmin*), NuMA (*nuclear mitotic apparatus*) ou STAT5b (*signal transducer and activator of transcription 5b*) situados nos cromossomos 11q23, 5q32, 11q13 e 17q11, respectivamente (87).

Os pacientes com LPA apresentam um quadro clínico e alterações laboratoriais compatíveis com coagulação intravascular disseminada (CIVD) e podem evoluir rapidamente ao óbito, devido a fenômenos hemorrágicos (88, 89). Na maioria dos casos, os pacientes apresentam sintomas relacionados à anemia, trombocitopenia, organomegalia e distúrbios da coagulação (88, 90). A primeira manifestação clínica em LPA é a leucopenia e na variante da LPA é a leucocitose. Outras características menos frequentes são observadas em 15 a 20% dos pacientes com infiltração no sistema nervoso central e na pele são achados raros (88, 89).

O curso clínico da LPA tem sido modificado, nas últimas décadas, de uma leucemia aguda rapidamente fatal para um dos mais curáveis subtipos de LMA (88, 91). Este imenso progresso no prognóstico da doença foi atribuído fundamentalmente aos avanços notáveis em seu tratamento, mais especificamente com a introdução de novos agentes terapêuticos que atuam diretamente na lesão molecular, como o ácido all-trans retinóico (ATRA), um derivado da vitamina A, e o trióxido de arsênio (ATO), passando a ser considerado o primeiro exemplo de sucesso de terapia alvo molecular baseado na indução da diferenciação e apoptose (92-95). Estudos têm demonstrado que a oncoproteína de fusão PML::RAR α é alvo direto do ATRA; diferentes concentrações farmacológicas desse medicamento induzem diferenciação do promielócito leucêmico e o destina à morte celular programada. Esta oncoproteína também é alvo do trióxido de arsênio, e pesquisas indicam que a região rica em cisteína na porção PML da oncoproteína é a principal candidata para interagir com o ATO. A ação desse composto nas células leucêmicas é dose dependente, onde, em baixas concentrações, ocorre à indução da diferenciação parcial dessas células e, em altas concentrações, ocorre à indução de apoptose. O ATRA, em combinação com o ATO, atua de forma sinérgica, o que representa uma explicação plausível para os bons resultados observados na prática clínica (92-96).

O tratamento com ATRA induz a diferenciação mieloide terminal das células leucêmicas e, associado a agente antracíclicos, resulta em taxas de remissão completa superiores a 90% e de sobrevida livre de doença estimada em três anos superiores a 80% (91, 97, 98). Estes resultados contrastam com aqueles observados antes da introdução do ATRA no tratamento da LPA, que indicavam sobrevida livre de doença inferiores a 20% em três anos (98). Apesar da boa resposta clínica associada ao tratamento com ATRA, este não é isento de complicações, pois cerca de 6% a 27% dos pacientes desenvolvem a síndrome do ácido retinóico (SAR) (99-101), caracterizada por febre de origem indeterminada, ganho de peso, edema generalizado, insuficiência respiratória aguda, derrame pleural e/ou pericárdico, hipotensão arterial, insuficiência renal e infiltração de diferentes órgãos por células mieloides, um achado invariável (99-101).

Os sintomas da SAR aparecem nos primeiros dias de tratamento com ATRA e, geralmente, estão associados ao aumento repentino do número de leucócitos no sangue periférico (99). Apesar da etiologia desta síndrome não ser completamente

compreendida, alguns dos mecanismos pelos quais o ATRA induz a SAR são: (i) alterações na expressão de moléculas de adesão nos blastos leucêmicos e nas células endoteliais, (ii) aumento da permeabilidade capilar, (iii) formação de agregados leucocitários, e (iv) ativação leucocitária induzida por diferentes citocinas (102-105). Ainda que possa ocorrer resposta ao tratamento com dexametasona, a mortalidade associada a SAR é alta (5% -18%) (100, 101).

A resistência e a recaída ao ATRA ainda são problemas clinicamente relevantes na LPA (106-108), e vários mecanismos têm sido propostos para explicar a resistência ao ATRA em pacientes LPA que expressam o PML::RAR α . Dentre as principais causas que levam à resistência ao tratamento estão: (i) mutações genéticas no domínio de ligação ao ligante da proteína PML::RAR α , (ii) fusões menos comum do gene RAR α com outros genes que não o PML limitando a eficácia terapêutica do ATRA e arsênico; (iii) aumento do catabolismo de ATRA; (iv) presença da proteína de ligação citoplasmática do ácido retinóico (CRABP), e (v) passagem anormal de ATRA para o núcleo celular (109-112).

Apenas mutações no domínio RAR α em PML::RAR α foram recorrentes como um mecanismo resistente ao ATRA, tanto de observações clínicas quanto de análises moleculares *in vitro* (109-112). A recaída ainda ocorre em cerca de 20 a 30% dos pacientes e a resistência clínica ao ATRA está frequentemente presente, o que representa um desafio no tratamento desses pacientes. Sendo assim, vale destacar que o desenvolvimento de estratégias eficazes para lidar com a resistência ao ATRA é uma área ativa de pesquisa na busca por melhorias nos resultados clínicos para pacientes com leucemia promielocítica aguda.

1.4. Microtúbulos como alvo farmacológico para o tratamento do câncer

Componentes-chave do citoesqueleto, os microtúbulos são essenciais para vários aspectos da função celular, incluindo o desenvolvimento e a manutenção da morfologia celular, e o transporte intracelular de vesículas, proteínas e organelas. Além disso, os microtúbulos também desempenham papel importante na sinalização, migração e divisão celular (113-115).

Os microtúbulos são estruturas tubulares compostas por polímeros de heterodímeros de α e β -tubulina, formados a partir da associação de 13 protofilamentos. Esses polímeros são altamente dinâmicos, regulados de forma espacial e temporal e, em resposta às mudanças das necessidades celulares, alternam constantemente entre as fases de crescimento e encolhimento. Embora os microtúbulos tenham propriedades dinâmicas intrínsecas devido à hidrólise de GTP no sítio de troca na β -tubulina, a dinâmica dos microtúbulos é adicionalmente facilitada por uma ampla gama de fatores celulares, incluindo proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) e à tubulina solúvel, modificações pós-traducionais da tubulina e expressão de diferentes isoformas de tubulina (116-119).

Existem muitas MAPs diferentes, incluindo as proteínas motoras dineína e cinesina, bem como muitas proteínas reguladoras de microtúbulos, como stathmin 1, survivina, TOG, MCAK, entre outras (120-123).

A dinâmica de microtúbulos no fuso celular é necessária para todos os estágios da mitose, incluindo a correta ligação dos cromossomos em seus cinetócoros durante a prometáfase, após a quebra do envelope nuclear. Além disso, é necessária para o alinhamento dos cromossomos ao equador do fuso, denominado de placa metafásica. Por último, a dinâmica de microtúbulos é necessária para a separação sincronizada dos cromossomos em anáfase e telófase após o ponto de verificação de metáfase-anáfase estar completo. A presença de um único cromossomo que seja incapaz de se fixar ao fuso é suficiente para evitar a transição para a anáfase; a célula então permanece bloqueada numa fase semelhante a prometáfase/metáfase e, eventualmente, sofre apoptose (124, 125).

Sendo assim, devido suas propriedades contráteis essenciais no processo de divisão celular, os microtúbulos são considerados um dos alvos moleculares mais importantes para o tratamento do câncer, cujas células possuem alto potencial

proliferativo. A supressão da dinâmica de microtúbulos por agentes que interferem nesse processo é um mecanismo comum pelo qual esses agentes bloqueiam a mitose e causam a morte das células tumorais, variando quanto à forma de modulação e quanto aos sítios de ligação às unidades de tubulina (126, 127).

O princípio de ação dos agentes antineoplásicos, que atuam através da interação com microtúbulos, baseia-se, de forma geral, no deslocamento do equilíbrio dinâmico entre as taxas de polimerização e despolimerização dos microtúbulos no interior das células, de forma que a célula não consiga executar corretamente as principais etapas de sua divisão celular e, por isso, esses agentes são denominados de antimitóticos (126, 127). Em relação ao mecanismo de ação, esses fármacos podem ser classificados como estabilizadores ou desestabilizadores de microtúbulos (128).

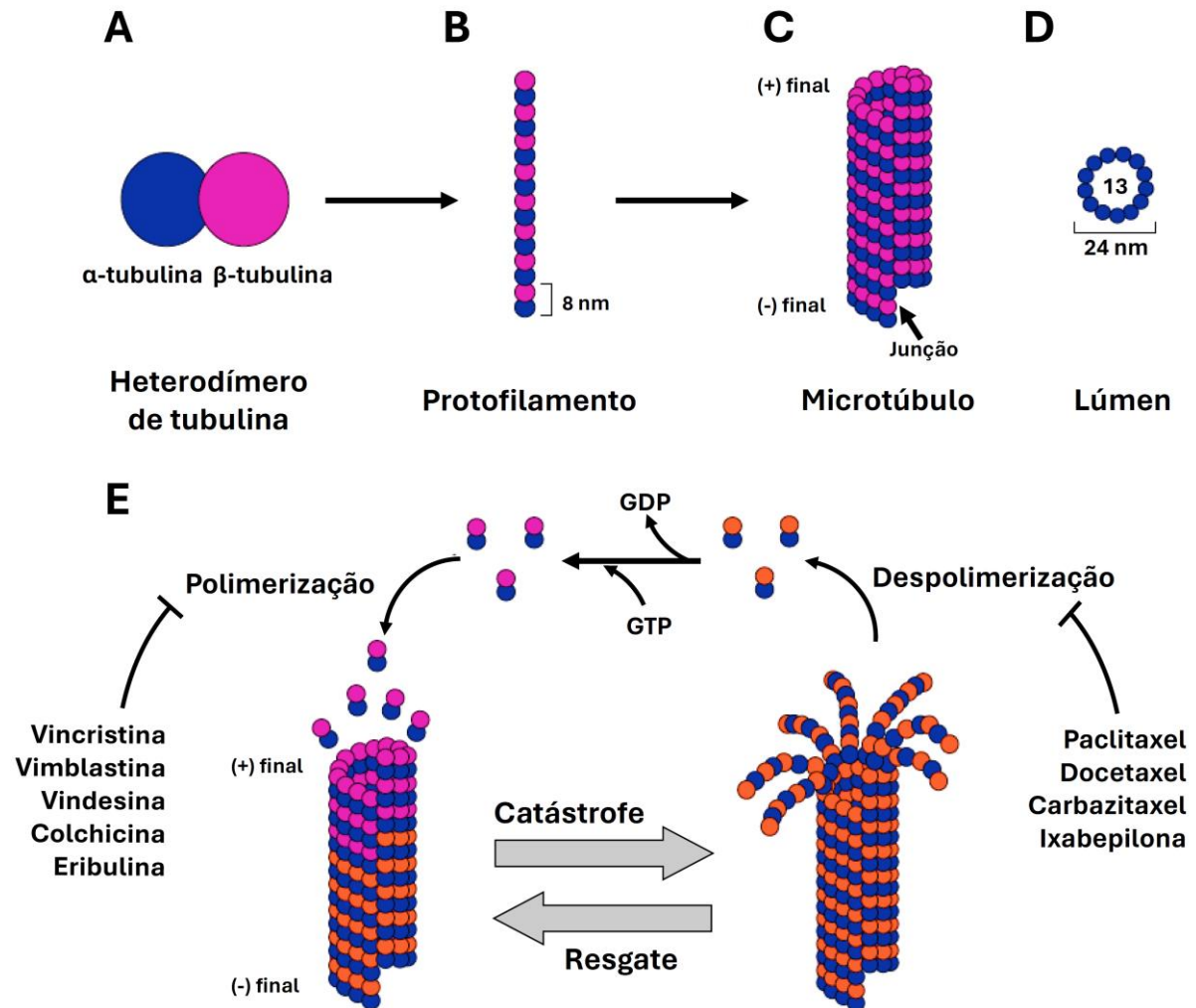
Os estabilizadores de microtúbulos funcionam ligando-se às subunidades de tubulina nos microtúbulos já formados. Eles promovem a estabilização dos microtúbulos, evitando a sua despolimerização e, assim, impedindo a dinâmica normal necessária para a função celular e divisão mitótica. Como consequência, os estabilizadores de microtúbulos impedem as células de desfazer as fibras do fuso logo após a separação dos cromossomos durante a mitose, impossibilitando as células-filhas de procederem para a etapa final de divisão celular, promovendo apoptose (126, 127). Os principais agentes estabilizadores de microtúbulos são os taxanos (paclitaxel e docetaxel), usados no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo mama, ovário, pulmão e próstata (129).

Os desestabilizadores de microtúbulos, por sua vez, evitam a formação de microtúbulos, impedindo a célula de formar as fibras do fuso mitótico, necessárias para a separação dos cromossomos duplicados nas etapas finais da mitose. Consequentemente, as células com todo o seu material duplicado são impossibilitadas de prosseguirem seu metabolismo de forma funcional; esse mecanismo de bloqueio da divisão celular interrompe o ciclo celular e acarreta um processo de apoptose (130, 131). Os principais representantes dos desestabilizadores de microtúbulos são os alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina) e colchicina. A vimblastina é utilizada no tratamento do linfoma de Hodgkin, bem como no câncer de testículo e mama (132). A Vincristina possui relevância no contexto das malignidades hematológicas e é amplamente utilizada no tratamento de

leucemia linfoblástica aguda (LLA) (133), sendo um dos poucos medicamentos aprovados para LLA-T recidivante (134). Para leucemia mieloide aguda (LMA), vários inibidores da tubulina estão em ensaios clínicos (135). A colchicina, embora seja um inibidor de microtúbulos altamente potente, não é amplamente empregada no tratamento do câncer devido à sua alta toxicidade (131). No entanto, seu sítio de ligação à tubulina permanece sob constante investigação como um promissor alvo farmacológico na terapêutica de certos tipos de câncer (136, 137).

Recentemente a eribulina tem se destacado no tratamento do câncer de mama metastático resistente ao paclitaxel e sarcomas de tecidos moles (138, 139). A eribulina é um quimioterápico antimitótico que inibe a dinâmica dos microtúbulos ao se ligar irreversivelmente às extremidades positivas, bloqueando a polimerização sem afetar a despolimerização, ao contrário de outros inibidores como taxanos e alcaloides da vinca (140-142). Além disso, ela se liga à tubulina solúvel, formando agregados não produtivos que alteram a morfologia do fuso e interrompem sua formação, causando bloqueio da prometáfase e, conseqüentemente, desencadeando apoptose devido à longa permanência da célula na fase G₂/M (143).

Figura 3. Dinâmica de microtúbulos e fármacos que atuam no processo



Os microtúbulos são estruturas poliméricas com polaridade intrínseca. O diagrama esquemático representa (A) heterodímeros de alfa e beta tubulina, (B) heterodímeros de tubulina montados cabeça com cauda para formar um protofilamento, (C) arranjo lateral de 13 protofilamentos para formar um microtúbulo cilíndrico oco com uma junção, (D) lúmen do microtúbulo e (E) montagem e desmontagem de dímeros de tubulina com uma troca espontânea entre eventos de catástrofe e resgate. Os alcalóides da vinca (vincristina, vimblastina, vindesina), colchicina e eribulina inibem a polimerização dos microtúbulos (desestabilizadores de microtúbulos). Os taxanos (paclitaxel, docetaxel e carbazitaxel) e ixabepilona inibem a despolimerização dos microtúbulos (estabilizadores de microtúbulos). Adaptado de Current Drug Targets, 2023, Vol. 24, No. 11 895 (144).

As diferenças na modulação da dinâmica de microtúbulos parecem especificar até que ponto e como a proliferação de uma célula tumoral será inibida. A instabilidade dinâmica causada por fármacos antimitóticos reduz a tensão do fuso e retarda ou impede a progressão da metáfase para a anáfase (125, 145). Importante para a eficácia desses fármacos na quimioterapia do câncer, as células com mitose bloqueada ou retardada sofrem apoptose (125) ou podem sair da mitose, muitas vezes

de forma aberrante (146). Portanto, a dinâmica rápida dos microtúbulos do fuso é crucial para o seu funcionamento, e garante o movimento cromossômico adequado e preciso, o que torna a mitose tão primorosamente sensível ao paclitaxel, vimblastina e outros fármacos antimitóticos (124, 125, 147-149).

Apesar do considerável número de agentes moduladores de microtúbulos disponíveis, mecanismos que limitam a eficácia dos tratamentos atuais, como a superexpressão de isoformas específicas de tubulina, mutações, superexpressão de transportadores de efluxo da droga e outros mecanismos de resistência ainda não elucidados, reforçam a necessidade da busca de novos agentes moleculares mais seletivos que atuem contra células resistentes aos atuais tratamentos do câncer (150-152).

O desenvolvimento de diversos estudos experimentais que utilizam os microtúbulos como alvo principal, têm resultado na descoberta de novos compostos com propriedades antitumorais, contribuindo para a elucidação dos processos moleculares relacionados ao câncer e aumentando a gama de novos compostos potenciais para o tratamento do câncer (153-156).

1.5. Stathmin 1

Stathmin 1 é uma fosfoproteína citoplasmática de 18 kDa também conhecida como Oncoprotein 18 (OP18), Leukemia-associated phosphoprotein p18 (LAP18) ou Metablastin. Todos os membros da família de proteínas stathmin possuem um domínio stathmin-like contendo até quatro sítios de fosforilação em serina (resíduos 16, 25, 38 e 68) na região N-terminal e um domínio de ligação à tubulina (157, 158). A função principal de stathmin 1 baseia-se na ação desestabilizadora de microtúbulos, o que permite a promoção da desmontagem dos mesmos (denominado de catástrofe) ou o sequestro de heterodímeros de alfa/beta tubulina impedindo sua formação (120, 159, 160). Dois sítios de fosforilação em stathmin 1 possuem efeitos inibitórios, serina 16 e 63. Uma vez fosforilados, esses sítios reduzem a afinidade de stathmin 1 pelos heterodímeros de alfa/beta tubulina, representando um importante mecanismo da sua regulação (161).

A regulação precisa da dinâmica dos microtúbulos é necessária para o sucesso da progressão do ciclo celular durante a mitose, e múltiplas vias de sinalização participam deste processo, sendo que algumas delas tem como alvo os sítios de fosforilação em serina de stathmin 1 (por exemplo, MAPK, PI3K e CDKs). Além disso, a ativação da via JAK2/STAT3 resulta na inibição de stathmin 1 e maior estabilidade dos microtúbulos (162-165). Desta forma, a desregulação das funções de stathmin 1 impactam na segregação correta dos cromossomos, clonogenicidade, motilidade celular e sobrevivência de células normais e neoplásicas (161).

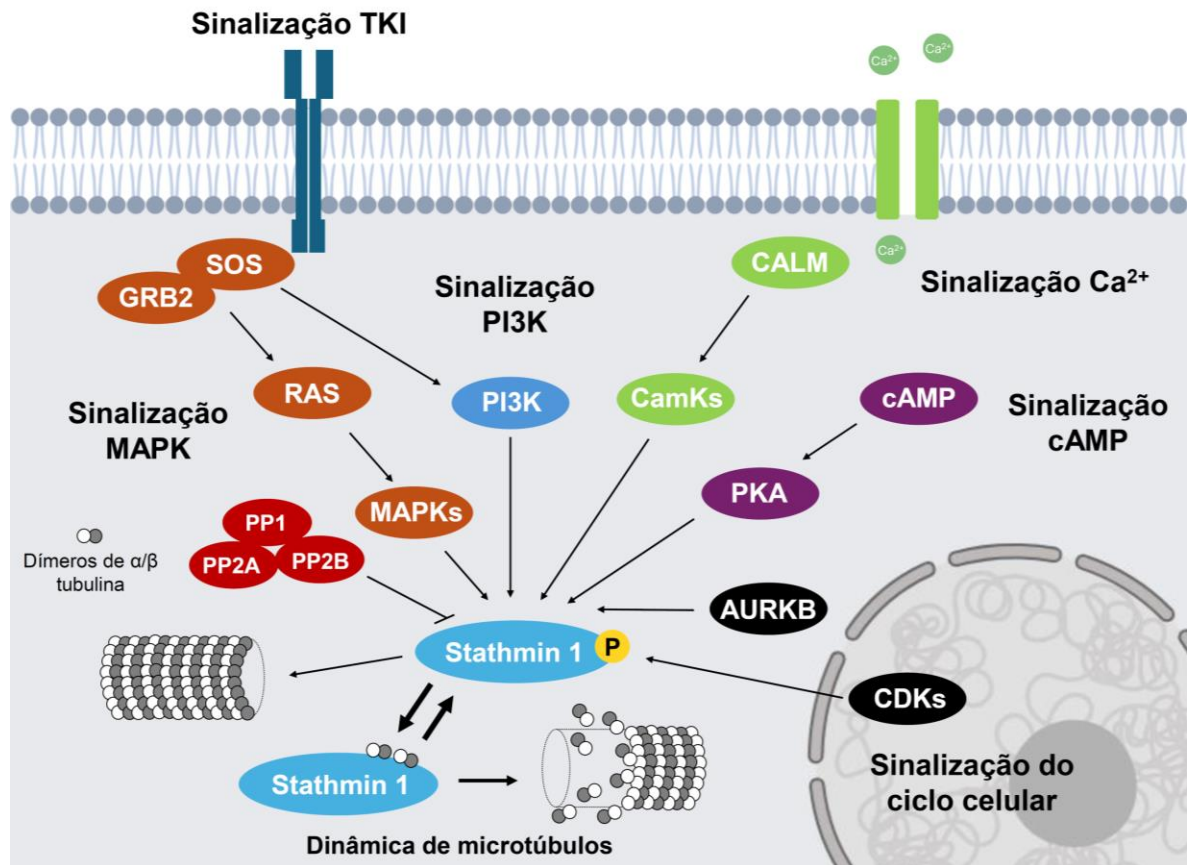
Na hematopoiese normal, a expressão de stathmin 1 reduz durante a diferenciação celular de progenitores hematopoiéticos, juntamente com a redução da capacidade de proliferação desses progenitores. A expressão ectópica de stathmin 1 reduz a capacidade de diferenciação terminal e favorece a proliferação de progenitores hematopoiéticos, o que já foi demonstrado durante a diferenciação megacariocítica (166, 167) e eritrocítica (168). Camundongos nocaute para stathmin 1 apresentam dois fenótipos que se assemelham a desordens hematológicas humanas, sendo anemia megaloblástica e trombocitose, o que está de acordo com os achados anteriores em relação à função de stathmin 1 na megacariocitopoese e eritropoese (167-169).

Em relação às neoplasias hematológicas, stathmin 1 é altamente expressa em células hematopoiéticas de pacientes com leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, síndrome mielodisplásica com excesso de blastos e mielofribose primária (170-172). A exacerbação da atividade de stathmin 1 pode reduzir a precisão da segregação cromossômica e provocar instabilidade cromossômica (173); um achado comum em neoplasias hematológicas e geralmente associado a um mau prognóstico (27). Além da expressão diferencial, stathmin 1 parece desempenhar um papel ativo no fenótipo leucêmico, uma vez que a inibição específica desta proteína reduz a proliferação e a clonogenicidade de células neoplásicas (170, 171, 174, 175).

No contexto da LPA, um estudo anterior evidenciou que os níveis aumentados de stathmin 1 são observados em células que expressam o oncogene PML::RAR α e que a indução da expressão de PML::RAR α induz o aumento dos níveis transcricionais, assim como a atividade de stathmin 1. No entanto, o valor prognóstico, bem como, a contribuição de stathmin 1 para o desenvolvimento, progressão e resposta terapêutica na LPA permanecem pouco explorados (176).

Outra observação relevante é o fato de que as neoplasias hematológicas são heterogêneas e caracterizadas pela regulação de múltiplas vias de sinalização, o que dificulta o desenvolvimento de uma terapia eficiente. Nesse sentido, é importante ressaltar que a proteína stathmin 1 integra diversas vias de sinalização (**Figura 4**), muitas das quais estão alteradas em células hematopoiéticas neoplásicas. Estudos recentes demonstraram que a inibição de stathmin 1 em células leucêmicas obtém sucesso na redução do fenótipo proliferativo. Portanto, estratégias que visam a stathmin 1 como alvo terapêutico em neoplasias hematopoiéticas representam um campo interessante de investigação (168).

Figura 4. Via de sinalização da Stathmin 1



Cyclin-dependent kinases (CDKs), mitogen activated protein kinases (MAPKs), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), aurora kinase B (AURKB), protein kinase A (PKA) e Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases (CamKs) fosforilam stathmin 1 em sítios de serina e modulam sua associação com heterodímeros de alfa/beta tubulina. Protein phosphatase 2A (PP2A), protein phosphatase 2B (PP2B) e phosphoprotein phosphatase 1 (PP1) defosforilam stathmin 1. A alternância no estado de fosforilação e defosforilação de stathmin 1 contribui para a regulação da dinâmica dos microtúbulos. Abreviações: RTK, receptor de tirosinoquinase; P, fosforilação; Ac, acetilação. Imagem do autor. Adaptado de: Machado-Neto JÁ & Traina F. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, p. 126-136, 2015 (177).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel dos microtúbulos como alvo farmacológico nas leucemias, com ênfase na compreensão dos mecanismos de ação de diferentes agentes terapêuticos. Pretende-se explorar a relação entre a proteína stathmin 1 (STMN1) e a dinâmica dos microtúbulos, buscando inibir sua expressão como uma estratégia terapêutica para leucemia promielocítica aguda (LPA) e avaliar o potencial terapêutico do paclitaxel, um inibidor de microtúbulos, em células de LPA. Além disso, objetiva-se descobrir novos compostos com atividade antineoplásica, sendo o composto derivado dos ciclopenta[β]indóis (C2), um dos candidatos testados, tanto em modelos celulares de LPA quanto de leucemias agudas. Adicionalmente, busca-se avaliar a eribulina como uma opção de reposicionamento de fármaco, investigando sua eficácia em modelos celulares leucêmicos. Ainda, visa-se avaliar estratégias de tratamento combinado para superar a resistência a medicamentos, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no manejo das leucemias.

2.2. Objetivos específicos

Parte I) Avaliar a expressão de STMN1 e suas associações com características basais e dados clínicos e genômicos em pacientes com LPA. Também avaliar a dinâmica da expressão de STMN1 durante a diferenciação de células mieloides e a progressão do ciclo celular. Além disso, investigar os efeitos do silenciamento de STMN1 e do agente estabilizador de microtúbulos, paclitaxel, em linhagens celulares LPA.

Parte II) Caracterizar a atividade antileucêmica de uma nova série de três ciclopenta[β]indóis sintéticos em modelos celulares de LPA sensíveis e resistentes ao ATRA. Após isso, expandir a investigação dos efeitos celulares e moleculares do ciclopenta[β]indol C2 no fenótipo de leucemia de um amplo painel molecularmente heterogêneo de linhagens celulares de leucemia aguda.

Parte III) Verificar os efeitos antineoplásicos da eribulina em um painel molecularmente heterogêneo de células malignas do sangue, desvendar mecanismos moleculares antineoplásicos subjacentes e avaliar possíveis biomarcadores de resposta à eribulina.

3. METODOLOGIA

3.1. Dados de expressão gênica e pacientes

Os dados de expressão de RNAm de *STMN1* (mediana das sondas 200783_s_at e 217714_x_at) de amostras obtidas de doadores saudáveis (amostras CD34+ [n = 5] e células totais de medula óssea [n = 5]) e pacientes com LPA (n = 34) foram derivados do portal de dados de acesso público “Amazonia! Database 2008” (<http://amazonia.transcriptome.eu>) (178). Os valores de expressão gênica foram obtidos a partir de experimentos de microarray de cDNA usando o sistema Affymetrix HUG133 Plus 2.0 Array, e os dados foram cruzados usando números de identificação específicos do tumor.

Amostras de medula óssea de 121 pacientes com LPA *de novo* inscritos no estudo IC-APL no momento do diagnóstico e 22 doadores saudáveis foram incluídos no estudo. O diagnóstico foi confirmado com análise citogenética para t(15;17)(q22;q21) e/ou reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para rearranjos PML::RAR α em amostras de medula óssea. Os pacientes foram classificados de acordo com os critérios de risco do Programa para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatias Malignas (PETHEMA)/Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) (179). As características dos pacientes são mostradas na **Tabela 4**. Detalhes do protocolo de tratamento do estudo IC-APL foram publicados anteriormente (91). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CONEP; Registro nº 12.920; Processo número: 13496/2005; CAAE: 155.0.004.000–05). O consentimento informado foi obtido de todos os pacientes e aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa.

3.2. Análise genômica funcional

Todas as transcrições dos dados de RNA-seq publicados por Lin et al. (180) (GSE172057) foram pré-classificados de acordo com sua expressão diferencial, comparando amostras com alta e baixa expressão de *STMN1*. A análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA) foi realizada com GSEA v.4.0 (181)

usando os conjuntos de genes Hallmark, que são gerenciados por MSigDB. Os escores de enriquecimento (ES) foram calculados com base na estatística Kolmogorov-Smirnov, testados quanto à significância usando 1000 permutações e normalizados (NES) para determinar o tamanho de cada conjunto de genes. Uma taxa de falsa descoberta (FDR) de 25% (valor de $q < 0,25$) e um valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A expressão gênica quantificada normalizada foi usada para classificação usando o pacote limma-voom no Galaxy ([//usegalaxy.org/](http://usegalaxy.org/)) comparando grupos de baixa e alta expressão de *STMN1*. Os gráficos de vulcão foram construídos para identificar genes diferencialmente expressos entre grupos com baixa e alta expressão de *STMN1*, correlacionando o valor de p ajustado ($-\log_{10}$) com a mudança $\log_2$ na expressão. Essa análise foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Um mapa de calor foi construído usando ClusterVis ([//biit.cs.ut.ee/clustvis/](http://biit.cs.ut.ee/clustvis/)), representando os 25 principais genes regulados positivamente e 25 regulados negativamente entre amostras de baixa e alta expressão de *STMN1*. Genes diferencialmente expressos obtidos da ferramenta Galaxy com uma alteração de 1,5 e $p < 0,05$ foram usados para análise de Gene Ontology ([//www.geneontology.org/](http://www.geneontology.org/)), e as 10 principais funções moleculares reguladas positivamente e reguladas negativamente foram ilustradas. Cytoscape versão 3.8.2 (182) e o plugin BiNGO (183) foram usados para avaliar a super-representação de categorias de Gene Ontology em funções moleculares e construção de redes.

3.3. Silenciamento de STMN1 por shRNA mediado por lentivírus

Células NB4 e NB4-R2 foram transduzidas com shRNA mediado por lentivírus, utilizando tanto um controle inespecífico (sc-108080) quanto um direcionado ao gene *STMN1* (composto por três construções específicas do alvo; sc-36127-V), adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). As células transduzidas foram denominadas shControl e shSTMN1, respectivamente. Para a transdução, aproximadamente 1×10^5 células foram expostas ao lentivírus por espinoculação a uma multiplicidade de infecção igual a 2 e posteriormente selecionadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina.

3.4. Análise de diferenciação celular

Os dados de expressão de RNAm do gene *STMN1* (sonda 200783_s_at) em diferentes populações de células hematopoiéticas foram obtidos do conjunto de dados GSE24759 utilizando a plataforma GEO2R ([//www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r)).

Células NB4 e NB4-R2 (sujeitas ou não ao silenciamento da *STMN1*) foram expostas ao ácido all-trans-retinóico (ATRA) (1 μ M) por 72 horas. Em seguida, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelada, ressuspensas em 100 μ L de PBS contendo 5 μ L de anti-CD11b marcado com PE (clone MEM-174, EXBIO Praha, as., República Tcheca) e incubadas à temperatura ambiente em área protegida da luz por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS gelado e ressuspensas em 300 μ L de PBS. Todas as amostras foram obtidas por citometria de fluxo (FACSCalibur; Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) e analisadas utilizando o software FlowJo (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, EUA).

3.5. Sincronização do ciclo celular

O ciclo celular das células NB4 e NB4-R2 foi sincronizado utilizando o método de bloqueio duplo de timidina. Em resumo, as células foram incubadas em RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo 2 mM de timidina por 16 horas (primeiro bloqueio). Após a remoção da timidina por lavagem com PBS, as células foram transferidas para meio fresco contendo RPMI com 10% de SFB para liberação para progressão do ciclo celular durante 8 horas. Em seguida, as células foram submetidas a um segundo bloqueio incubando-as em RPMI com 10% de SFB e 2 mM de timidina por mais 16 horas. Para liberar as células para a progressão do ciclo celular, a timidina foi removida por lavagem com PBS e RPMI com 10% de SFB com veículo ou composto 2 (3,2 μ M) que foi adicionado conforme necessário. As células sincronizadas, tratadas ou não, foram coletadas nos momentos designados para extração de proteínas e análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Para essa análise, as células foram colhidas e fixadas com etanol a 70% e marcadas com 20 μ g/mL de iodeto de propídio (PI) contendo 10 μ g/mL de RNase A por 30 minutos à temperatura ambiente, em uma área protegida da luz. A distribuição do conteúdo de

DNA foi adquirida em um citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson) e analisada utilizando o software FlowJo (Treestar, Inc.).

3.6. Cultura celular

Foram utilizadas 25 linhagens de neoplasias hematológicas que incluem leucemias, linfomas e mielomas, sendo 13 linhagens mieloides e 12 linfoides. O tipo de neoplasia e mutações de cada linhagem estão descritas na **Tabela 1**. As linhagens celulares foram testadas e autenticadas por análise de correspondência de repetição curta em tandem (STR) usando o sistema PowerPlex 16 HS (Promega, Madison, WI, EUA) e o sistema detector de sequência ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, EUA). As células foram cultivadas em meio apropriado (RPMI-1640, IMDM ou α -MEM) suplementado com 10 ou 20% de soro fetal bovino (SFB) de acordo com as recomendações da American Type Culture Collection (ATCC) ou Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), mais 1% de penicilina/estreptomicina e mantidas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C. Todas as linhagens celulares estavam isentas de micoplasma. As linhagens celulares foram gentilmente cedidas por professores e pesquisadores colaboradores, sendo elas OCI-AML3, Kasumi-1, HL-60, THP-1, MOLM-13, MV4-11, NB4, NB4-R2 (Prof. Eduardo Magalhães Rego da Universidade de São Paulo), U-937, K-562, KU812, HEL, Jurkat, Namalwa, Daudi, Raji, U266, MM.1S, MM.1R (Profa. Sara Teresinha Olalla Saad da Universidade Estadual de Campinas), CEM, NALM6, REH (Dr. Gilberto Carlos Franchi Junior da Universidade Estadual de Campinas), SET-2 (Prof. Fabíola Attié de Castro da Universidade de São Paulo), Karpas 442 (Prof. Martin Dreyling do Hospital Universitário Grosshadern/LMU) e SUP-B15 (Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular).

Tabela 1. Painel de linhagens celulares de neoplasias hematológicas e suas alterações genéticas

Linhagem celular	Modelo de doença	Alteração genética
OCI-AML3	LMA	DNMT3A ^{R882C}
Kasumi-1	LMA	KIT ^{Asp816} , RUNX1::RUNX1T1
HL-60	LMA	MYC
THP-1	LMA	NRAS ^{G12S} , CSNK2A1::DDX39B
MOLM-13	LMA	FLT3-ITD
MV4-11	LMA	FLT3-ITD
U-937	LMA	PICALM::MLLT10
NB4	LPA	PML::RARA
NB4-R2	LPA	PML::RARA ^{MUT}
K-562	LMC	BCR::ABL1
KU812	LMC	BCR::ABL1
SET2	NMP	JAK2 ^{V617F}
HEL	NMP	JAK2 ^{V617F}
Jurkat	LLA-T	PTEN
CEM	LLA-T	KRAS ^{G12D} , NKX2.5::BCL11B
Namalwa	LLA-B	IGH::MYC
NALM6	LLA-B	ETV6::EBF1
Daudi	LLA-B	IGH::MYC
Raji	LLA-B	IGH::MYC
SUP-B15	LLA-B	BCR::ABL1
REH	LLA (não T/B)	ETV6::RUNX1, RUNX1::PRDM7
U266	MM	BRA ^{FK601N}
MM1.S	MM	TRAF ^{3del} , KRAS ^{G12A}
MM1.R	MM	TRAF3del
Karpas 422	Linfoma	T(14;18) IGH::BCL2

3.7. Reagentes químicos

O ácido all-trans retinóico (ATRA), paclitaxel, mesilato de eribulina, colchicina e PDTC foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O olaparibe (AZD2281) foi obtido da Selleck Chemicals (Houston, TX, EUA). O elacridar foi obtido da Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EUA). As soluções-estoque dos reagentes foram preparadas em dimetilsulfóxido (Me₂SO₄; DMSO) a concentrações de 10 a 50mM. Os compostos ciclopenta[β]indólicos C1, C2 (enântiômeros E1 e E2) e C3 foram obtidos

conforme síntese descrita anteriormente (184, 185). É digno de nota que todos os compostos são enantiômeros que apresentam > 95% de pureza e estereoquímica absoluta (R, R) para os dois centros quirais. As estruturas moleculares dos ciclopenta[β]indóis C1, C2 e C3 utilizados estão ilustradas na **Figura 21** bem como C2E1 e C2E2 na **Figura 34**.

3.8. Amostras de doadores saudáveis

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas de oito doadores saudáveis por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CAAE: 39510920.1.0000.5467). O consentimento informado foi obtido de todos os doadores e todos os métodos foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinque. As CMSPs foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 30% de SFB, penicilina/estreptomicina e citocinas recombinantes (30 ng/mL de IL-3, 100 ng/mL de IL-7, 100 ng/mL de ligante FLT3 e 30 ng/mL SCF, PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA) a uma densidade de 2×10^6 células/mL.

3.9. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de metiltiazoltetrazólio (MTT). Foram semeadas 2×10^4 células por poço em uma placa de 96 poços contendo meio de cultura adequado, juntamente com o veículo ou os compostos de interesse. As células foram então incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24, 48 e 72 horas. As concentrações graduadas exatas utilizadas de cada composto estão especificadas nas legendas dos resultados. De forma geral, para o paclitaxel, as concentrações variaram de 0.625 a 10 nM, para eribulina de 0.032 a 100 nM ou 0.062 a 2 nM, para C1, C2 (E1 e E2) e C3 variaram de 0.8 a 50 μ M, para vincristina de 0.02 a 100 nM e para colchicina de 0 a 1000 nM, e para o ATRA foi de 1 μ M. Olaparibe (12,5 e 50 μ M), elacridar (1 e 2 μ M) e PDTC (10 e 20 μ M) foram utilizados como inibidores de PARP, glicoproteína P e NF κ B, respectivamente. Após a incubação, 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e as células foram re-incubadas por 4 horas. A reação com MTT foi então interrompida utilizando 100 μ L de solução de HCl 0.1N em isopropanol anidro. A viabilidade celular foi determinada por

espectrofotometria, medindo a absorbância a 570 nm. Os valores de IC₅₀ foram calculados por meio de análise de regressão não linear utilizando o GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

3.10. Ensaio de formação de colônias

O ensaio de formação de colônias foi utilizado para determinar a clonogenicidade celular e foi conduzido em meio de metilcelulose semissólido ($0,5 \times 10^3$ células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá). As células foram inoculadas em placas de 12 poços na presença do veículo ou do composto de interesse e mantidas por 8 dias. As colônias foram identificadas mediante a adição de 100 µL (5 mg/mL) do reagente MTT e quantificadas utilizando o software de análise Image J (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). As concentrações aplicadas em cada condição experimental estão detalhadas nas legendas das figuras nos resultados deste trabalho.

3.11. Ensaio de apoptose

Um total de 1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24 poços na presença do veículo ou composto de interesse em concentrações crescentes por 48 ou 72 horas. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1 µg / mL de iodeto de propídio (PI) e 1 µg / mL de anexina V marcada com APC (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Todas as amostras foram adquiridas por citometria de fluxo (FACSCalibur; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente em área protegida da luz e foram analisadas usando o software FlowJo (Treestar, Inc., San Carlos, CA, EUA). As concentrações utilizadas para cada condição estão descritas nas legendas das figuras dos resultados presentes neste trabalho.

3.12. Análise do ciclo celular

Um total de 4×10^5 células foram semeadas por poço em placas de 6 poços na presença do veículo ou composto de interesse em concentrações crescentes, colhidas após 48 ou 72 horas, fixadas com etanol a 70% e armazenadas a 4 °C por

pelo menos 2 horas antes da análise. As células fixadas foram marcadas com 20 µg/mL de iodeto de propídio (PI) contendo 10 µg/mL de RNase A por 30 minutos em temperatura ambiente em uma área protegida da luz. A distribuição do conteúdo de DNA foi adquirida em citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson) e analisada usando o software FlowJo (Treestar, Inc.). As concentrações utilizadas para cada condição estão descritas nas legendas das figuras dos resultados presentes neste trabalho.

3.13. Análise da morfologia celular

Um total de 1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24 poços na presença do veículo ou do composto de interesse, durante 48 ou 72 horas.

As concentrações utilizadas foram as seguintes: 1µM de ATRA em células NB4 e NB4-R2; 0.25nM, 0.5nM e 1nM de eribulina em células NB4, NB4-R2, MOLM13, OCI-AML3, Jurkat e Namalwa; 1.6µM de C2 em células NB4 e NB4-R2; e 3.2µM, 6.4µM e 12.5µM de C2E1 em células Kasumi-1, MV4-11, Jurkat e Namalwa. Para a análise morfológica, as células tratadas foram aderidas a lâminas microscópicas utilizando cytospin (Serocito, Modelo 2400, FANEM, Guarulhos, Brasil) para posterior coloração de Rosenfeld. As análises morfológicas do núcleo e citoplasma das células tratadas foram visualizadas em microscópio óptico Leica DM 2500, e as imagens foram adquiridas no software LAS V4.6 (Leica, Bensheim, Alemanha).

3.14. Western blot

Para análise de expressão proteica por western blot, as células foram tratadas com veículo ou com composto de interesse por 48 ou 72 horas e submetidos à extração de proteína total usando um tampão contendo Tris 100 mM (pH 7,6), Triton X-100 a 1%, 150 mM NaCl, PMSF 2 mM, Na_3VO_4 10 mM, NaF 100 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM e EDTA 4 mM. Quantidades iguais de proteína (30 µg) das amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE em um aparelho de eletroforese, seguida de eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite a 5%, incubadas com anticorpos primários específicos diluídos em tampão de bloqueio e, em seguida, incubadas com anticorpos secundários conjugados com HRP (peroxidase de rábano). A análise de Western blot com os anticorpos indicados foi realizada utilizando o

sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e o sistema de documentação de gel G: BOX Chemi XX6 (Syngene, Cambridge, UK United). Os anticorpos contra Stathmin 1 (OP18; sc-55531) e p-Stathmin 1^{S16} (p-OP18 Ser16; sc-12948-R) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) e os anticorpos contra PARP1 (#9542), γ H2AX (#9718), α -tubulina (#2144), GAPDH (#5174), p-CHK2^{T68} (#2197), CHK2 (#6334), acetil- α -tubulina^{K40} (#5335S) e caspase 3 (#9665S) foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). As intensidades das bandas foram quantificadas utilizando o software UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific; Orem, UT, EUA). Para eribulina, os dados foram ilustrados usando o software multiple experiment viewer (MeV) 4.9.0 (186). Os compostos utilizados no tratamento das células e suas concentrações específicas estão detalhadamente descritos nos resultados deste trabalho.

3.15. PCR quantitativo

Após o tratamento das células com compostos de interesse, o RNA total foi obtido utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific). A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando um sistema de PCR em tempo real QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) em conjunto com um sistema SybrGreen e primers específicos (**Tabela 2**). *HPRT1* e *ACTB* foram utilizados como genes de referência. O valor de quantificação relativa foi calculado usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (187). Um controle negativo 'No Template Control' foi incluído para cada par de primers. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada corrida para verificar se havia amplificação inespecífica. Os dados foram ilustrados usando o software multiple experiment viewer (MeV) 4.9.0 (<http://www.tm4.org/mev/>). As células, juntamente com os compostos e concentrações utilizados estão descritos detalhadamente nas legendas das figuras dos resultados desta tese.

Tabela 2. Sequência e concentração dos iniciadores utilizados no PCR quantitativo

Gene	Sequência	Concentração
<i>STMN1</i>	FW: AGCCCTCGGTCAAAAGAATC RV: TTCAAGACCTCAGCTTCATGGG	300 nM
<i>XRCC3</i>	FW: GGTGGTATTCTGGTAGGGAT RV: GGTGGATATTTACGCCTGT	300 nM
<i>CDKN1B</i>	FW: ACTCTGAGGACACGCATTTGGT RV: TCTGTTCTGTTGGCTCTTTTGTT	300 nM
<i>RPA1</i>	FW: CCAGCCTCACTCCTTACCAG RV: TTCACCACTTTCGTCAACCA	300 nM
<i>MSH3</i>	FW: GATGGCATTTCACAAGGATGGG RV: CTGGCGGATAATGGGTGACAAAC	300 nM
<i>XPC</i>	FW: CATGAGGACACACACAAGGT RV: CAGGTTTGAGAGGTAGTAGG	300 nM
<i>PCNA</i>	FW: CAGAGCTCTTCCCTTACGCA RV: GTCCTTGAGTGCCTCCAACA	300 nM
<i>RNF168</i>	FW: GGCGAGTTTATGCTGTCCCT RV: GCCGCCACCTTGCTTATTTTC	300 nM
<i>ERCC1</i>	FW: TTGTCCAGGTGGATGTGAAA RV: GCTGGTTTCTGCTCATAGGC	300 nM
<i>BAX</i>	FW: GAGCTGCAGAGGATGATTGC RV: CAGCTGCCACTCGGAAAA	300 nM
<i>BBC3</i>	FW: GACCTCAACGCACAGTACGAG RV: AGGAGTCCCATGATGAGATTGT	300 nM
<i>RNF8</i>	FW: AACAGGATCTGCCATTGGTC RV: CCAAGAACCCACACTCCTA	300 nM
<i>GADD45A</i>	FW: AAGGATGGATAAGGTGGGG RV: CTGGATCAGGGTGAAGTGG	300 nM
<i>PMAIP1</i>	FW: CGCGCAAGAACGCTCAACC RV: CACACTCGACTTCCAGCTCTGCT	300 nM
<i>CDKN1A</i>	FW: TGTCCTGTCTTGTACCCTTGT RV: GCCGGCGTTTGGAGTGGTAG	300 nM
<i>HPRT1</i>	FW: GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA RV: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	150 nM
<i>ACTB</i>	FW: AGGCCAACC GCGAGAAG RV: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	150 nM

3.16. Microscopia de imunofluorescência

As células NB4 e NB4-R2, sincronizadas com timidina e tratadas com veículo ou composto 2 (C2), foram fixadas em lâminas revestidas com poli-L-lisina (1 mg/mL) 6 horas após a liberação da timidina, utilizando formaldeído a 3,7%. Posteriormente, foram permeabilizadas com Triton a 0,5% em solução de PBS e bloqueadas com PBS contendo albumina de soro bovino (BSA) a 3%. As células foram então incubadas com o conjugado anti- α -tubulina Alexa Fluor® 488 (1:200 em PBS 3% BSA, Thermo Fisher Scientific) durante 12 horas, seguido por lavagem com PBS. As lâminas foram montadas utilizando meio de montagem ProLong Gold Anti-Fade com DAPI (Thermo Fisher Scientific). As imagens foram adquiridas utilizando microscopia de fluorescência (LionHeart FX, BioTek, Winooski, VT, EUA).

3.17. Análise intracelular da polimerização de microtúbulos

Os níveis intracelulares de polimerização de microtúbulos foram avaliados conforme descrito anteriormente (188), com pequenas modificações. Em resumo, um número igual de células NB4 e NB4-R2 (1×10^6) tratadas com veículo, composto 2 (1,6 μ M) ou paclitaxel (5 nM) por 48 horas foram lisadas em tampão de lise estabilizador de microtúbulos [0,1 M de PIPES (pH 6,9), 2 M de glicerol, 5 mM de $MgCl_2$, 2 mM de EGTA, 0,5% de Triton X-100, 4 μ M de Taxol e 5 μ g/ml de leupeptina] e submetidas à centrifugação a 20.000 $\times$ g por 45 minutos a 22°C. Os sobrenadantes contendo tubulina solúvel (fração solúvel (S)) foram separados dos sedimentos contendo a tubulina polimerizada (fração polimerizada (P)). Em seguida, os precipitados foram solubilizados no tampão estabilizador de microtúbulos e submetidos a ondas ultrassônicas por 20 minutos. As frações S e P foram submetidas à análise de Western blot para detecção de α -tubulina. A expressão de GAPDH, apresentada apenas na fração S, foi utilizada como controle do fracionamento.

3.18. Docking molecular

Para análise de docking dos compostos C1, C2 e C3 foram utilizados o software GOLD 5.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK), modelo cristalográfico de tubulina/colchicina (PDB 1SA0) e a estrutura dos compostos 1 (C1), 2 (C2) e 3 (C3).

Simulações de redocking e docking molecular foram conduzidas para colchicina, C2E1 e C2E2, respectivamente, utilizando as cadeias A e B da tubulina como receptor (PDB: 4O2B) (189). As coordenadas da colchicina foram obtidas a partir da estrutura do complexo tubulina-colchicina (entrada PDB 4O2B). As moléculas C2E1 e C2E2 foram desenhadas usando o software ChemDraw e suas estruturas químicas foram otimizadas usando o recurso de minimização de energia em Avogadro (190) e as torções do ligante foram definidas usando Autodock Tools (191). A padronização dos estados de protonação do receptor foi realizada utilizando a adição automática de hidrogênios no servidor online Protoss da Protein plus (192). Simulações de redocking e docking foram realizadas utilizando os softwares Autodock Vina (193) e Gold (194). A análise das estruturas e do modo de ligação foram realizadas pelo PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão, 2.0, Schrödinger, LCC). O redocking foi realizado utilizando a estrutura de colchicina extraída de 4O2B, e as melhores poses foram comparadas com o modo de ligação experimental do complexo tubulina-colchicina. Definimos como melhor pose aquela com menor RMSD entre a molécula experimental e acoplada, que foi inferior a 2,0Å. Para calcular o RMSD entre a molécula experimental e reencaixada, usamos Coot (195). Uma vez definida a melhor pose, utilizamos esses parâmetros para realizar o docking de C2E1 e C2E2 no receptor (tubulina). Nas simulações realizadas utilizando GOLD, os parâmetros de acoplamento definidos foram estabelecidos como uma esfera com raio de 6Å a partir do centro do sítio de ligação da colchicina. Além disso, a função de pontuação utilizada foi a CHEMPLP e a eficiência da busca foi fixada em até 100%. Para as simulações de atracação realizadas utilizando o Autodock Vina, foi necessária uma atribuição de carga adicional, obtida pelas cargas de Gasteiger-Marsili (196). Os parâmetros finais de acoplamento do Autodock Vina foram a construção de uma caixa de grade com dimensões de 15Å (x), 15Å (y), 15Å (z) e coordenadas de 17,00 (x), 66,50 (y) e 43,00 (z).

3.19. Ensaio de polimerização da tubulina

Um ensaio baseado em fluorescência (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, EUA) foi utilizado para avaliar o impacto do composto 2 (enantiômeros 1 (C2E1) e 2 (C2E2)) na polimerização da tubulina. Solução de tubulina rica em proteínas associada a microtúbulos (2 mg/mL, suíno, Cytoskeleton, Inc) foi preparada em um tampão

contendo 80 mM de piperazina-N,N'-bis[ácido 2-etanossulfônico] (PIPES) a pH 6,9, 2 mM de cloreto de magnésio, 0,5 mM de etilenoglicol-bis(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA), 1 mM de trifosfato de guanosina (GTP) e 10% de glicerol, e distribuída em cada poço de uma placa de 96 poços (OptiPlate F-1536-Black; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EUA). Para cada ensaio, 100 µL da solução de tubulina foram incubados com 10 µL de C2E1 e C2E2 (concentração final de 10 e 50 µM) a uma concentração de 10 vezes e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução final com a concentração desejada de DMSO a 1%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com paclitaxel 10 µM e colchicina como controle negativo e positivo para despolimerização da tubulina, respectivamente. A taxa de polimerização foi monitorada a 37°C, utilizando um comprimento de onda de excitação de 360 nm, medindo a emissão de fluorescência a 440 nm durante 60 minutos, com um fluorômetro de placa Victor 3 e software Wallac 1420 Multilabel Plate Counter (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EUA).

3.20. Ensaio de migração celular

Os ensaios de migração foram conduzidos utilizando placas transwell com poros de tamanho de 8 µm (Costar, Corning, NY, EUA), as quais foram lavadas duas vezes com PBS e bloqueadas por 1 hora a 37°C com meio RPMI contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA). A câmara inferior foi preenchida com 600 µL de RPMI contendo 0,5% de BSA e a quimiocina CXCL12 (100 ng/mL; Peprotech), juntamente com o veículo ou C2E1 (12,5 µM). Em seguida, células Kasumi-1 e Namalwa (5×10^5 em 100 µL de RPMI contendo 0,5% de BSA com veículo ou C2E1 [12,5 µM]) foram adicionadas à câmara superior e permitidas a migrar por 16 horas. O número de células migradas foi determinado por contagem e expresso como a porcentagem de células tratadas com o veículo.

3.21. PCR array

O RNA total foi extraído de células Namalwa submetidas a tratamento com veículo ou C2E1 por 48 horas, utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific) em três experimentos independentes. Em seguida, 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA, utilizando o kit RT² First Strand (Qiagen Sciences Inc., Germantown, MD, EUA). A análise foi conduzida utilizando um kit de matriz PCR de reguladores de

citoesqueleto humano RT² Profiler (#PAHS-088ZC; Qiagen Sciences Inc.), de acordo com as diretrizes do fabricante, e os dados foram obtidos utilizando o sistema de PCR em tempo real QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific). Os níveis de RNAm foram normalizados para aqueles nas células tratadas com veículo, e todos os genes foram incorporados no mapa de calor gerado utilizando o software Multiple Experiment Viewer (MeV) 4.9.0. Além disso, redes representando os genes modulados foram construídas utilizando o banco de dados GeneMANIA ([//genemania.org/](http://genemania.org/)), destacando interações e processos biológicos primários.

3.22. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), STATA versão 14.1 (Stata Corporation, College Station, TX, EUA) e IBM SPSS Statistics versão 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). O teste exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado foram utilizados para comparar variáveis categóricas, e o teste U de Mann-Whitney, teste *t* de Student ou ANOVA com teste *post hoc* de Bonferroni foi utilizado para comparar variáveis contínuas. As características basais dos pacientes com LPA foram relatadas descritivamente. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a expressão mediana do *STMN1*. A sobrevida global (SG) foi definida como o tempo desde o início da terapia de indução até a morte por qualquer causa. Os pacientes vivos ou perdidos no acompanhamento foram censurados na última data conhecida de vida. A sobrevida livre de doença (SLD) foi definida como a diferença entre a data da remissão hematológica completa e a recidiva ou a data do último acompanhamento (o que ocorrer primeiro). Os pacientes que estavam vivos sem recidiva da doença ou malignidade secundária foram censurados quando foram vistos vivos pela última vez e livres da doença. O teste log-rank foi utilizado para comparações das curvas de Kaplan-Meier. Análises de regressão de riscos proporcionais univariadas e multivariadas foram realizadas para potenciais fatores prognósticos de SG e SLD. Os fatores incluídos na análise de regressão multivariada foram idade ao diagnóstico, sexo, contagem de leucócitos, contagem de plaquetas e expressão de *STMN1*. A suposição de riscos proporcionais para cada variável de interesse foi testada. A suposição de linearidade para todas as variáveis contínuas foi avaliada usando estimativas de spline cúbica restrita da relação entre uma variável contínua e o log do

risco relativo de perigo. Todos os valores de p foram bilaterais e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad InStat 8 (GraphPad Software, Inc., San. Diego, CA, EUA.). Os testes ANOVA ou t de Student foram utilizados para realizar comparações entre grupos, seguidos de pós-teste de Bonferroni para ajustar os níveis de significância nas múltiplas comparações. O teste de Spearman foi utilizado para análise de correlação entre variáveis. Todos os valores de p foram bilaterais cujo valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

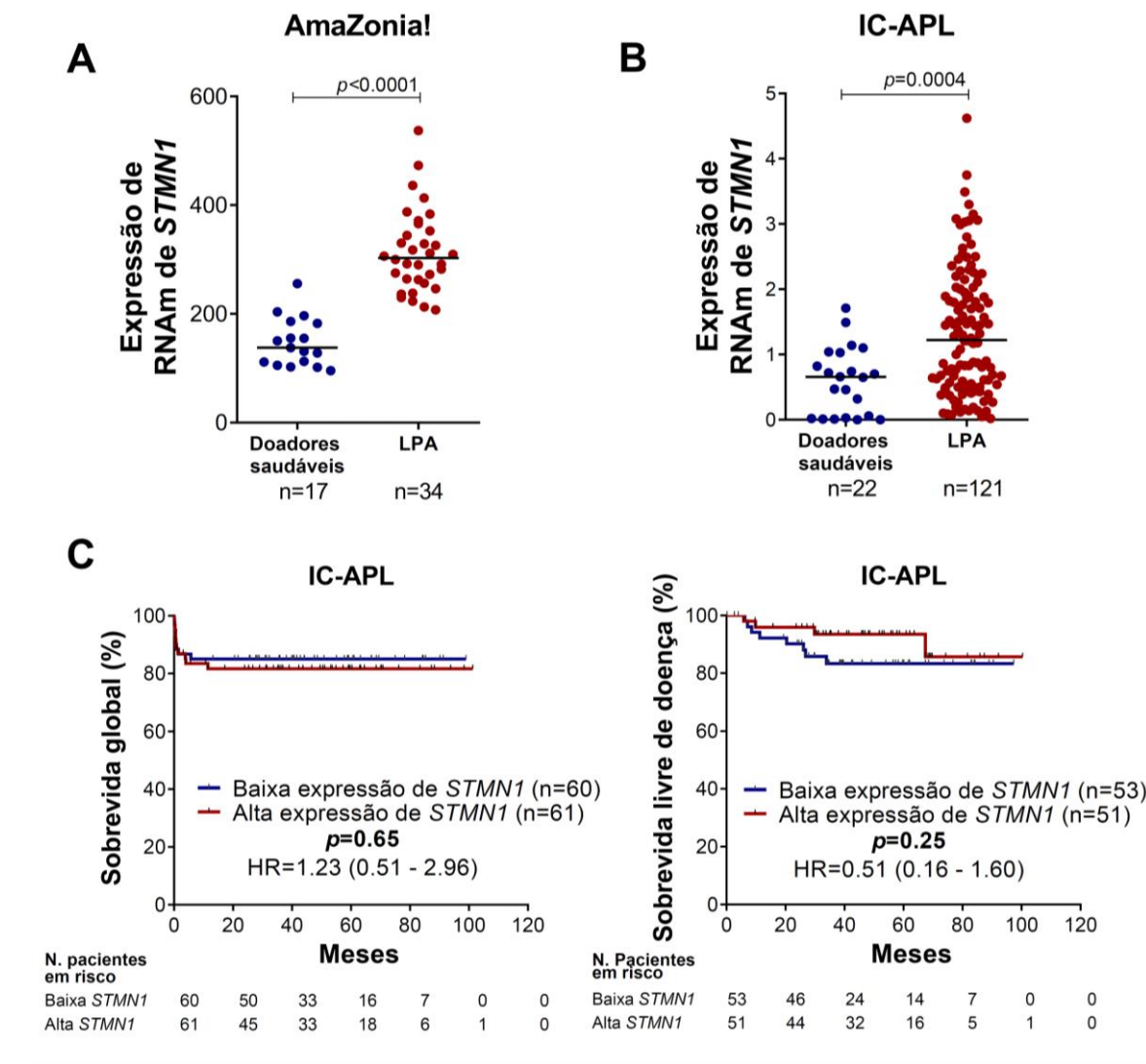
4. RESULTADOS

PARTE I

4.1. STMN1 é altamente expresso e está associado a assinaturas de genes relacionados à proliferação e metabolismo em LPA

Dada a associação entre a expressão de PML::RAR α e o aumento da expressão de STMN1 relatado em modelos celulares de LPA (176), investigamos inicialmente a expressão de STMN1 em amostras de doadores saudáveis e pacientes com LPA em uma coorte de um banco de dados público e validamos os achados usando a coorte IC-APL. A expressão de STMN1 foi significativamente aumentada em amostras de pacientes com LPA em comparação com amostras de doadores saudáveis em ambas as coortes (todos $p < 0,001$; **Figura 5A-B**). Na coorte IC-APL, a expressão de STMN1 não teve impacto nos resultados clínicos ($p > 0,05$; **Figura 5C** e **Tabela 3**) e não foi associada a variáveis clínicas relevantes (**Tabela 4**).

Figura 5. STMN1 é altamente expresso em pacientes com leucemia promielocítica aguda



(A) Níveis de mRNA de STMN1 (200783_s_at e 217714_s_at) em amostras de doadores saudáveis e pacientes com leucemia promielocítica aguda (LPA). O eixo "y" representa dados de expressão gênica obtidos do banco de dados AmaZonia! 2008 (<http://amazonia.transcriptome.eu>), que foram medidos usando arrays Affymetrix HGU133 plus 2.0. Os conjuntos de dados foram cruzados usando números de identificação específicos do tumor. O número de sujeitos para cada grupo é indicado. Os valores de p estão indicados; teste de Mann-Whitney. **(B)** Análise de qPCR da expressão de RNAm de STMN1 em células da medula óssea de doadores saudáveis e de pacientes com LPA. Os genes HPRT1 e ACTB foram usados como gene de referência e uma amostra da linhagem celular NB4 foi usada como amostra calibradora. As linhas horizontais indicam as medianas. O número de sujeitos estudados é indicado no gráfico. Os valores de p estão indicados; teste de Mann-Whitney. **(C)** Sobrevida global e sobrevida livre de doença para pacientes com LPA caracterizada pela mediana dos níveis de RNAm de STMN1. São indicados os valores de p , razão de risco (HR), intervalo de confiança de 95% e número de pacientes em risco; Teste de Long-rank.

Tabela 3. Análise univariada e multivariada para sobrevida livre de doença, sobrevida global e remissão completa de pacientes com LPA de acordo com características clínico-laboratoriais e expressão de *Stathmin 1*

Fatores	Sobrevida livre de doença					
	Univariada			Multivariada		
	HR ¹	(95% C.I.)	P ³	HR ¹	(95% C.I.)	P ³
Gênero	1.27	0.38 - 4.14	0.70	1.25	0.37 - 4.26	0.72
Masculino vs. feminino						
Idade no diagnóstico (variável contínua)	0.97	0.92 - 1.01	0.22	0.97	0.91 - 1.02	0.27
Contagem de leucócitos <10 × 10 ⁹ /L vs. ≥10 × 10 ⁹ /L *	5.15	1.42 - 18.65	0.01	4.8	1.29 - 17.83	0.02
Contagem de plaquetas <40 × 10 ⁹ /L vs. ≥40 × 10 ⁹ /L *	1.33	0.35 - 5.05	0.67	1.36	0.33 - 5.54	0.66
Expressão de <i>Stathmin 1</i> (variável contínua)	1.08	0.58 - 2.03	0.81	0.93	0.48 - 1.77	0.83

Fatores	Sobrevida global					
	Univariada			Multivariada		
	HR ¹	(95% C.I.)	P ³	HR ¹	(95% C.I.)	P ³
Gênero	0.71	0.29 - 1.75	0.47	0.63	0.25 - 1.57	0.32
Masculino vs. feminino						
Idade no diagnóstico (variável contínua)	1.02	0.99 - 1.05	0.23	1.02	0.99 - 1.06	0.21
Contagem de leucócitos <10 × 10 ⁹ /L vs. ≥10 × 10 ⁹ /L *	2.30	0.95 - 5.55	0.06	2.54	1.04 - 6.2	0.04
Contagem de plaquetas <40 × 10 ⁹ /L vs. ≥40 × 10 ⁹ /L *	1.19	0.46 - 3.1	0.72	1.19	0.43 - 3.25	0.74
Expressão de <i>Stathmin 1</i> (variável contínua)	0.98	0.62 - 1.54	0.93	0.98	0.61 - 1.56	0.92

Fatores	Remissão completa					
	Univariada			Multivariada		
	OR ²	(95% C.I.)	P ³	OR ²	(95% C.I.)	P ³
Gênero	1.43	0.96 - 2.13	0.07	1.54	1.02 - 2.32	0.04
Masculino vs. feminino						
Idade no diagnóstico (variável contínua)	1.00	0.98 - 1.01	0.96	1.00 1	0.98 - 1.01	0.81
Contagem de leucócitos <10 × 10 ⁹ /L vs. ≥10 × 10 ⁹ /L *	0.93	0.61 - 1.4	0.71	0.89	0.58 - 1.37	0.63
Contagem de plaquetas <40 × 10 ⁹ /L vs. ≥40 × 10 ⁹ /L *	0.84	0.54 - 1.32	0.47	0.71	0.44 - 1.13	0.16
Expressão de <i>Stathmin 1</i> (variável contínua)	1.14	0.93 - 1.4	0.22	1.17	0.95 - 1.45	0.13

Abreviações: LPA, Leucemia promielocítica aguda

Diferenças estatisticamente significativas são destacadas em negrito.

¹Hazard ratios (HR) > 1 indica que o primeiro fator tem o pior resultado.

²Odds ratios (OR) > 1 indica que o primeiro fator tem o pior resultado.

³Valores ausentes foram excluídos no cálculo dos valores de *p*.

Tabela 4. Comparação das características clínicas e laboratoriais de pacientes com LPA de acordo com a expressão do gene *Stathmin 1*

Características dos pacientes	Todos pacientes (n=121)		Baixa expressão (n=60)		Alta expressão (n=61)		P-valor ¹
	No.	%	No.	%	No.	%	
Gênero							0.65
Masculino	58	52.1	30	50	28	45.9	
Feminino	63	47.9	30	50	33	54.1	
Idade (anos), mediana	35		36		35		0.64
Intervalo	9 - 74		18 - 65		9 - 74		
Idade							0.09
<18 anos	4	3.3	0	-	4	6.6	
≥18 & <40 anos	71	58.7	37	61.7	34	55.7	
≥40 & <60 anos	38	31.4	21	35.0	17	27.9	
≥60 years	8	6.6	2	3.3	6	9.8	
Escala de performance ECOG							0.49
0-1	95	78.5	47	78.3	48	78.7	
2	15	12.4	6	10	9	14.8	
≥3	11	9.1	7	11.7	4	6.6	
Leucócitos (×10 ⁹ /L), mediana	4.9		6.9		3.2		0.23
Intervalo	0.2 - 132.5		0.5 - 132.5		0.2 - 128.5		
Hemoglobina (g/dL), mediana	8.8		8.6		8.9		0.22
Intervalo	3.4 - 14.10		4.7 - 14.1		3.4 - 13.3		
Plaquetas (×10 ⁹ /L), mediana	27		24.5		28		0.03
Intervalo	3 - 128		3 - 92		4 - 128		
Risco de recaída ²							0.10
Baixo risco	21	17.4	6	10	15	24.6	
Risco intermediário	56	46.3	31	51.7	25	41.0	
Alto risco	44	36.4	23	38.3	21	34.4	
Ponto de quebra do PML ³							0.60
BCR1/2	72	65.5	36	67.9	36	63.2	
BCR3	38	34.5	17	32.1	21	36.8	
Missing	11	-	7	-	4	-	0.14
Creatinina (μmol/L), mediana	0.8		0.8		0.8		
Intervalo	0.42 - 4.3		0.4 - 4.3		0.5 - 2.2		
Ácido úrico (μmol/L), mediana	3.8		3.9		3.7		0.85
Intervalo	0.8 - 9.0		1.2 - 8.0		0.8 - 9.0		
Albumina (g/L), mediana	40		42		39		0.17
Intervalo	22 - 54		22 - 54		23 - 53		
Fibrinogênio (g/L), mediana	160.5		162.5		154.5		0.57
Intervalo	10 - 605		48 - 549		10 - 605		
Subtipo morfológico							0.09
Hipergranular	115	95	55	91.5	60	98.3	
Microgranular	6	5	5	8.5	1	1.7	

Abreviações: LPA, Leucemia promielocítica aguda; ECOG, *Eastern cooperative oncology group*; BCR, *Breakpoint cluster region*.

Diferenças estatisticamente significativas estão destacadas em negrito.

¹Valores ausentes foram excluídos dos cálculos dos valores de *p*.

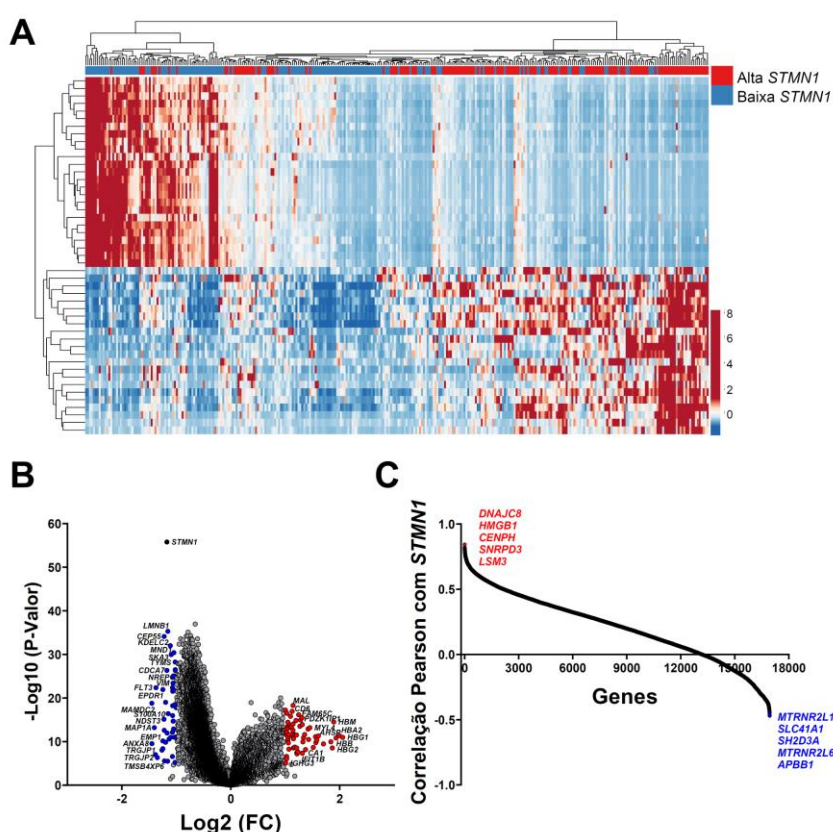
²Classificação de acordo com os critérios PETHEMA-GIMEMA.

³BCR1 e BCR2 foram combinados.

Para entender o potencial significado biológico dos níveis elevados de STMN1 no contexto de LPA, uma análise genômica funcional foi realizada utilizando dados de RNA-seq de uma terceira coorte de pacientes com LPA (180). Usando a expressão mediana de STMN1 como ponto de corte, um total de 11.948 genes foram identificados como diferencialmente expressos entre pacientes com LPA com alta e

baixa expressão de STMN1 (1.861 foram aumentados e 10.087 foram diminuídos; todos $p < 0,05$; **Figura 6**). A análise de Gene Ontology indicou que a expressão diferencial de STMN1 estava associada a processos de ligação a macromoléculas, sinalização mediada por receptores celulares e transdução de sinal. As 10 principais funções moleculares e suas sobre-representações são ilustradas na **Figura 7**. A análise de enriquecimento de conjuntos de genes identificou 20 assinaturas de genes associadas à expressão diferencial de STMN1 (todos $p < 0,05$ e $q < 0,25$; **Tabela 5**), das quais destacamos alvos E2F, alvos MYC, ponto de verificação G₂/M, reparo de DNA, glicólise e sinalização PI3K/AKT/mTOR (**Figura 8**). Em conjunto, esses achados indicam que a expressão de STMN1 está associada a assinaturas de genes relacionados à proliferação e ao metabolismo em LPA.

Figura 6. Genes identificados como diferencialmente expressos entre pacientes com LPA com alta e baixa expressão de STMN1

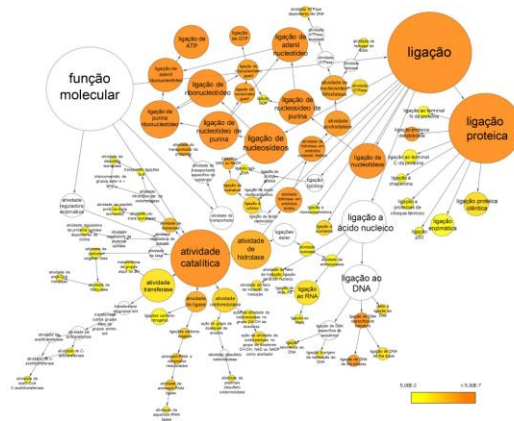
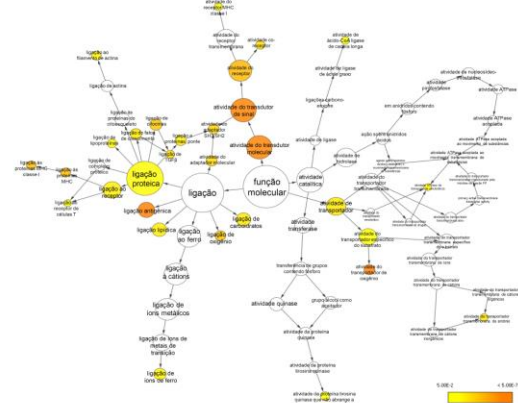


(A) Mapa de calor construído usando ClusterVis e resumindo a expressão dos 25 principais genes regulados positivamente e 25 genes regulados negativamente na expressão baixa *versus* alta de STMN1. A intensidade da cor representa a pontuação z dentro de cada linha. **(B)** Gráficos de vulcão representando a extensão (eixo x) e a significância (eixo y) da expressão gênica diferencial para cada gene comparando a expressão baixa *versus* alta de STMN1, respectivamente. **(C)** A correlação de Pearson mostra os genes correlacionados positiva e negativamente com o gene STMN1 em pacientes com LPA (180).

Figura 7. Funções moleculares associadas à expressão diferencial de *STMN1***A**

Funções moleculares reguladas negativamente em <i>STMN1</i> baixa vs. alta	p-valor	FDR
ligação a proteínas (GO:0005515)	2.22E-68	1.08E-64
ligação (GO:0005488)	5.72E-59	1.39E-55
função molecular (GO:0003674)	1.18E-53	1.44E-50
atividade catalítica (GO:0003824)	1.76E-33	1.71E-30
atividade do receptor acoplado à proteína G (GO:0004930)	1.06E-31	8.59E-29
atividade do receptor olfativo (GO:0004984)	2.93E-29	2.03E-26
ligação a RNA (GO:0003723)	8.02E-29	4.87E-26
ligação de composto heterocíclico (GO:1901363)	4.11E-27	2.22E-24
ligação de composto cíclico orgânico (GO:0097159)	6.19E-27	3.01E-24
atividade receptor de sinalização transmembrana (GO:0004888)	7.03E-23	3.11E-20

Funções moleculares reguladas positivamente em <i>STMN1</i> baixa vs. alta	p-valor	FDR
ligação a antígenos (GO:0003823)	2.27E-82	1.11E-78
ligação ao receptor de imunoglobulina (GO:0034987)	6.23E-52	1.51E-48
ligação ao receptor de sinalização (GO:0005102)	2.76E-25	4.48E-22
ligação de ácido nucleico (GO:0003676)	2.75E-12	3.34E-09
ligação a RNA (GO:0003723)	2.15E-09	2.09E-06
ligação à haptoglobina (GO:0031720)	2.45E-09	1.99E-06
ligação de composto heterocíclico (GO:1901363)	6.61E-09	4.59E-06
ligação de composto cíclico orgânico (GO:0097159)	1.39E-08	8.46E-06
atividade do transportador de oxigênio (GO:0005344)	1.88E-08	1.02E-05
ligação à hemoglobina (GO:0030492)	8.69E-07	4.22E-04

BFunções moleculares reguladas negativamente em *STMN1* baixa vs. altaFunções moleculares reguladas positivamente em *STMN1* baixa vs. alta

(A) Genes diferencialmente expressos identificados (fold change 1.5) foram usados para análise de Gene Ontology e as dez principais funções moleculares reguladas positivamente e reguladas negativamente são ilustradas. **(B)** Funções moleculares enriquecidas obtidas pelo software Cytoscape e análises do plugin BiNGO foram destacadas com cores diferentes representando diferentes níveis de significância. O tamanho de cada círculo está correlacionado ao número de genes.

Tabela 5. Análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA) para grupos de alta *versus* baixa expressão de STMN1 de pacientes com leucemia promielocítica aguda

Conjunto de genes	NES	NOM p-valor	FDR q-valor
HALLMARK_MYC_TARGETS_V1	2.00	< 0.0001	0.04
HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM	2.00	< 0.0001	0.02
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.91	< 0.0001	0.04
HALLMARK_GLYCOLYSIS	1.91	< 0.0001	0.03
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	1.91	0.004	0.03
HALLMARK_DNA_REPAIR	1.88	< 0.0001	0.03
HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	1.88	< 0.0001	0.02
HALLMARK_E2F_TARGETS	1.87	0.01	0.02
HALLMARK_PEROXISOME	1.86	< 0.0001	0.02
HALLMARK_ADIPOGENESIS	1.85	0.002	0.02
HALLMARK_G2M_CHECKPOINT	1.82	0.01	0.02
HALLMARK_SPERMATOGENESIS	1.81	< 0.0001	0.02
HALLMARK_PROTEIN_SECRETION	1.80	0.002	0.02
HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING	1.78	< 0.0001	0.02
HALLMARK_XENOBIOTIC_METABOLISM	1.77	0.01	0.03
HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	1.74	0.01	0.03
HALLMARK_MYC_TARGETS_V2	1.74	0.02	0.03
HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE	1.74	0.004	0.03
HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPECIES_PATHWAY	1.69	0.01	0.04
HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE	1.68	0.01	0.04
HALLMARK_UV_RESPONSE_UP	1.65	0.03	0.05
HALLMARK_P53_PATHWAY	1.58	0.03	0.07
HALLMARK_APOPTOSIS	1.55	0.04	0.08

* Os dados de RNA-seq foram obtidos de Lin *et al.* Clin Cancer Res; 27(13): 3683-3694, 2021.

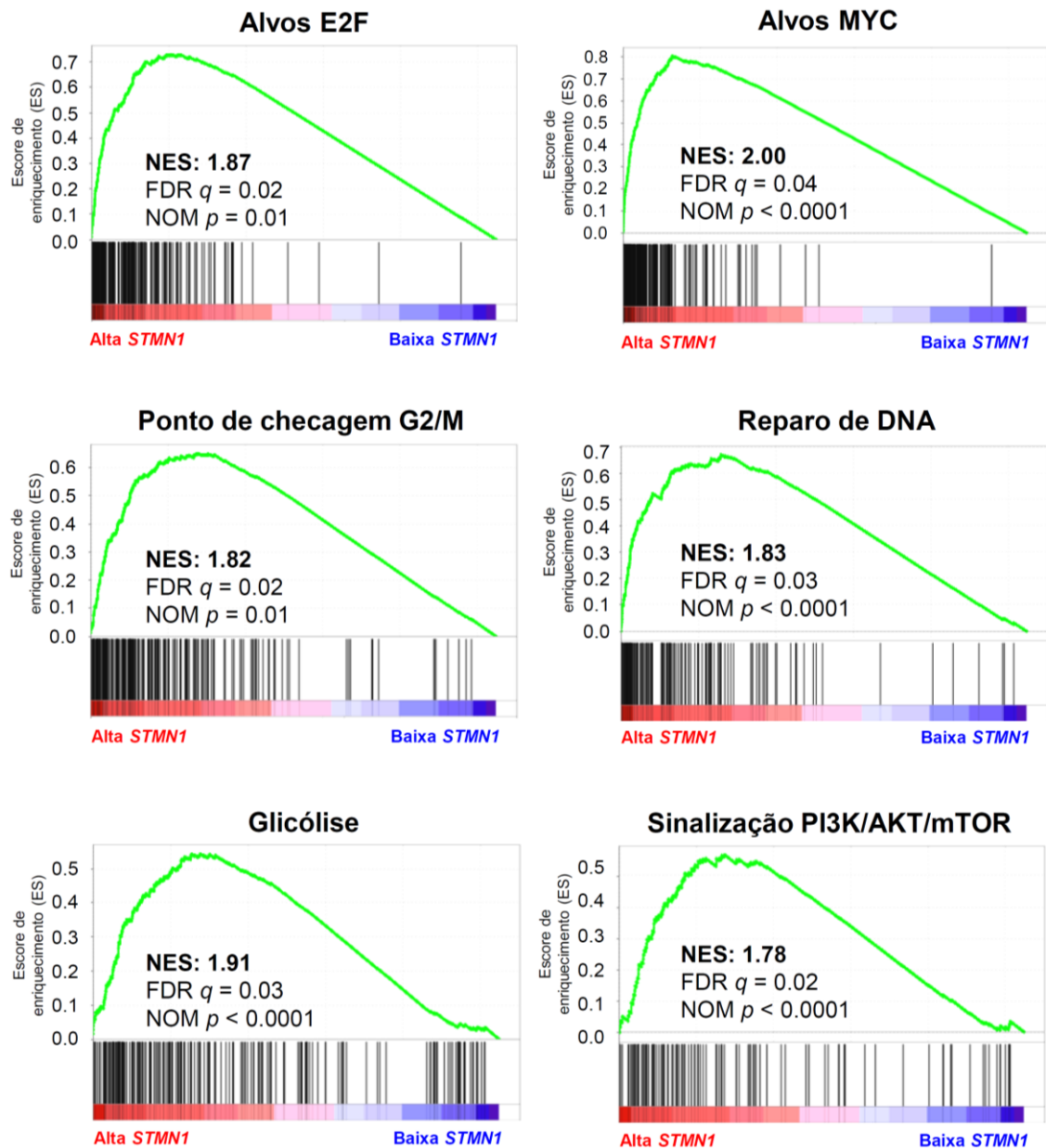
Abreviação: NES, *normalized enrichment score* (pontuação de enriquecimento normalizada); NOM, nominal; FDR, *false discovery rate* (taxa de falsa descoberta).

4.2. STMN1 é regulado negativamente durante a diferenciação granulocítica induzida por ATRA, e sua atividade é modulada durante a progressão do ciclo celular das células de LPA

Em modelos de diferenciação eritroide e megacariocítica, sabe-se que a expressão de *STMN1* é maior em progenitores celulares com maior potencial proliferativo e menor durante o processo diferencial terminal (168). No entanto, a dinâmica da expressão de *STMN1* em outros compartimentos mieloides permanece pouco compreendida. Utilizando dados de microarray (GSE24759), obteve-se uma resolução mais precisa da expressão de *STMN1* em diferentes compartimentos da hierarquia de diferenciação mieloide. *STMN1* foi altamente expresso em subpopulações de células progenitoras e foi reduzido em células eritroides, megacariócitos, metamielócitos, basófilos e monócitos (todos $p < 0,05$ vs. HSC1,

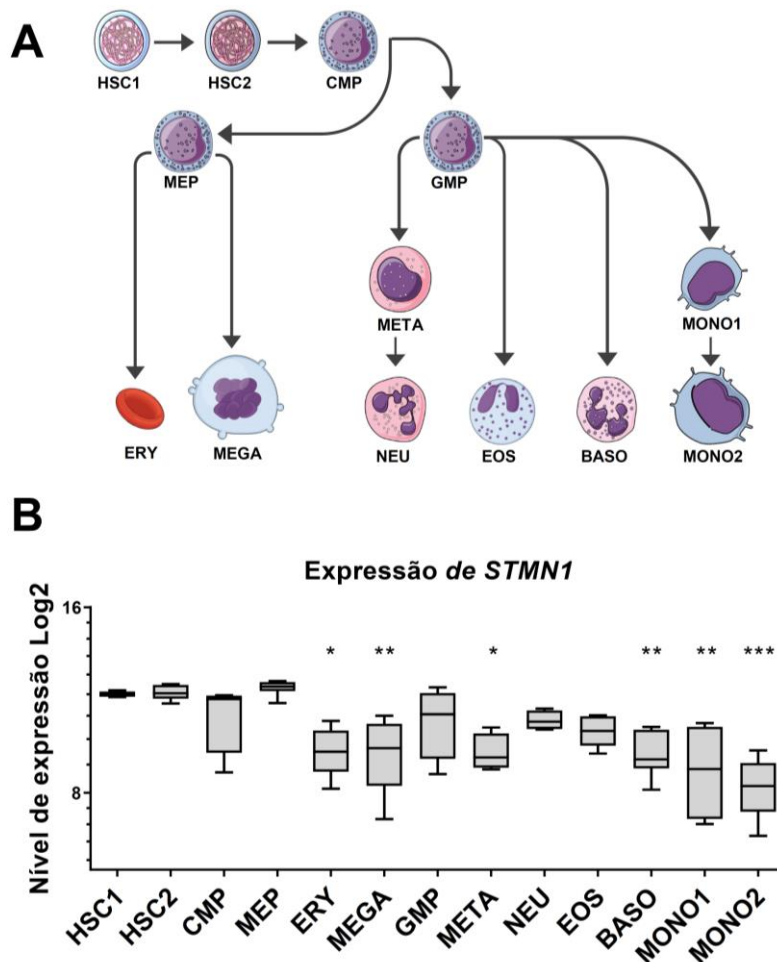
Figura 9). Esses dados corroboram descobertas anteriores e fornecem novas perspectivas sobre o papel de STMN1 na mielopoese.

Figura 8. STMN1 está associada a assinaturas gênicas relacionadas à proliferação e ao metabolismo na leucemia promielocítica aguda



Gráficos representativos da GSEA que refletem o grau em que a expressão de um conjunto de genes é regulada positivamente ou regulada negativamente em pacientes com LPA com expressão alta *versus* baixa de STMN1. A parte superior do gráfico mostra as pontuações de enriquecimento (ES) para o conjunto de genes. O ponto com o desvio máximo de zero é definido como o ES do conjunto de genes. O subconjunto de ponta (o subconjunto de genes com a contribuição mais significativa para o ES) é mostrado como uma barra vertical acumulada antes da pontuação máxima, para ES positivo, ou após a pontuação máxima, para ES negativo. Valores de p ajustados por FDR e pontuações de enriquecimento normalizadas para tamanho do conjunto de genes (NES) são indicados em cada gráfico.

Figura 9. STMN1 é altamente expressa em progenitores hematopoiéticos iniciais e reduz durante a diferenciação celular

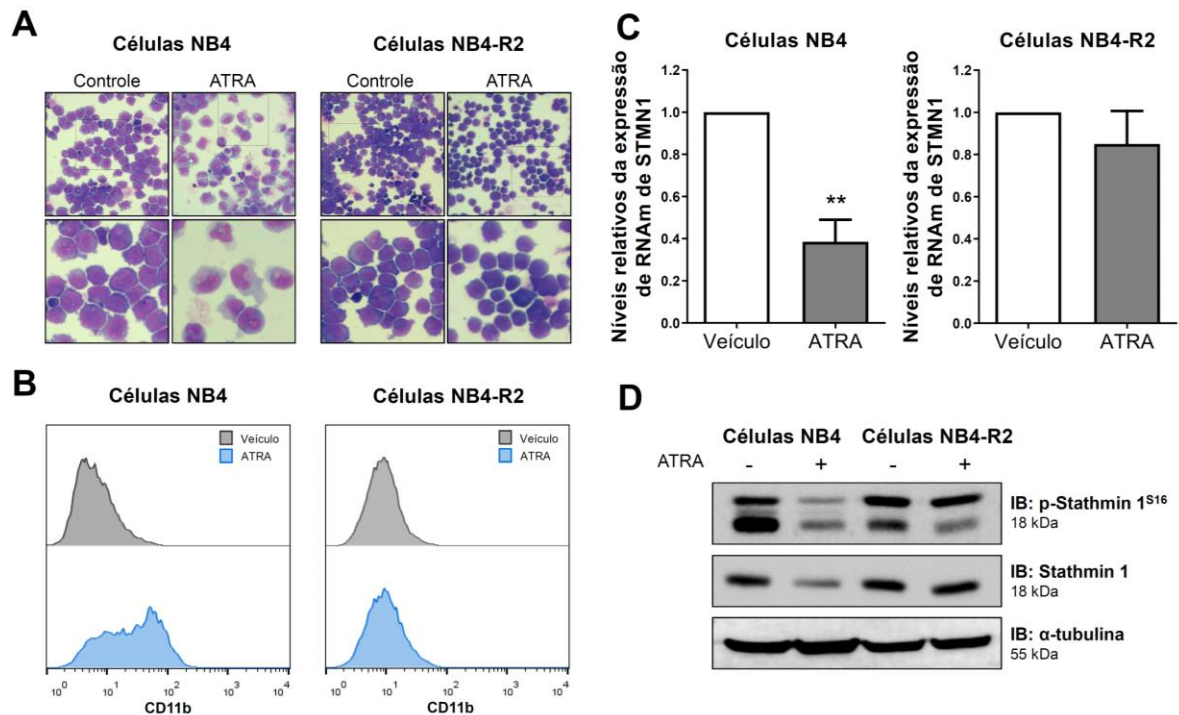


(A) Representação esquemática da hierarquia de diferenciação mieloide ilustrando as subpopulações celulares analisadas (<https://mindthegraph.com/>). **(B)** Perfil de expressão gênica para STMN1 (sonda 200783_s_at) em subpopulações de células mieloides (GSE24759). Os valores de p e as linhagens celulares estão indicados nos gráficos; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Em seguida, investigamos os efeitos do tratamento com ATRA em linhagens celulares de LPA sensíveis (NB4) e resistentes ao ATRA (NB4-R2). Nas células NB4, mas não nas células NB4-R2, o ATRA induziu diferenciação granulocítica (**Figura 10A-B**), que foi seguida por uma redução proeminente na expressão de STMN1 nos níveis de RNAm e proteína (**Figura 10C-D**). Como STMN1 foi encontrada altamente expressa e fosforilada na serina 16 (um sítio inibitório) em ambas as linhagens celulares de PML::RAR α não tratadas, examinamos se a ativação de STMN1 poderia ocorrer em algum momento. Utilizando células NB4 e NB4-R2 sincronizadas com timidina (**Figura 11A**), observamos que a fosforilação de STMN1 no sítio da serina 16

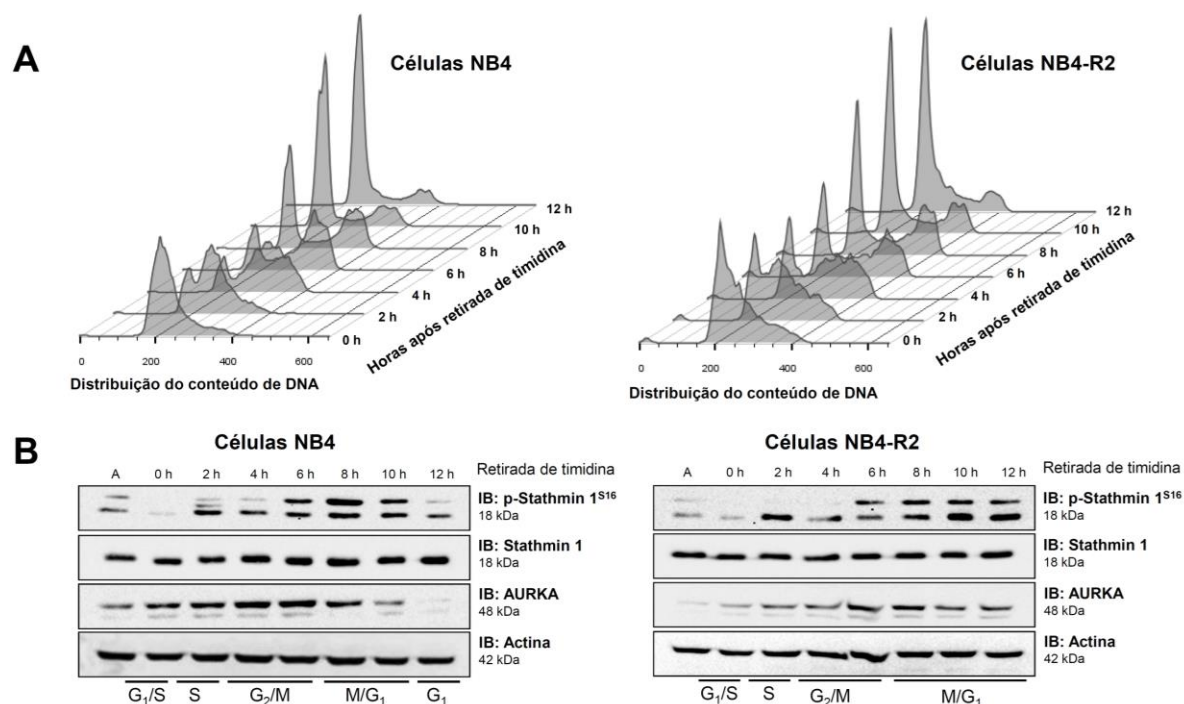
era predominante no grupo de células enriquecidas em mitose, e sua fosforilação foi consideravelmente reduzida no grupo de células enriquecidas em G1 (**Figura 11B**). Esses achados sugerem que a alta fosforilação de STMN1 está associada à mitose em células de LPA.

Figura 10. O ATRA induz diferenciação granulocítica e reduz STMN1 em células NB4, mas não em células NB4-R2



(A) Preparação de citospin corada com Rosenfeld (aumento de 200X) e histograma contendo expressão CD11b **(B)** na exposição de células NB4 e NB4-R2 ao veículo ou 1 μ M de ATRA por 72 horas. Esses experimentos são representativos de pelo menos quatro experimentos independentes **(C)** Expressão de RNAm de *STMN1* em exposição de células NB4 e NB4-R2 ao veículo ou 1 μ M de ATRA por 72 horas. Os genes *HPRT1* e *ACTB* foram utilizados como gene de referência e amostras de células tratadas com veículo foram utilizadas como amostra calibradora. As barras indicam a média $\pm$ DP de pelo menos quatro experimentos independentes. $**p < 0,01$; Teste *t* de Student. **(D)** Análise de Western blot fosfo(p)-stathmin 1^{S16}, stathmin 1 e α -tubulina em extratos celulares totais de exposição de células NB4 e NB4-R2 ao veículo ou 1 μ M de ATRA por 72 horas.

Figura 11. STMN1 é modulada durante a progressão do ciclo celular em linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda



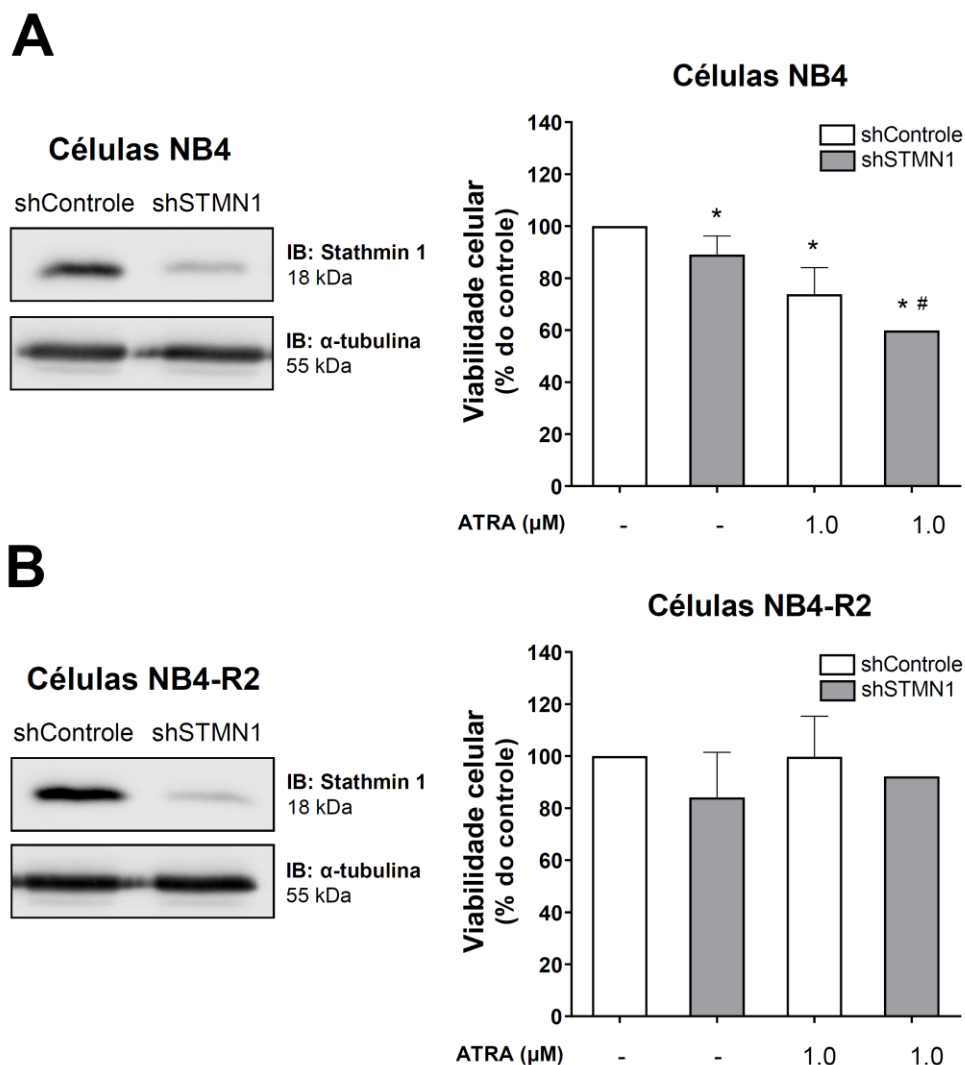
(A) NB4 e NB4-R2 foram sincronizados por bloqueio duplo de timidina. Após a liberação da timidina, as células foram coletadas em 6 momentos a cada 2 horas. A sincronização foi confirmada por FACS e Western blot utilizando AURKA (uma proteína relacionada à mitose). **(B)** Análise de Western blot fosfo (p)-stathmin 1^{S16}, stathmin 1 e AURKA em extratos celulares totais de células NB4 e NB4-R2 sincronizadas; as membranas foram reproovadas com o anticorpo para detecção de actina.

4.3. O silenciamento gênico de STMN1 reduz o crescimento clonal autônomo em células de LPA

Para avaliar as funções específicas de STMN1 em modelos celulares de LPA, sua expressão foi eficientemente silenciada por shRNA mediado por lentivírus (**Figura 12**). Nas células NB4, mas não nas células NB4-R2, a inibição de STMN1 reduziu a proliferação celular e potencializou os efeitos antiproliferativos do ATRA após exposição de curto prazo (72 h) (**Figura 12**). Por outro lado, o silenciamento de STMN1 reduziu a formação de colônias autônomas em ambas as linhagens celulares de LPA, sem efeito aditivo sobre o ATRA ($p < 0,05$; **Figura 13**). O silenciamento de STMN1 não modulou as taxas de apoptose induzidas por ATRA em células NB4 (**Figura 14**). Em células NB4-R2, mas não em células NB4, o silenciamento de STMN1 aumentou ligeiramente a expressão de CD11b após exposição ao ATRA (*fold change*

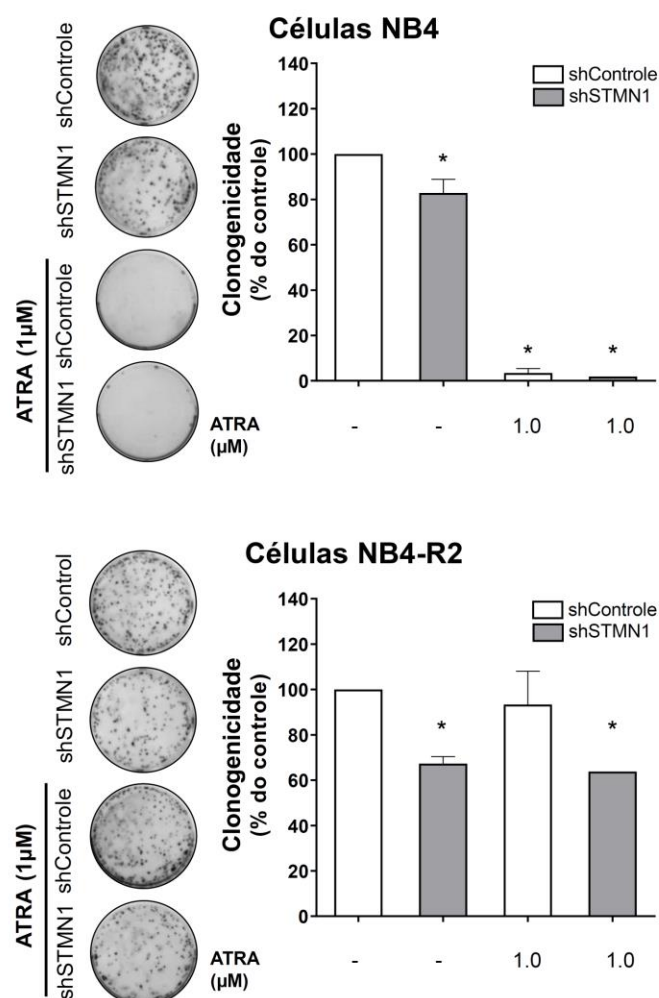
de 1,5 no shControle tratado com veículo; $p < 0,05$; **Figura 15**). Estes resultados destacam a contribuição de STMN1 para a clonogenicidade das células de leucemia aguda.

Figura 12. O silenciamento de STMN1 reduz a viabilidade celular e potencializa os efeitos do ATRA em células NB4.



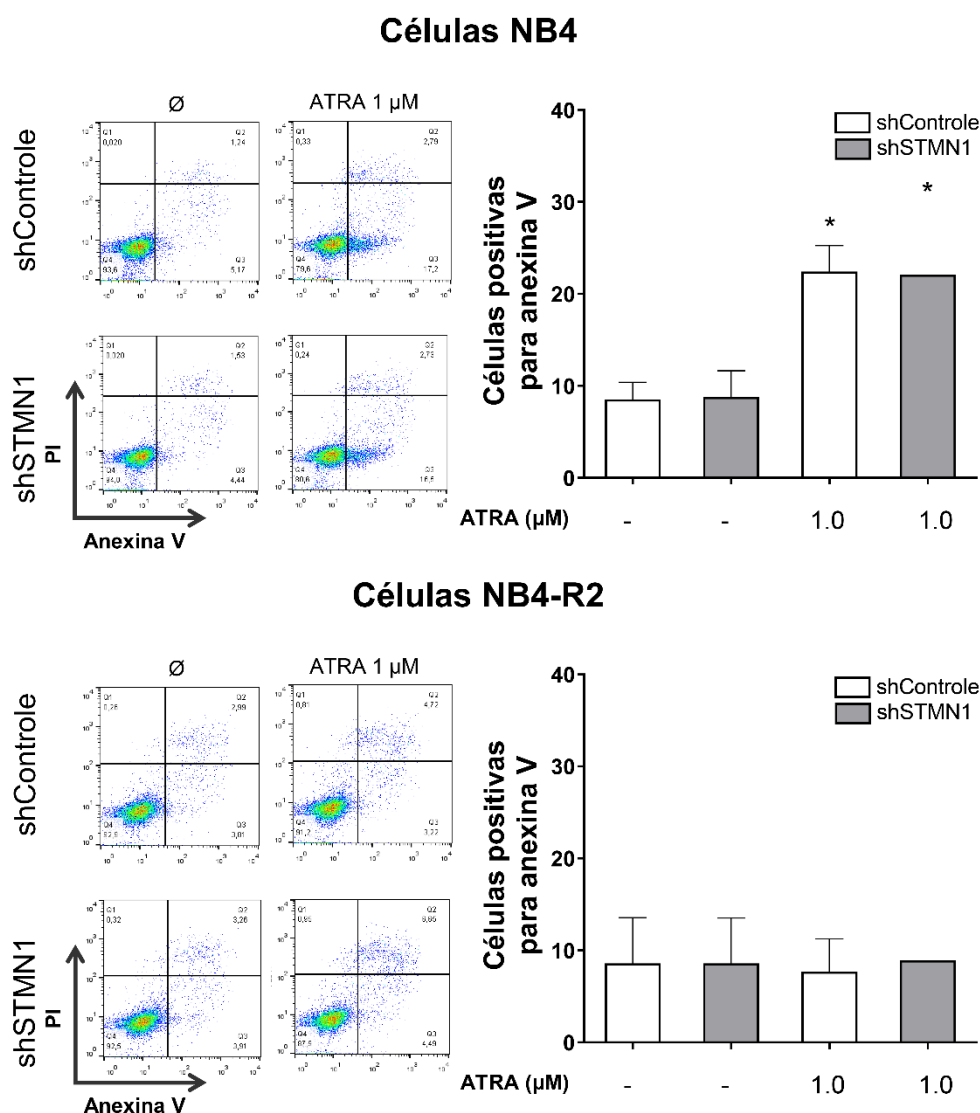
Expressão de STMN1 em células NB4 **(A)** e NB4-R2 **(B)** transduzidas com shRNA mediado por lentivírus controle (shControle) ou visando STMN1 (shSTMN1). A viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT após 72 horas de incubação de shSTMN1 e normalizada pelas células shControle correspondentes para exposição de células NB4 e NB4-R2 ao veículo ou ATRA (1 μM) por 72 horas. A inibição de STMN1 reduz a proliferação celular e potencializa os efeitos antiproliferativos de ATRA. Os valores foram expressos como uma percentagem de células tratadas com DMSO (Ø). Os resultados são apresentados como média ± DP. de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de p e linhagens celulares são indicados: * $p < 0,05$ para condição experimental vs. células shControle tratadas com veículo, # $p < 0,05$ para shSTMN1 sozinha ou células shControle tratadas com ATRA vs. células shSTMN1 tratadas com ATRA ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 13. O silenciamento de STMN1 reduz a clonogenicidade das células NB4 e NB4-R2



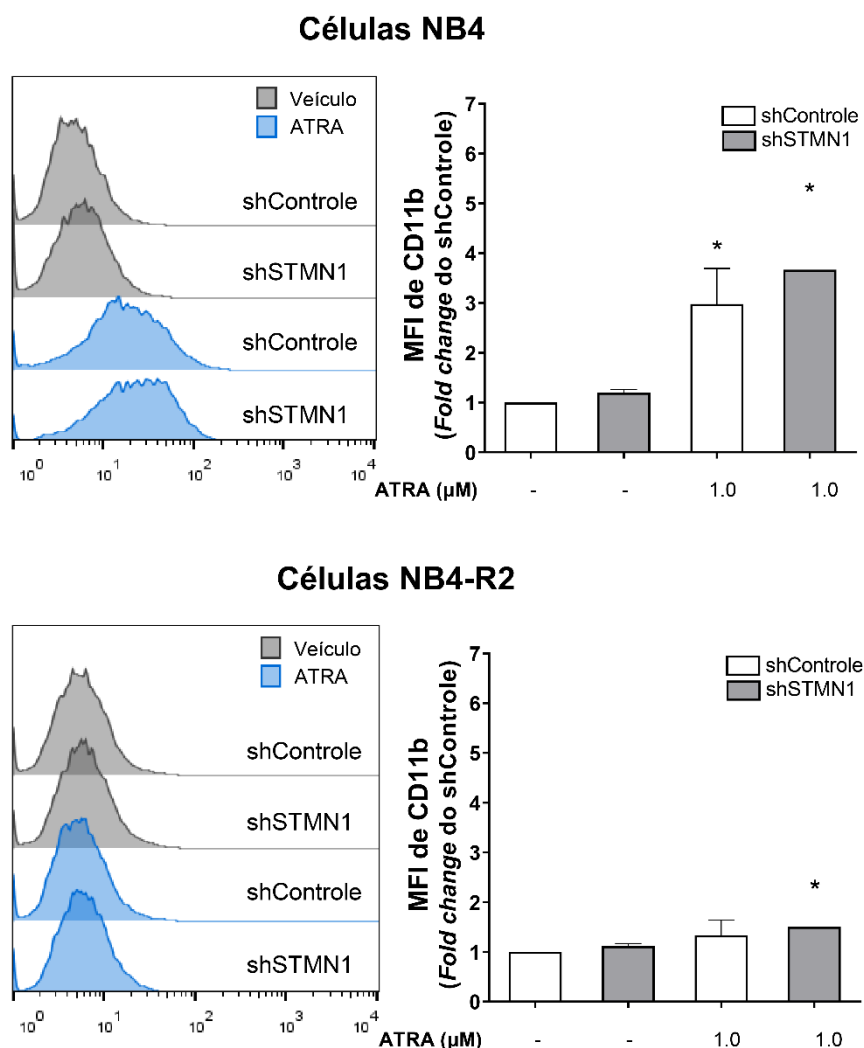
Colônias contendo células viáveis foram detectadas por MTT após 8 dias de cultura de shSTMN1 e normalizadas pelas shControl correspondentes. As imagens das colônias são representativas de um experimento e os gráficos de barras mostram a média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes. Os ensaios foram realizados na presença de veículo ou ATRA (1 μ M) conforme indicado. Para os gráficos de barras, os valores de p e as linhagens celulares são indicados: * $p < 0,05$ para condição experimental vs. células shControl tratadas com veículo.

Figura 14. Efeito do silenciamento de STMN1 sobre a apoptose induzida por ATRA nas células NB4 e NB4-R2



Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes superior e inferior direitos contêm cumulativamente a população apoptótica (células anexina V+). Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de pelo menos sete experimentos independentes quantificando morte celular apoptótica após exposição ao veículo ou ATRA (1 μ M) em células shControl e shSTMN1. Para os gráficos de barras, os valores de p e linhagens celulares são indicados: * $p < 0,05$ para condição experimental vs. células shControl tratadas com veículo; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

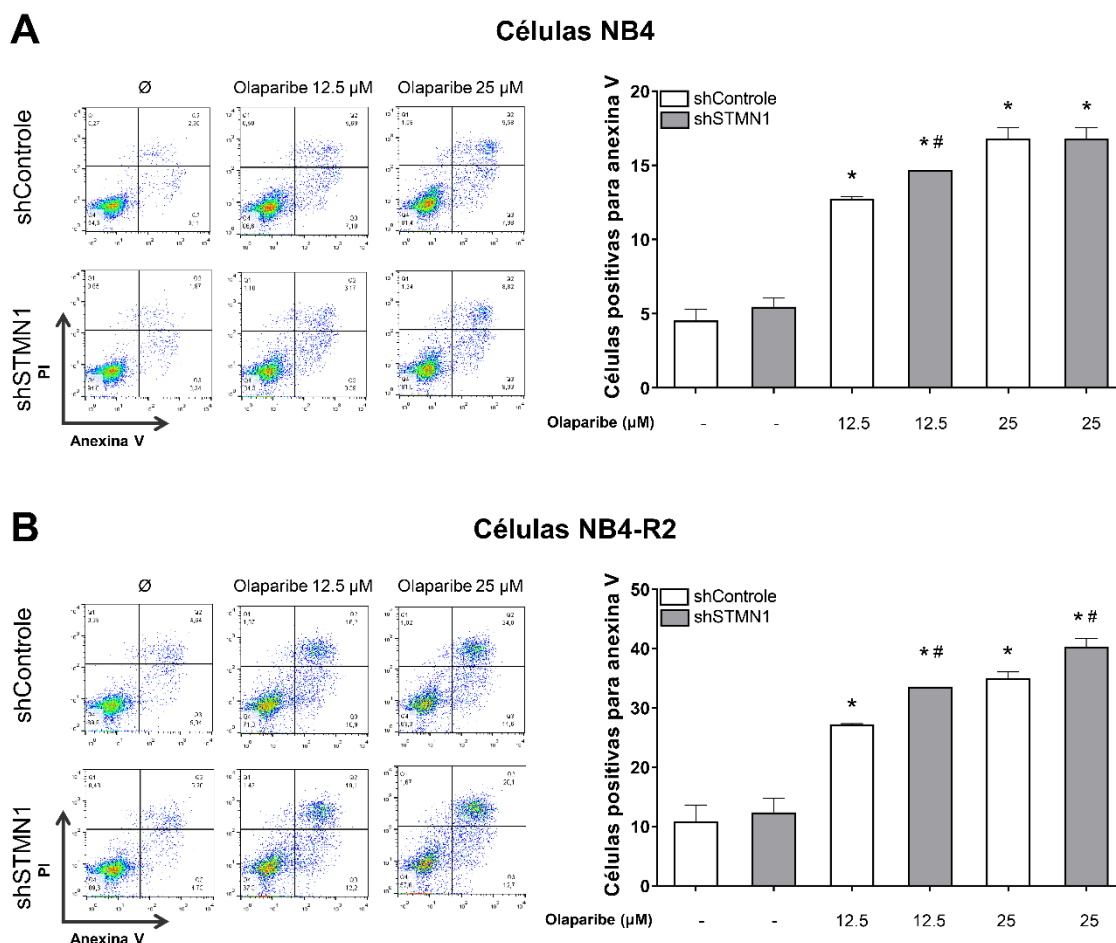
Figura 15. Efeito do silenciamento de STMN1 sobre a diferenciação celular induzida por ATRA nas células NB4 e NB4-R2



Histograma contendo a expressão de CD11b em células shControle e shSTMN1 expostas ao veículo ou 1 μM de ATRA por 72 horas. Os gráficos de barras representam a média ± DP de pelo menos sete experimentos independentes quantificando diferenciação celular após exposição ao veículo ou ATRA (1 μM) em células shControle e shSTMN1. Para os gráficos de barras, os valores de p e as linhagens celulares são indicados: * $p < 0,05$ para condição experimental vs. células shControle tratadas com veículo; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Considerando que a expressão de STMN1 estava associada a assinaturas de genes de reparo de DNA em pacientes com LPA, investigamos o impacto do silenciamento de STMN1 na resposta a um inibidor de PARP (olaparibe) em células NB4 e NB4-R2. Interessantemente, a inibição de STMN1 melhorou ligeiramente a apoptose induzida por olaparibe em linhagens celulares de LPA (**Figura 16**).

Figura 16. A inibição de STMN1 potencializa ligeiramente a apoptose induzida por olaparibe em linhagens celulares de LPA



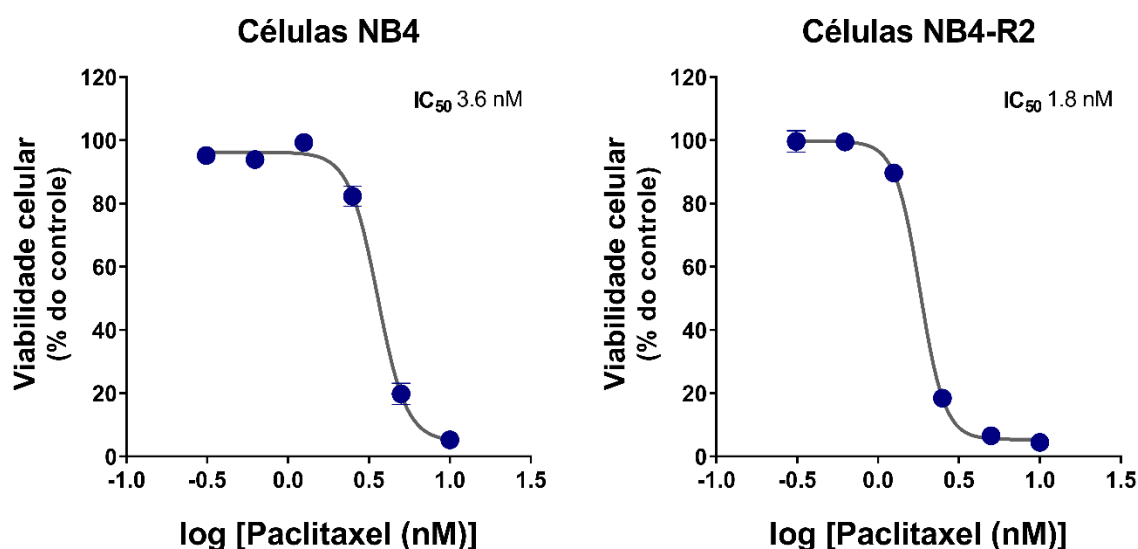
Efeitos do silenciamento de STMN1 na apoptose induzida por olaparibe em células NB4 e NB4-R2. Células NB4 **(A)** e NB4-R2 **(B)** transduzidas com shControl ou shSTMN1 foram tratadas com veículo (Ø) ou olaparibe (12,5 e 25 µM) por 72 horas. Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes superior e inferior direitos contêm cumulativamente a população apoptótica (células positivas para anexina V). Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes quantificando a morte celular apoptótica. Os valores de p e as linhagens celulares são indicados nos gráficos: * $p < 0,05$ para células tratadas com olaparibe vs. células tratadas com veículo, # $p < 0,05$ para células shControl tratadas com olaparibe vs. células shSTMN1 tratadas com olaparibe nas doses correspondentes; ANOVA pós-teste de Bonferroni.

4.4. O agente estabilizador de microtúbulos, paclitaxel, reduz a viabilidade celular e a clonogenicidade em células de LPA

Uma vez que a principal função de STMN1 é baseada na regulação da dinâmica dos microtúbulos (161), foi investigado o impacto do agente estabilizador de microtúbulos, paclitaxel, em células de LPA. As células NB4 e NB4-R2 exibiram alta sensibilidade ao paclitaxel (IC_{50} de 3,6 nM e 1,8 nM, respectivamente; **Figura 17**). Em

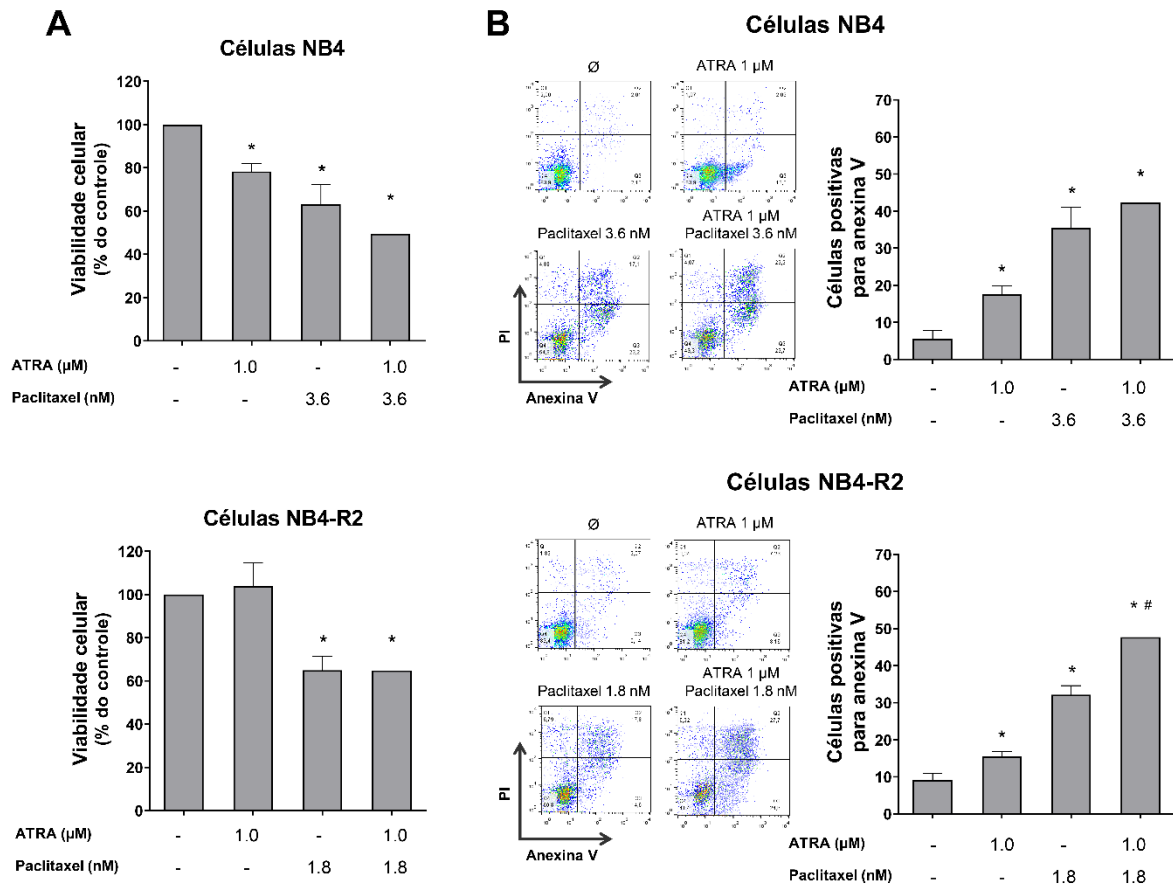
seguida, a dose de IC₅₀ de paclitaxel foi combinada com ATRA (1 μ M). Nas células NB4-R2, mas não nas células NB4, o paclitaxel potencializou a apoptose induzida por ATRA (**Figura 18**) e reduziu significativamente o crescimento clonal autônomo em células de LPA ($p < 0,05$; **Figura 19**). A análise de expressão proteica por Western blot revelou níveis aumentados de clivagem de caspase 3 em NB4-R2 submetidas ao tratamento combinado em comparação com monoterapias, corroborando a análise de anexina V. O tratamento com paclitaxel aumentou os níveis de acetil- α -tubulina, um marcador de estabilidade de microtúbulos, e γ -H2AX, um marcador de dano ao DNA (**Figura 20**). Além disso, a qPCR revelou que o tratamento com paclitaxel induziu a expressão de CDKN1A (**Figura 20**). Em conjunto, esses achados sugerem que o paclitaxel induz catástrofe mitótica e apoptose em linhagens celulares de LPA.

Figura 17. O paclitaxel reduz a viabilidade celular de células de leucemia promielocítica aguda



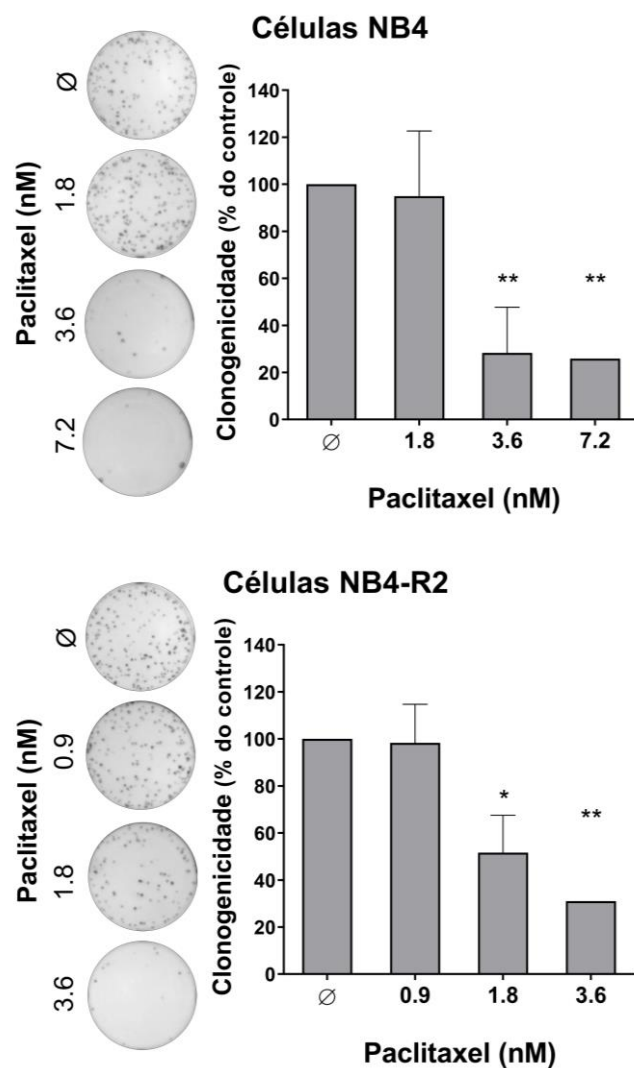
Curvas de citotoxicidade dose-resposta analisadas por ensaio de metiltiazoltetrazólio (MTT) para células NB4 e NB4-R2 tratadas com doses graduadas de paclitaxel por 72 horas. Os valores são expressos como a porcentagem de células viáveis para cada condição em relação aos controles não tratados. A IC₅₀ foi determinada utilizando análise de regressão não linear.

Figura 18. O paclitaxel potencializa a apoptose induzida por ATRA em células de leucemia promielocítica aguda



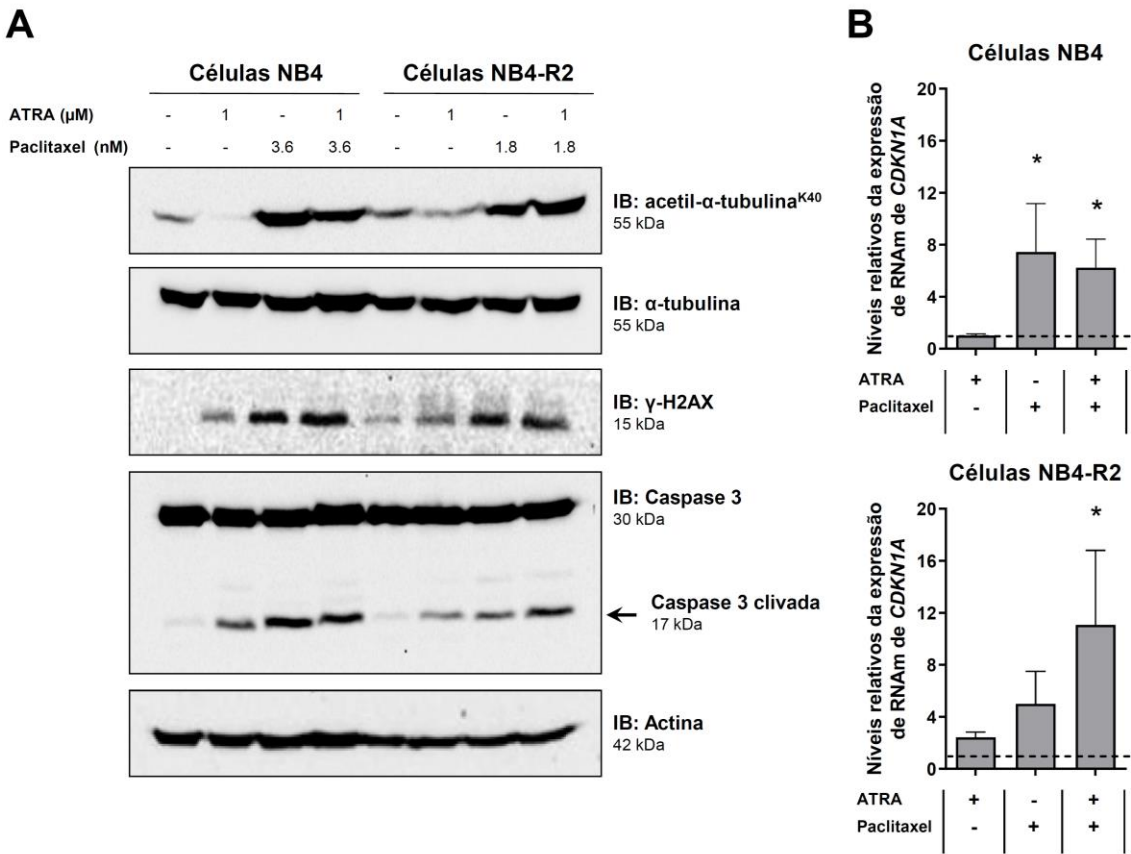
(A) A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT e a apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células NB4 e NB4-R2 tratadas com ATRA (1 μM) e/ou dose IC₅₀ de paclitaxel (3,6 nM e 1,8 nM, respectivamente) por 72 horas usando o método de coloração com anexina V/PI. **(B)** Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes superior e inferior direito contêm cumulativamente a população apoptótica (células de anexina V+). Os gráficos de barras representam a média ± DP de quatro experimentos independentes que quantificam a morte celular por apoptose. Os valores de *p* e linhagens celulares estão indicados nos gráficos: **p* < 0,05 para células tratadas com ATRA e/ou paclitaxel vs. células não tratadas, #*p* < 0,05 para células tratadas com ATRA ou paclitaxel vs. doses; Teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 19. O paclitaxel reduz o crescimento clonal autônomo de células de leucemia promielocítica aguda



Colônias contendo células viáveis foram detectadas por ensaios MTT após 8 dias de cultura de células NB4 e NB4-R2 tratadas com doses crescentes de paclitaxel durante 8 dias (exposição a longo prazo). Imagens de colônias são mostradas para um experimento e os gráficos de barras mostram a média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 20. O paclitaxel induz marcadores de dano ao DNA, apoptose e catástrofe mitótica em células NB4 e NB4-R2



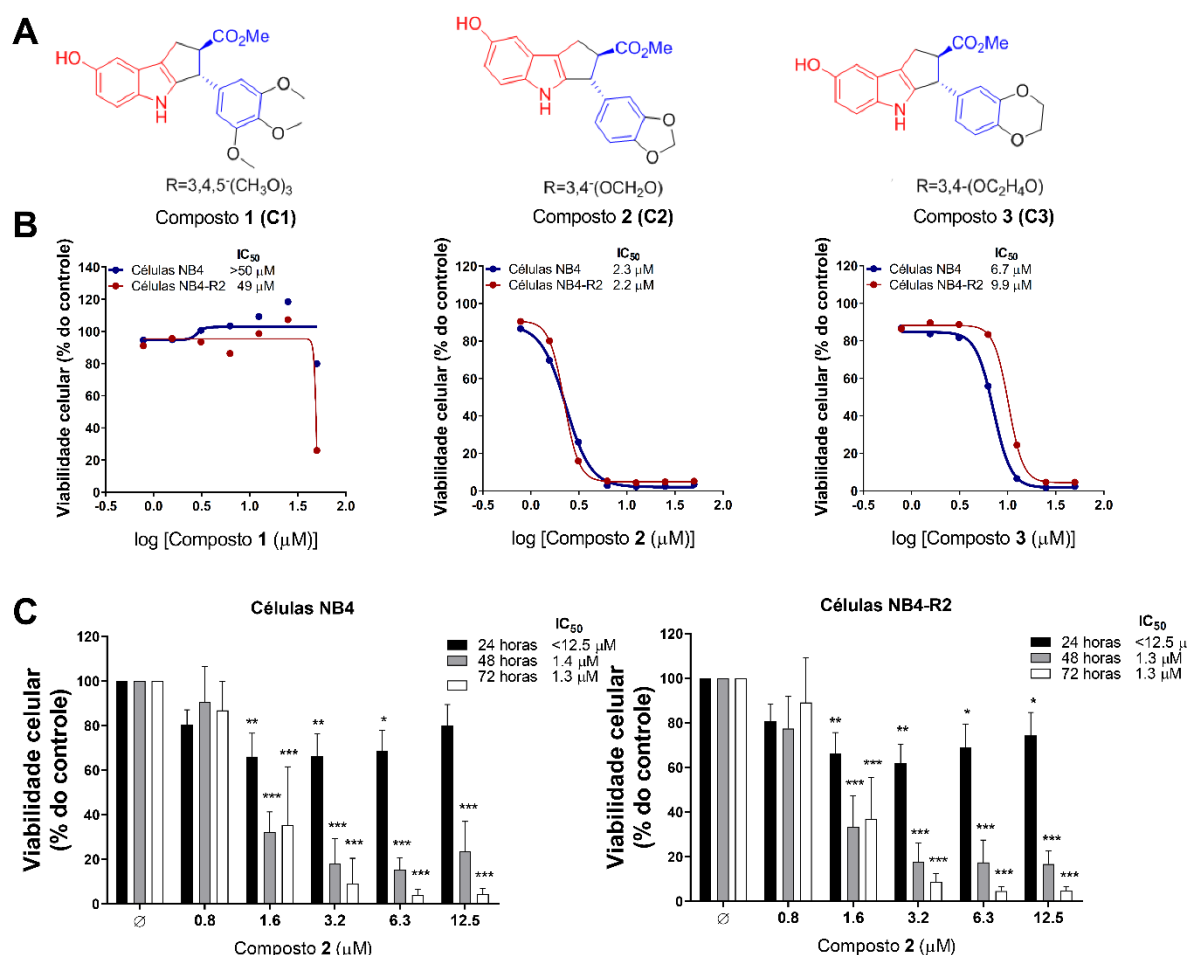
(A) Análise de Western blot para acetil-α-tubulina^{K40}, p-histona H2AX e caspase 3 (total e clivada) em extratos celulares totais de células NB4 e NB4-R2 tratadas com ATRA e/ou as concentrações indicadas de paclitaxel por 72 horas; as membranas foram reincubadas com o anticorpo para detecção de actina. **(B)** análise qPCR da expressão de RNAm de CDKN1A em células NB4 e NB4-R2 tratadas com ATRA e/ou nas concentrações indicadas de paclitaxel por 72 horas. A linha tracejada representa a expressão gênica média em células não tratadas e as barras representam a alteração na expressão gênica em células NB4 e NB4-R2 tratadas com ATRA, paclitaxel ou ambos em comparação com suas respectivas células tratadas com veículo. * $p < 0,05$ para células tratadas com ATRA e/ou paclitaxel vs. células não tratadas, # $p < 0,05$ para células tratadas com ATRA ou paclitaxel vs. tratamento de combinação nas doses correspondentes; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

PARTE II

4.5. Ciclopenta[β]indol C2 apresenta citotoxicidade seletiva em células de leucemia promielocítica aguda

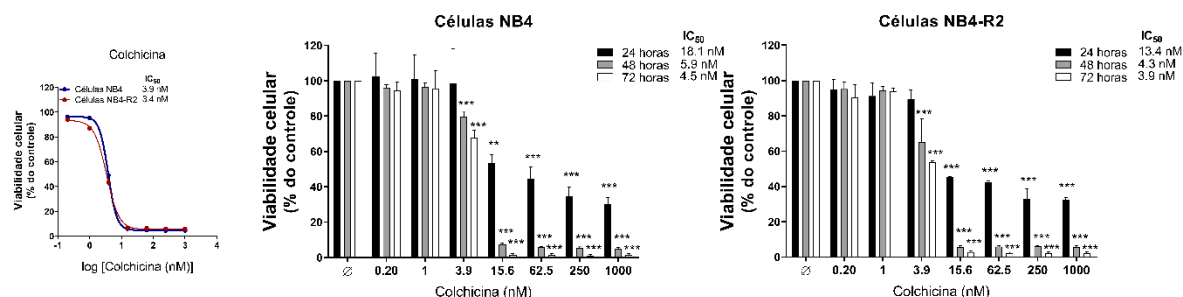
Na segunda parte do trabalho, foram testados inicialmente, três ciclopenta[β]indóis sintéticos, cujas estruturas estão apresentadas na **Figura 21A**, denominados C1, C2 e C3, em modelos celulares de leucemia promielocítica aguda sensíveis e resistentes ao ATRA. Entre os compostos avaliados, o composto 2 (C2) apresentou maior potencial citotóxico para ambas as linhagens celulares de leucemia. No entanto, esse mesmo potencial citotóxico não foi observado para os compostos 1 e 3, que mostraram menor potência e eficácia (**Figura 21B**). Para aprofundar a caracterização das propriedades farmacológicas do C2, foi realizada uma análise de resposta da viabilidade celular em relação à concentração e ao tempo. Tanto nas células NB4 quanto nas NB4-R2, C2 exerce uma redução da viabilidade celular dependente da concentração e do tempo em extensão semelhante entre células sensíveis e resistentes ao ATRA, como evidenciado pelo IC₅₀ semelhante (NB4: 1,3 e 1,4 μ M; NB4-R2: 1,3 e 1,3 μ M, após 48 e 72 h de exposição, respectivamente; $p < 0,05$) (**Figura 21C**). A colchicina foi usada como composto de referência nos ensaios iniciais, e suas curvas de concentração e tempo para células NB4 e NB4-R2 estão mostradas na **Figura 22**. Vale ressaltar que o C2 não reduziu a viabilidade de leucócitos normais, sugerindo seletividade para células sanguíneas malignas (IC₅₀ > 50 μ M; **Figura 23**).

Figura 21. Caracterização da atividade citotóxica de ciclopenta[β]indóis sintéticos em linhagens celulares de leucemia mieloide aguda



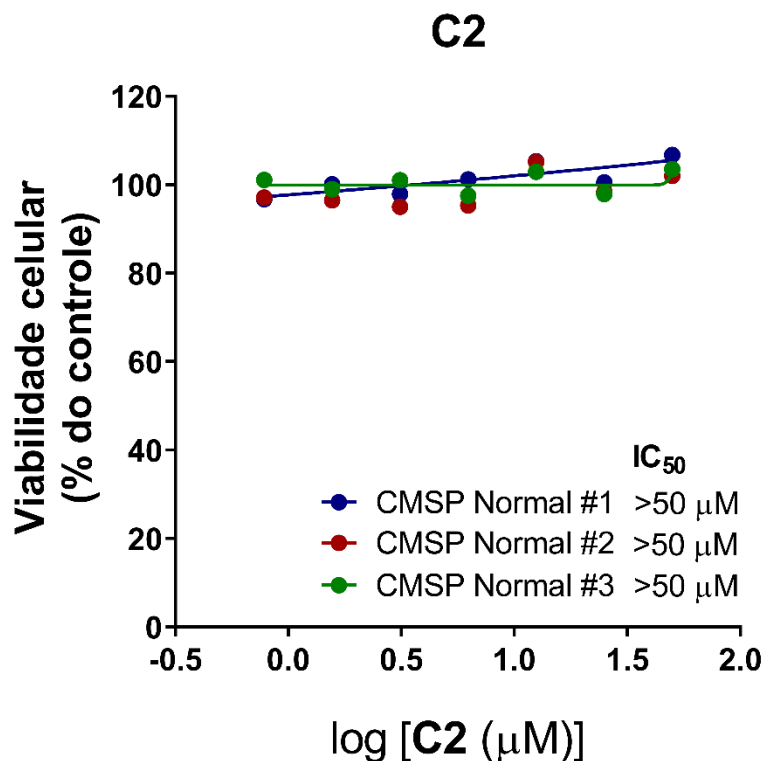
(A) Os ciclopenta[β]indóis sintéticos foram arbitrariamente nomeados como compostos 1 (peso molecular: 397,43), 2 (peso molecular: 351,36) e 3 (peso molecular: 365,39), e suas estruturas químicas moleculares são ilustradas. (B) Curvas dose-resposta determinadas por ensaio de metiltiazoltetrazólio (MTT) para os compostos 1, 2 e 3 (0,8–50 μ M) após 72 h de exposição em células NB4 e NB4-R2. Os valores de IC₅₀ de cada composto são mostrados. (C) O gráfico de barras representa as respostas à dose e ao tempo para o composto 2 (0,8–12,5 μ M) após 24, 48 e 72 horas de exposição nas células NB4 e NB4-R2. Os valores foram expressos como uma percentagem de células tratadas com DMSO ($\emptyset$). Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP. de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de p e linhagens celulares são mostrados nos gráficos: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 para células tratadas com composto 2 em comparação com células tratadas com DMSO ($\emptyset$); ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 22. Curvas dose-resposta para colchicina após 72 h de exposição em células NB4 e NB4-R2



Os valores de IC₅₀ de cada composto são mostrados. Os gráficos de barras representam as respostas à dose e ao tempo para colchicina (0,2 - 1000 nM) após 24, 48 e 72 h de exposição em células NB4 e NB4-R2. Os valores foram expressos como uma porcentagem de células tratadas com DMSO (Ø). Os resultados são apresentados como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de *p* e linhagens celulares são mostrados nos gráficos: ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 para células tratadas com colchicina em comparação com células tratadas com DMSO (Ø); ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 23. O C2 não afeta a viabilidade celular de leucócitos normais

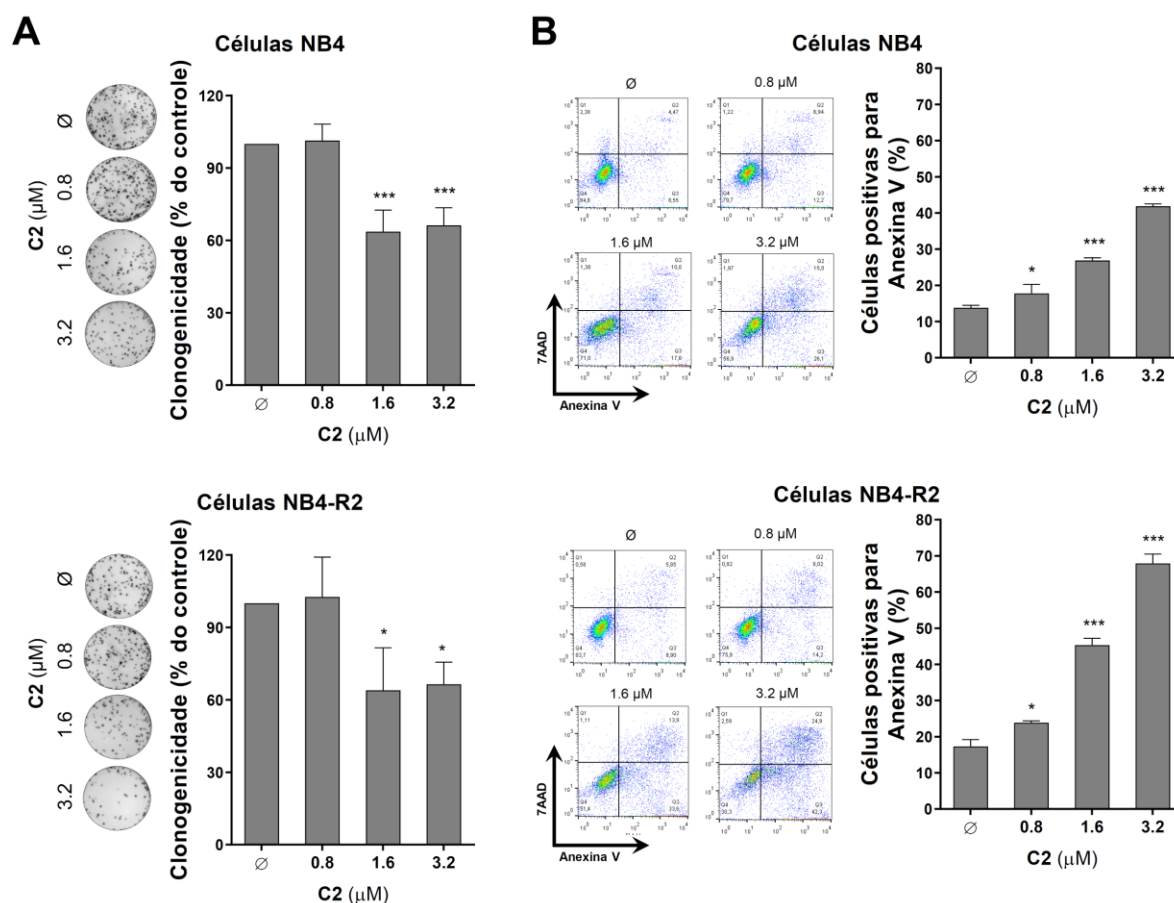


Curvas de dose-resposta determinadas por ensaio de metiltiazoltetrazólio (MTT) para o composto 2 (0,8 - 50 μM) após 72 horas de exposição em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de três doadores saudáveis. Os valores foram expressos como uma porcentagem de células tratadas com DMSO (Ø). Observe que nas concentrações testadas, os IC₅₀ não foram alcançados (IC₅₀ > 50 μM) em leucócitos normais.

4.6. C2 reduz o crescimento clonal autônomo e promove apoptose e parada do ciclo celular em células NB4 e NB4-R2

Em seguida, para definir os eventos celulares envolvidos na redução da viabilidade celular após o tratamento com C2, foram realizados múltiplos ensaios celulares. A exposição prolongada ao C2 diminuiu fortemente o crescimento clonal autônomo em ambas as linhagens celulares de LPA (**Figura 24A**). Em células NB4 e NB4-R2, 48 horas de exposição ao C2 induziram níveis significativos de apoptose ($p < 0,05$, **Figura 24B**).

Figura 24. O C2 inibe o crescimento clonal autônomo e induz a apoptose em células NB4 e NB4-R2

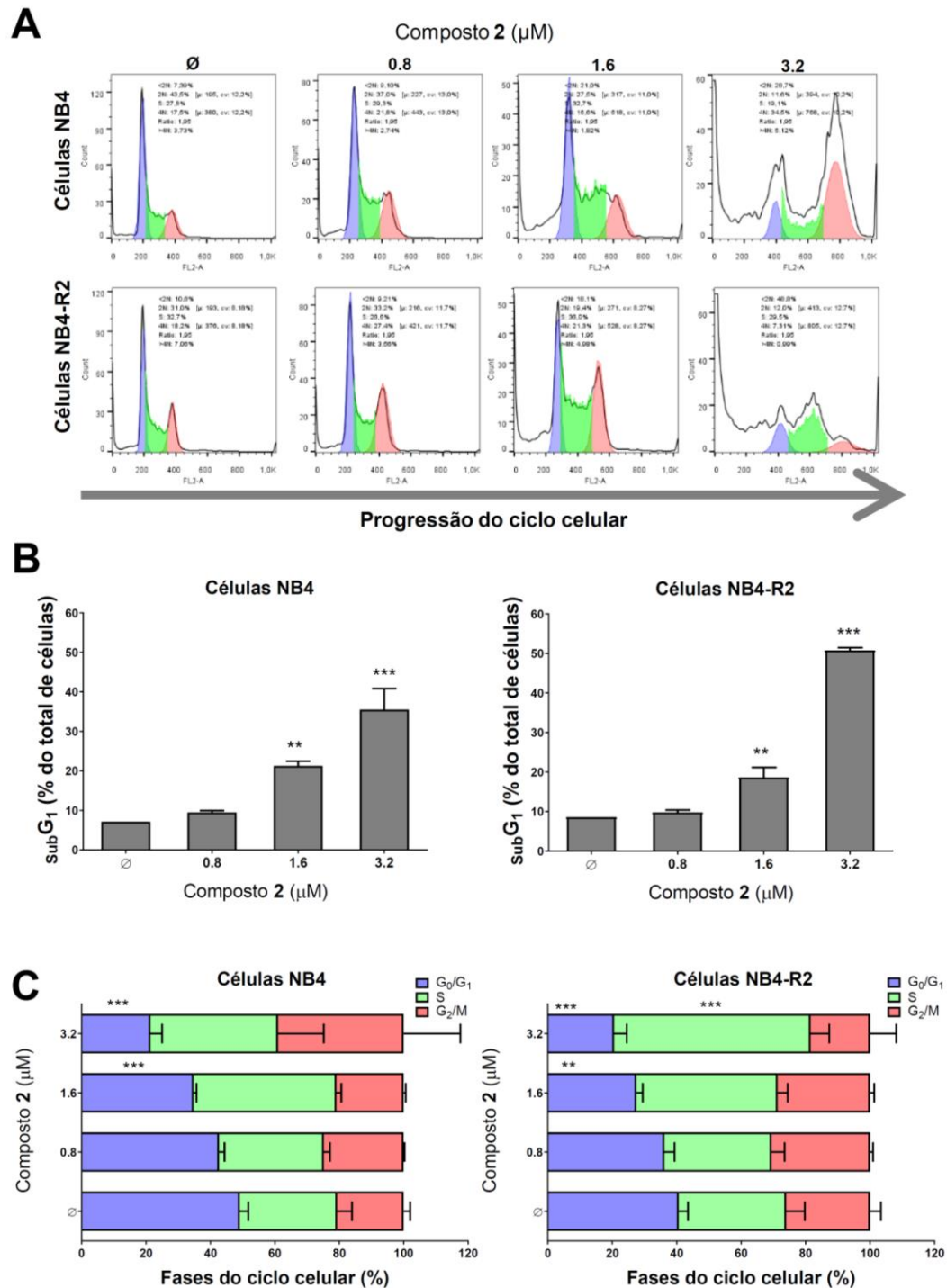


(A) Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de cultura de células NB4 e NB4-R2 tratadas com composto 2 (0,8, 1,6, 3,2 μM) por 24 h e normalizadas para os controles correspondentes tratados com DMSO ($\emptyset$). Imagens de colônias são mostradas para um experimento e os gráficos de barras mostram a média $\pm$ DP. de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; Pós-teste ANOVA e Bonferroni. (B) A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células NB4 e NB4-R2 tratadas com concentrações graduadas do composto 2 (0,8, 1,6 e 3,6 μM) durante 48 h utilizando um método de coloração com anexina V/7AAD. Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes

superior e inferior direito (Q2 mais Q3) contêm cumulativamente a população apoptótica (células de anexina V+). Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP. de pelo menos quatro experimentos independentes quantificando a morte celular por apoptose. Os valores de p e linhagens celulares estão indicados nos gráficos; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ para células tratadas com composto 2 em comparação com células tratadas com DMSO ($\emptyset$); ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

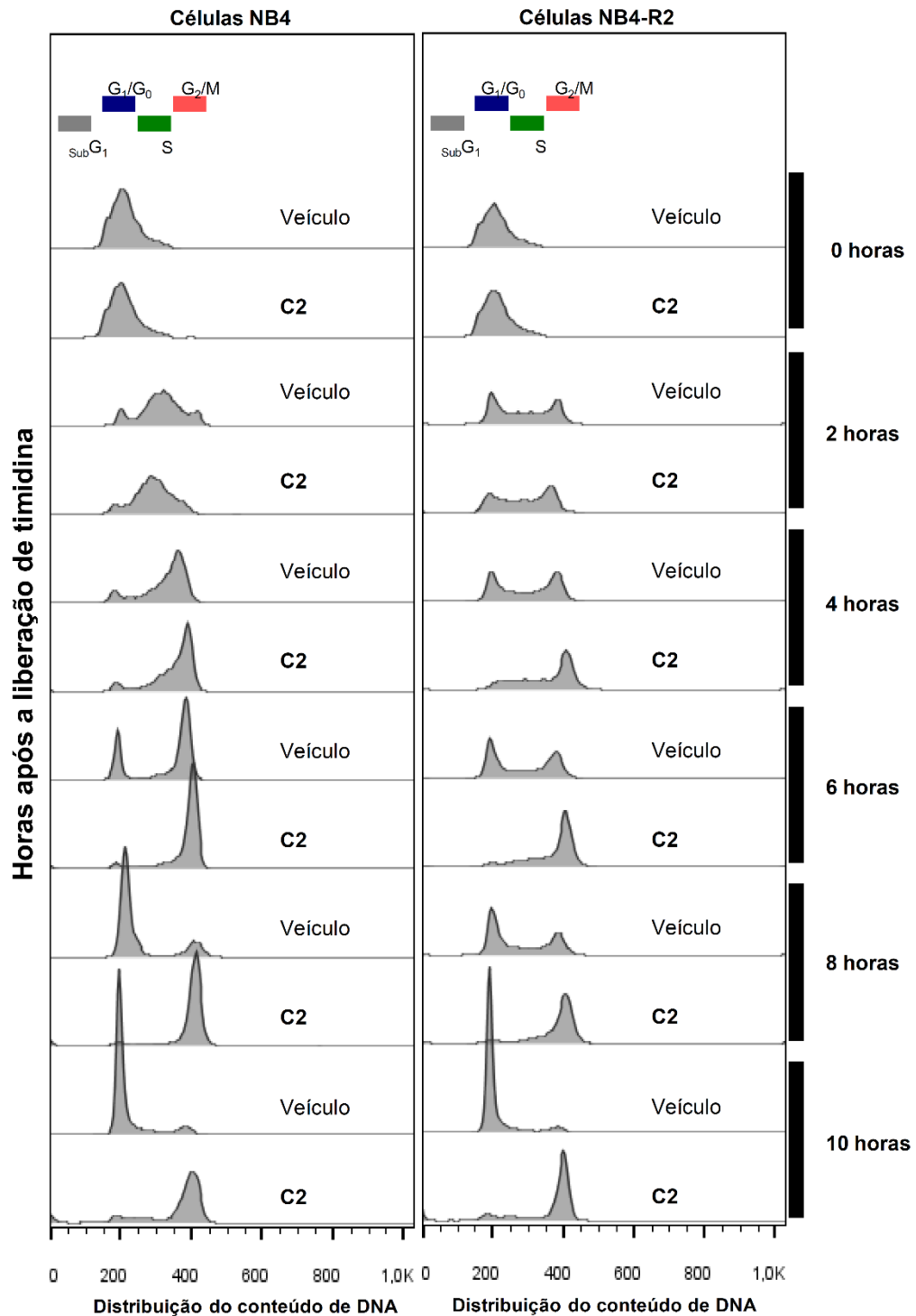
Na análise do ciclo celular, foi observado um aumento significativo de células em subG₁ em NB4 e NB4-R2 após o tratamento com C2, o que corrobora os achados de apoptose (todos $p < 0,05$, **Figura 25A-B**). Além disso, foi observada uma redução significativa, de maneira dependente da concentração, de células em G₀/G₁ ($p < 0,05$), indicando um acúmulo de células nas fases S e G₂/M e falha na progressão do ciclo celular (**Figura 25C**). Devido à grande proporção de células em subG₁ após o tratamento por 24 horas com C2, que impacta a distribuição das outras fases do ciclo celular, as células NB4 e NB4-R2 foram sincronizadas com bloqueio duplo de timidina e o impacto do C2 foi avaliado durante a progressão inicial do ciclo celular. Notavelmente, o C2 induz uma forte parada do ciclo celular em G₂/M a partir de 6 horas de tratamento (**Figura 26 e Figura 27**).

Figura 25. O C2 leva à parada do ciclo celular nas fases S e G₂/M em células de leucemia aguda



(A) As fases do ciclo celular foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA através de coloração com iodeto de propídio e citometria de fluxo em células NB4 ou NB4-R2 tratadas com composto 2 (0,8, 1,6 ou 3,2 μM) ou veículo por 48 h. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado. (B) O gráfico de barras representa a média ± DP. das porcentagens de células em subG₁ de pelo menos três experiências independentes. (C) A média ± DP das distribuições celulares que estão nas fases G₀/G₁, S e G₂/M do ciclo celular (excluindo subG₁) de pelo menos três experimentos independentes são representadas no gráfico de barras. Os valores de *p* e linhas celulares estão indicados nos gráficos; **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 para células tratadas com DMSO (∅) vs. composto 2; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 26. O C2 induz forte parada do ciclo celular nas fases G_2/M em células de leucemia aguda

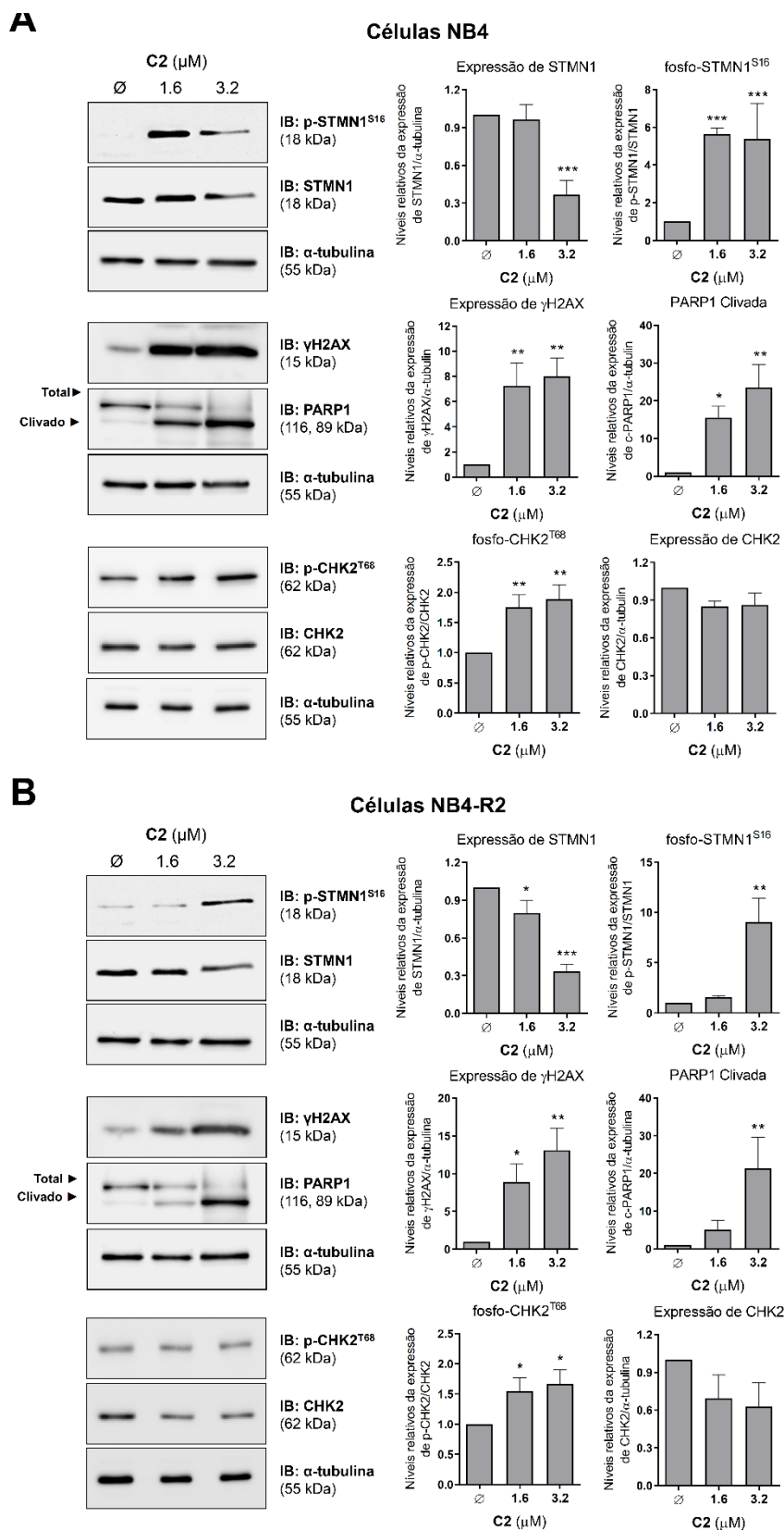


As células NB4 e NB4-R2 foram sincronizadas por um bloqueio duplo de timidina. Após a liberação da timidina, as células foram tratadas com veículo ou composto 2 ($3,2\ \mu M$), coletadas a cada 2 h (cinco momentos) e a distribuição do conteúdo de DNA foi avaliada por FACS conforme indicado.

4.7. C2 reduz a expressão/atividade de STMN1 e induz a apoptose e marcadores de dano ao DNA em células NB4 e NB4-R2

Na análise molecular, a expressão de STMN1 e sua forma inativa (fosfo-STMN1^{S16}) (marcador de proliferação), γ H2AX e CHK2 (marcadores de dano ao DNA) e PARP1 clivado (marcador de apoptose) foram investigados por Western blot, e um painel de 14 genes relacionados ao dano ao DNA (BAX, BBC3, CDKN1A, CDKN1B, ERCC1, GADD45A, MSH3, PCNA, PMAIP1, RNF168, RNF8, RPA1, XPC e XRCC3) foi investigado por PCR quantitativo. Maiores concentrações de C2 reduzem significativamente a expressão de STMN1 e aumentam a fosforilação de STMN1, bem como induzem a fosforilação de H2AX e CHK2, além da clivagem de PARP1 em ambas as linhagens de leucemia mieloide aguda (todos $p < 0,05$) (**Figura 27**). Entre os genes relacionados ao dano ao DNA investigados, 4 de 14 (CDKN1A, PMAIP1, GADD45A e XRCC3) foram significativamente modulados pelo C2 em células NB4 e NB4-R2 (todos $p < 0,05$, **Figura 28 e Tabela 6**).

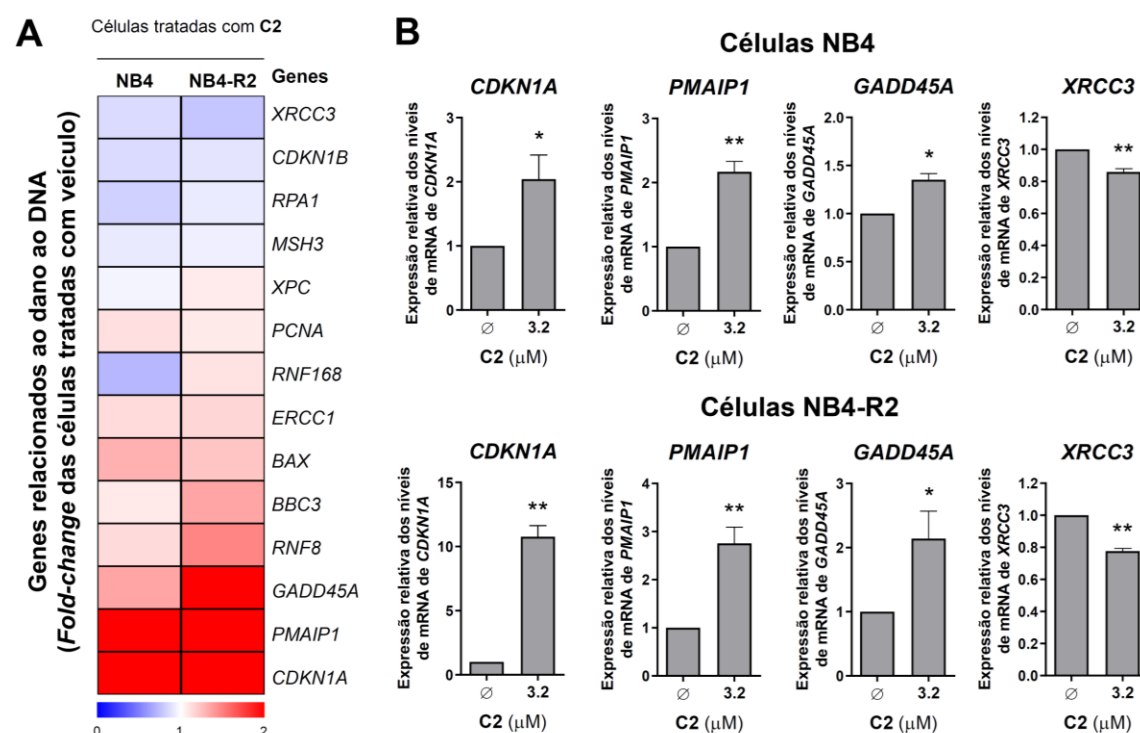
Figura 27. O C2 induz marcadores moleculares de danos no DNA e apoptose em células NB4 e NB4-R2



(A) Análise de Western blot para níveis de fosfo (p)-Stathmin 1^{S16}, STMN1, γH2AX, p-CHK2^{T68}, CHK2 e PARP1 (total e clivado) em extratos celulares totais de células NB4 e NB4-R2 tratadas com composto 2 (0,8, 1,6 ou 3,2 μM) ou veículo por 48 h. As membranas foram incubadas com os

anticorpos indicados e desenvolvidas com o sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate e Gel Doc XR+. **(B)** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP. de três experimentos independentes quantificando intensidades de bandas de proteínas indicadas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Observe que o tratamento com composto 2 induz a fosforilação de Stathmin 1 no sítio da serina 16 (um sítio inibitório), fosforilação de H2AX na serina 139 e CHK2 na treonina 68 (marcadores de dano ao DNA) e clivagem de PARP1 (um marcador de apoptose) em células NB4 e NB4-R2.

Figura 28. O C2 modula CDKN1A, PMAIP1, GADD45A e XRCC3 em células NB4 e NB4-R2



(A) O mapa de calor ilustra a análise quantitativa por RT-PCR dos genes relacionados a danos no DNA em células NB4 e NB4-R2 após tratamento com composto 2 (3,2 μ M; média; $n = 3$) por 48 h. Os dados são representados como *fold-change* de células tratadas com veículo, genes regulados negativamente e positivamente são dados em azul e vermelho, respectivamente. **(B)** O gráfico de barras representa a média $\pm$ DP do *fold-change* de células tratadas com veículo para CDKN1A, PMAIP1, GADD45A e XRCC3 em células NB4 e NB4-R2 após exposição ao composto 2 (3,2 μ M; média; $n = 3$) por 48 h. Os valores de p e linhagens celulares estão indicados nos gráficos; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste t de student.

Tabela 6. Genes relacionados a danos no DNA modulados pelo Composto 2.

Genes	Células NB4 tratadas com C2			Células NB4-R2 tratadas com C2		
	Fold-change ¹	S.D.	p ²	Fold-change ¹	S.D.	p ²
<i>XRCC3</i>	0.86	0.02	p<0.01	0.78	0.02	p<0.01
<i>CDKN1B</i>	0.86	0.10	n.s.	0.89	0.11	n.s.
<i>RPA1</i>	0.82	0.04	p<0.05	0.92	0.28	n.s.
<i>MSH3</i>	0.92	0.04	n.s.	0.94	0.15	n.s.
<i>XPC</i>	0.96	0.09	n.s.	1.08	0.07	n.s.
<i>PCNA</i>	1.13	0.06	n.s.	1.08	0.06	n.s.
<i>RNF168</i>	0.72	0.14	n.s.	1.11	0.13	n.s.
<i>ERCC1</i>	1.14	0.09	n.s.	1.16	0.06	n.s.
<i>BAX</i>	1.31	0.11	p<0.05	1.23	0.10	n.s.
<i>BBC3</i>	1.09	0.16	n.s.	1.35	0.28	n.s.
<i>RNF8</i>	1.15	0.24	n.s.	1.48	0.11	p<0.05
<i>GADD45A</i>	1.35	0.06	p<0.05	2.14	0.43	p<0.05
<i>PMAIP1</i>	2.17	0.16	p<0.01	2.75	0.34	p<0.01
<i>CDKN1A</i>	2.04	0.38	p<0.05	10.77	0.86	p<0.01

Abreviação: D.P., desvio padrão; n.s., não é significativo

¹Fold-change das células tratadas com veículo.

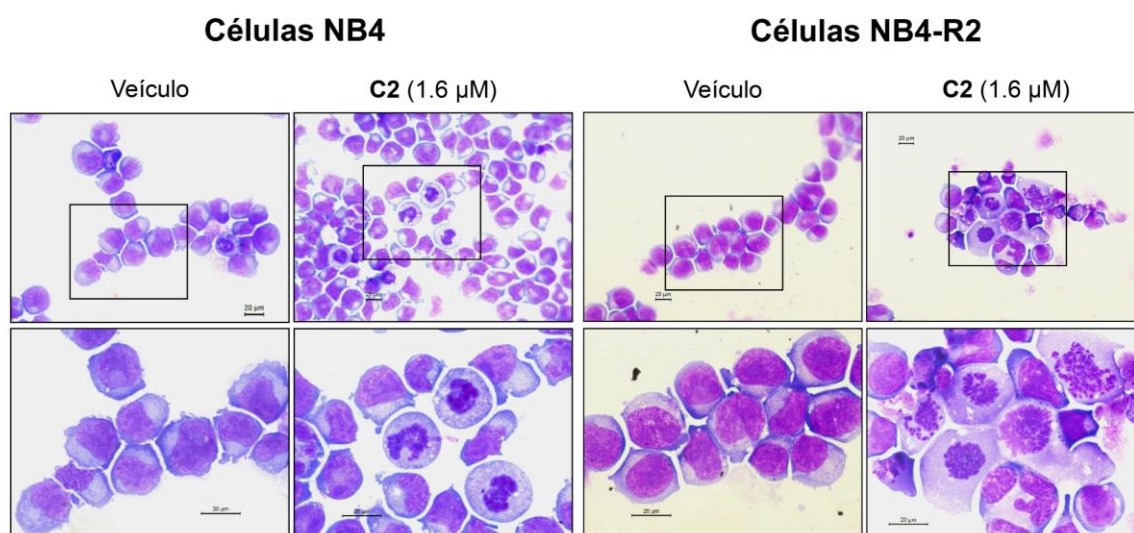
²Teste *t* de Student.

4.8. C2 causa instabilidade dos microtúbulos e gera aberrações mitóticas em células NB4 e NB4-R2

As células NB4 e NB4-R2 coradas com solução corante Rosenfeld analisadas por microscopia óptica mostraram uma alta frequência de aberrações mitóticas após o tratamento com 1,6 µM do C2 por 48 horas (**Figura 29**). Uma vez que C2 induz forte parada em G₂/M após 6 horas da liberação de timidina em células NB4 e NB4-R2 sincronizadas, avaliamos a morfologia nuclear e de microtúbulos por imunofluorescência neste ponto do tempo. Em células NB4 e NB4-R2, o C2 induziu uma coloração difusa de tubulina, indicando instabilidade dos microtúbulos. Além disso, foram observadas células com cromossomos condensados ou núcleos grandes, indicando falha na conclusão da mitose, o que corrobora os dados obtidos na citometria de fluxo (**Figura 30**). A análise quantitativa dos dados confirma que 6 horas após a liberação do bloqueio de timidina, as células tratadas com veículo apresentam uma proporção maior em interfase (G₀/G₁), o que indica a capacidade dessas células de completar a mitose. Em contraste, a proporção de células tratadas com o C2 com núcleos grandes ou fusos mitóticos aberrantes aumentou significativamente ($p < 0,05$; **Figura 30**). Adicionalmente, o ensaio de polimerização intracelular de microtúbulos revela que o tratamento com C2 resulta na diminuição da

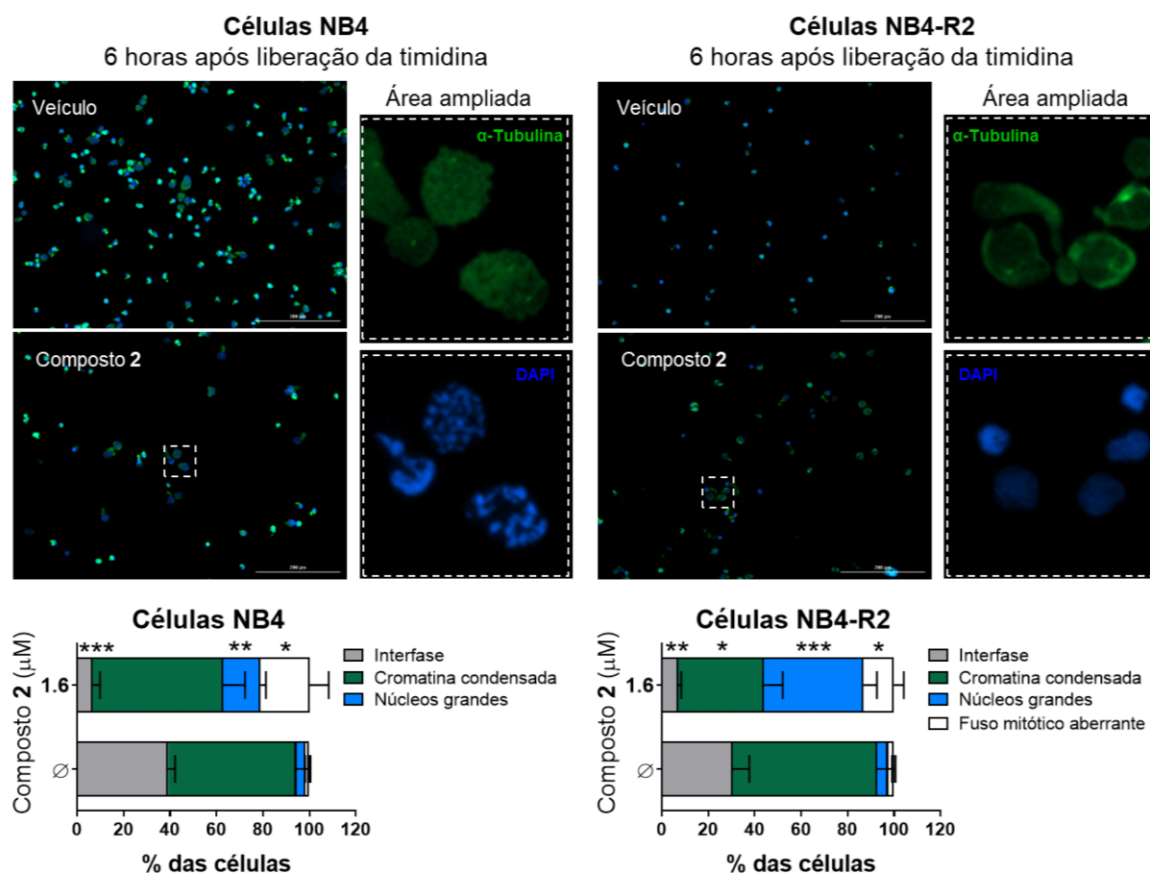
polimerização dos mesmos (**Figura 31**). Na análise de docking, foram observadas duas interações principais para o C2 e o sítio de colchicina da tubulina: uma com o átomo de oxigênio sp² do grupo carboxila e outra com um átomo de oxigênio sp³ do anel de cinco membros de dioxolano, indicando que C2 tem interações mais eficientes do que C1 e C3 no sítio de colchicina da tubulina (**Figura 32**).

Figura 29. O tratamento com C2 gera mitoses aberrantes e instabilidade de microtúbulos em linhagens celulares de leucemia



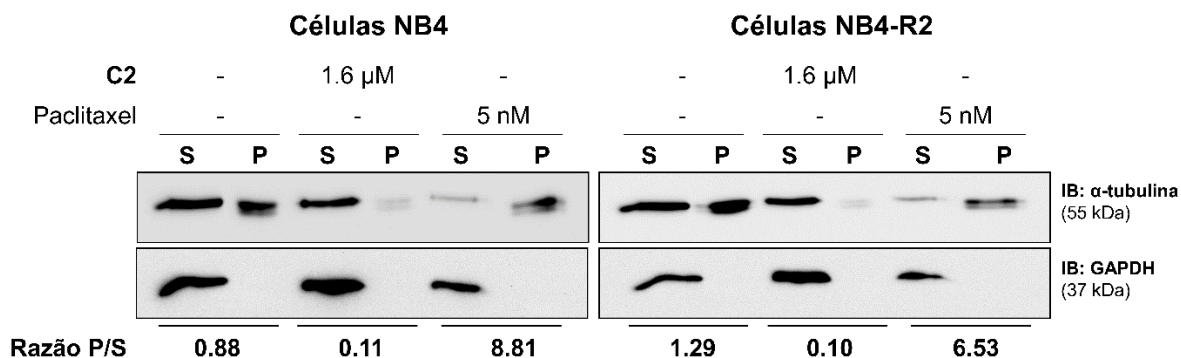
As células NB4 e NB4-R2 foram tratadas com veículo ou composto 2 (1,6 µM) por 48 h, fixadas e coradas com solução corante Rosenfeld. Imagens com ampliação de 400 × e 1000 × são ilustradas.

Figura 30. O tratamento com C2 induz instabilidade dos microtúbulos e falha na mitose completa nas linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda



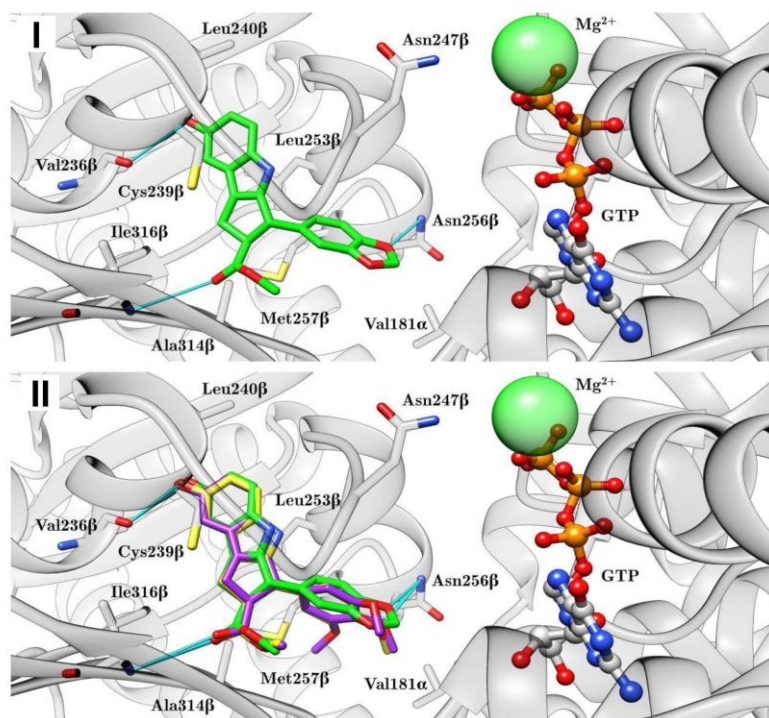
A morfologia nuclear e dos microtúbulos foi avaliada por análise de imunofluorescência em células NB4 e NB4-R2 sincronizadas tratadas com veículo ou composto 2 após 6 horas de liberação de timidina. A área ampliada exibe detalhes das células NB4 ou NB4-R2 tratadas com composto 2, α -tubulina (verde) e DAPI (azul). Barras de escala são mostradas na figura (200 μ m). Os gráficos de barras representam a média $\pm$ D.P da proporção de células NB4 ou NB4-R2 tratadas com veículo ou composto 2 de três experimentos independentes (pelo menos 150 células por condição), que foram classificados de acordo com a morfologia em interfase, células com núcleo condensado (mitose), núcleos grandes ou com fuso mitótico aberrante. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Teste t de Student.

Figura 31. O tratamento com C2 reduz a polimerização dos microtúbulos em linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda



As células NB4 e NB4-R2 foram tratadas com veículo ou composto 2 (1,6 μ M) por 48 h e submetidas à extração das frações celulares solúveis (S) e precipitadas (P) e Western blot. A tubulina livre está presente na fração S, enquanto a tubulina polimerizada está presente na fração P. A expressão de GAPDH, que está presente apenas na fração S, foi utilizada para verificar a eficiência do fracionamento. O paclitaxel foi utilizado como controle para a polimerização de microtúbulos. A proporção de α -tubulina presente nas frações S e P é descrita. As membranas foram incubadas com os anticorpos indicados e desenvolvidas com o sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate e Gel Doc XR+.

Figura 32. Docking molecular e principais interações do C2 ao sítio da colchicina da tubulina

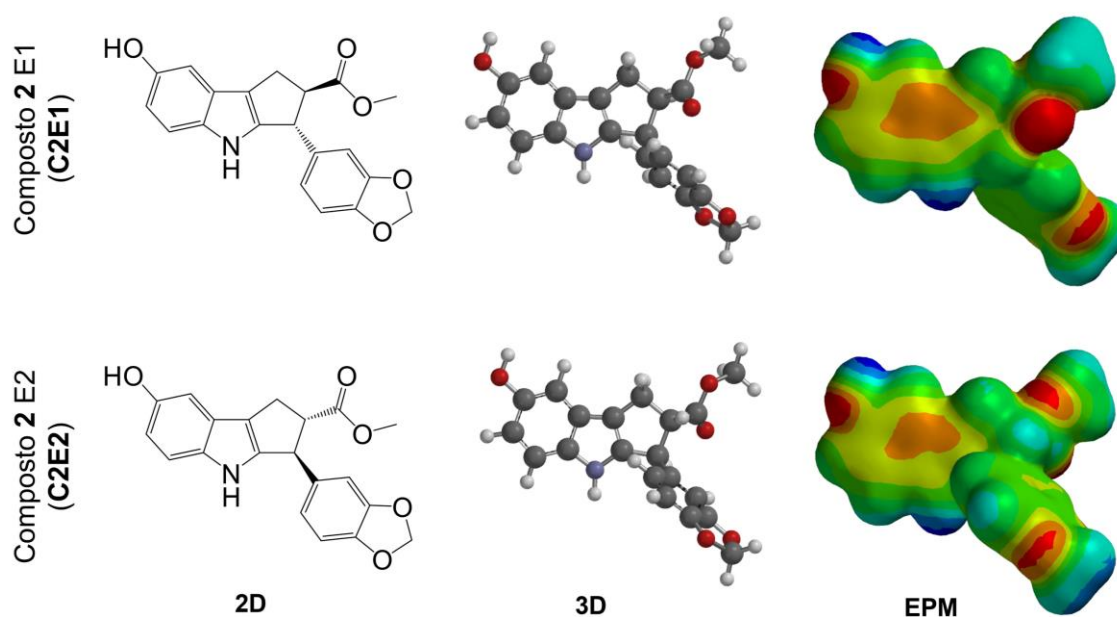


Proposta de conformação da interação composto 2 (painel I) no sítio de ligação da colchicina da tubulina comparada com as interações dos compostos 1 e 3 (painel II), realizada pelo software GOLD 5.1.

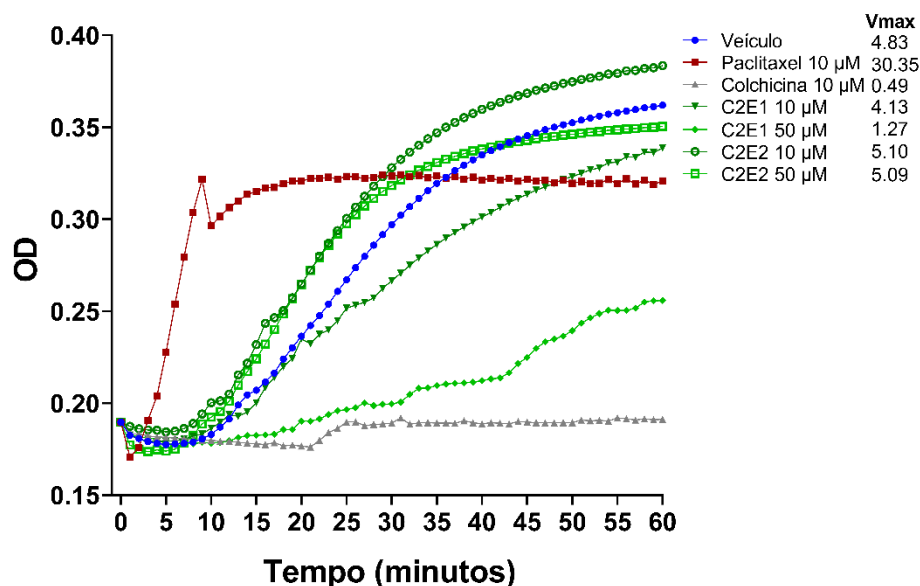
4.9. C2E1 exibe potente atividade de despolimerização de tubulina

Após a descoberta do mecanismo de ação de C2, derivado dos ciclopenta[β]indóis, e dos seus efeitos citotóxicos seletivos para células de LPA, o estudo dos efeitos deste composto foi expandido para uma vasta gama de linhagens celulares de neoplasias hematológicas. Foram objetos de estudo dois enantiômeros de C2, denominados de E1 e E2; sendo que E1 trata-se do composto 2 (C2) original estudado previamente (as estruturas químicas de C2E1 e C2E2 estão representadas na **Figura 33**). Para dar início às avaliações, no intuito de avaliar a capacidade dos enantiômeros C2E1 e C2E2 de despolarizar a tubulina, foi realizada uma análise de polimerização de tubulina. As curvas de polimerização de tubulina revelaram que C2E1, mas não C2E2, prejudica a polimerização de microtúbulos nas concentrações testadas (10 e 50 μM) (**Figura 34**). As simulações de acoplamento molecular indicaram que a porção indol-7-ol de C2E1 apresenta uma sobreposição maior com a região de ancoragem do anel A da colchicina, enquanto essa região em C2E2 tem apenas uma sobreposição marginal. Devido aos diferentes modos de ligação de C2E1 e C2E2, é possível observar que a distância dessas moléculas do local de ligação do GTP é consideravelmente diferente (5,6Å para C2E2 e 3,1Å para C2E1) (**Figura 35**).

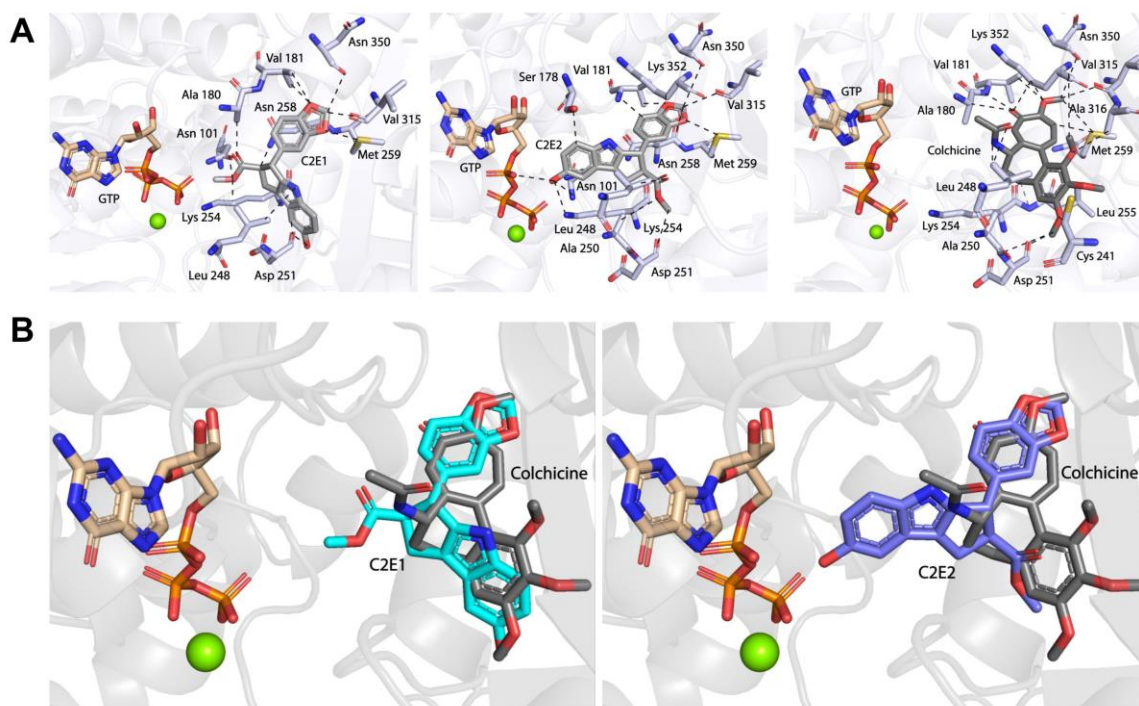
Figura 33. Estruturas químicas dos enantiômeros C2E1 e C2E2



Mapa de potencial bidimensional, tridimensional e eletrostático (EPM) para estruturas químicas de C2E1 e C2E2.

Figura 34. Impacto dos compostos C2E1 e C2E2 na polimerização da tubulina

Curvas de polimerização da tubulina na presença de veículo, agente polimerizante (paclitaxel a 10 µM) e agente despolimerizante (colchicina a 10 µM) e C2E1 ou C2E2 (10 µM e 50 µM). A V_{máx} (velocidade máxima) para curvas cinéticas é indicada.

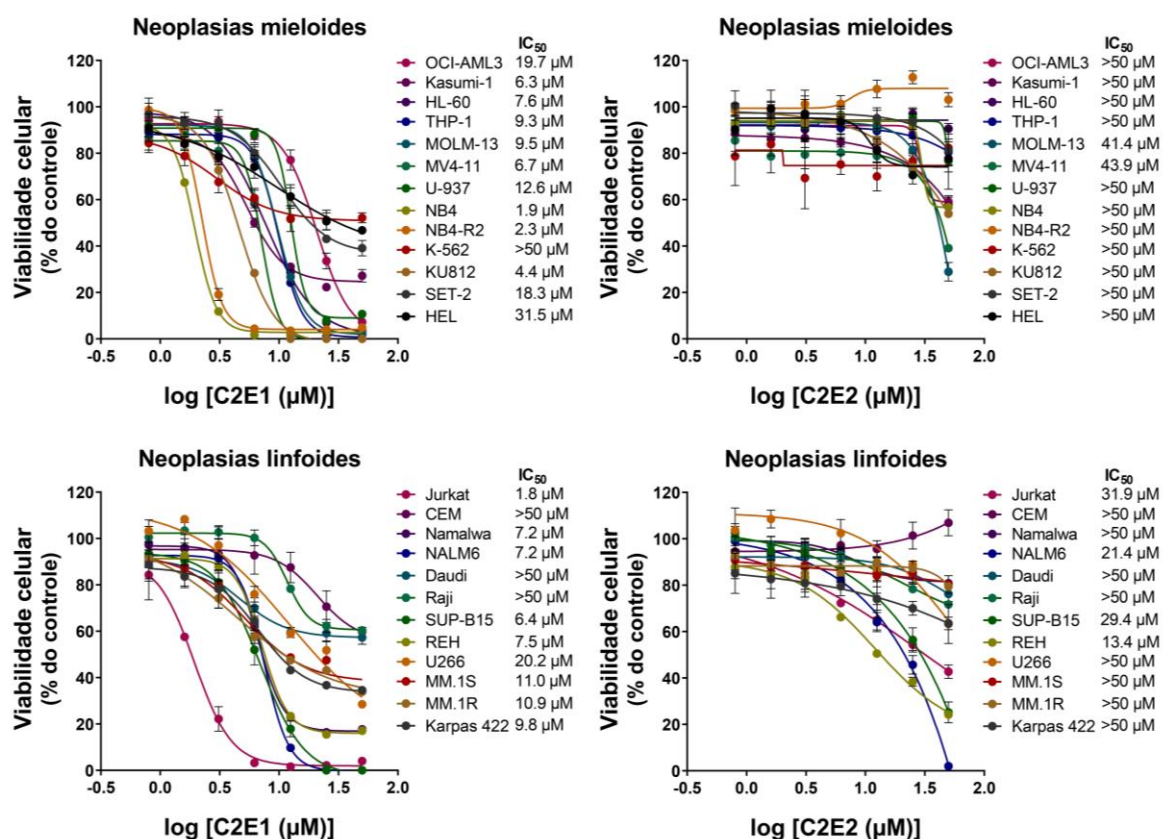
Figura 35. Docking molecular da simulação de acoplamento molecular para C2E1 e C2E2

(A) Docking molecular de C2E1 e C2E2 no sítio de ligação da colchicina na tubulina. **(B)** Análise de redocking molecular e docking molecular para colchicina, C2E1 e C2E1, utilizando cadeias de tubulina A e B como receptor (PDB:4O2B) mostrando diferenças significativas na região de ancoragem do anel de colchicina.

4.10. C2E1 reduz a viabilidade celular de um amplo painel de linhagens celulares de neoplasias hematológicas

Inicialmente, avaliamos a atividade citotóxica de C2E1 e C2E2 em um amplo painel de linhagens celulares neoplásicas mieloides e linfoides. C2E1 exibiu atividade citotóxica na faixa de micromolar (valores de IC_{50} variando de 1,8 a 31,5 μM), com apenas 4 de 25 linhagens celulares sendo consideradas resistentes ($IC_{50} > 50 \mu M$). Em contrapartida, o enantiômero C2E2 mostrou atividade citotóxica limitada nos modelos celulares testados, com 19 de 25 linhagens celulares consideradas resistentes (**Figura 36**). Portanto, apenas C2E1 foi utilizado em ensaios subsequentes, e as células selecionadas para análises detalhadas foram Kasumi-1, MV4-11, Jurkat e Namalwa. Nestas células de leucemia aguda, C2E1 demonstrou atividade citotóxica dependente da concentração e do tempo (**Figura 37**).

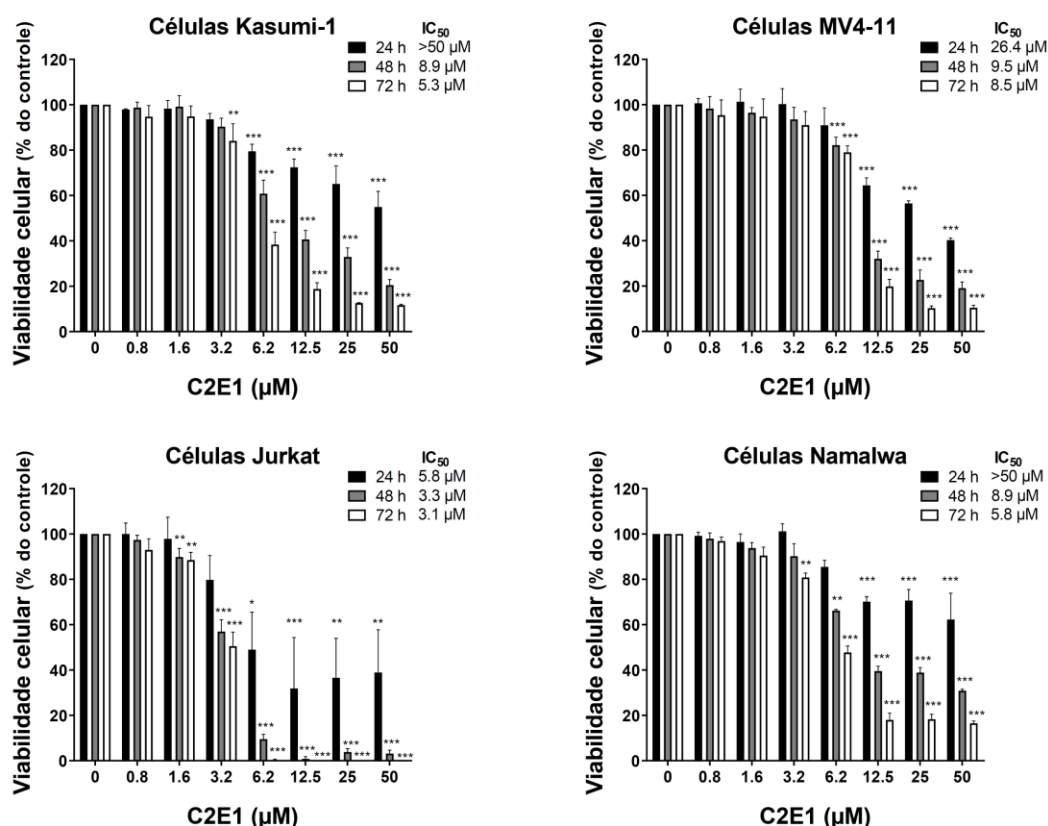
Figura 36. C2E1 reduz a viabilidade celular de um amplo painel de células neoplásicas hematológicas



As curvas dose-resposta foram analisadas utilizando o ensaio de metiltiazoltetrazólio (MTT) em um painel de células neoplásicas mieloides e linfoides expostas a concentrações crescentes de C2E1 e

C2E2 (0,8 - 50 μM) por 72 horas. Notavelmente, o efeito citotóxico do enantiômero C2E1 é significativamente maior que o do C2E2.

Figura 37. C2E1 reduz a viabilidade celular e exibe atividade citotóxica dependente da concentração e do tempo



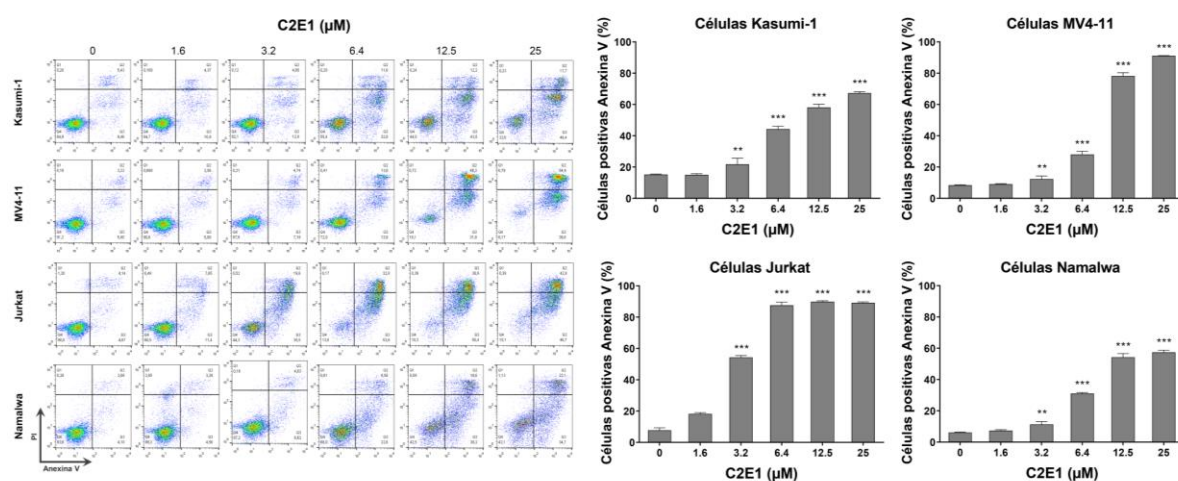
Os gráficos de barras representam a concentração e as respostas dependentes do tempo ao C2E1 (0,8 - 50 μM) após 24, 48 e 72 horas de exposição em células Kasumi-1, MV4-11, Jurkat e Namalwa. Os valores são expressos como a porcentagem de células viáveis para cada condição *versus* células tratadas com veículo. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de p e linhagens celulares estão indicados nos gráficos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.11. C2E1 induz morte celular e causa parada do ciclo celular em células de leucemia aguda

Após analisar a citotoxicidade do composto, observamos que a exposição ao C2E1 por 48 horas induziu níveis significativos de apoptose nas células Kasumi-1, MV4-11, Jurkat e Namalwa (**Figura 38**). Além disso, na análise do ciclo celular, foi observado um aumento significativo de células em subG1 nas células Kasumi-1, MV4-

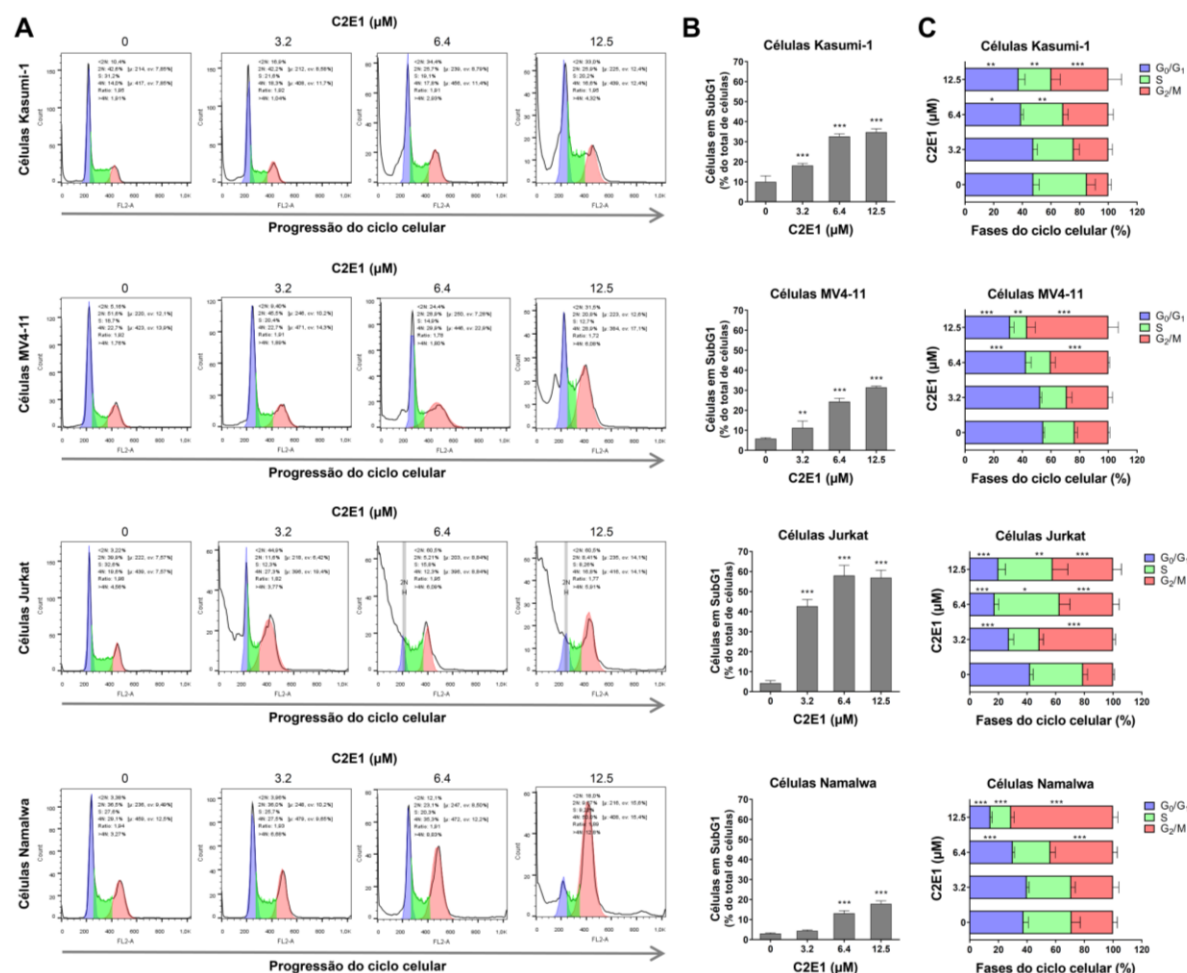
11, Jurkat e Namalwa após a exposição ao C2E1, corroborando os achados de apoptose (**Figura 39A-B**). Nessa análise, foi observada uma redução significativa de células em G₀/G₁ de maneira dependente da concentração, indicando um acúmulo de células nas fases S e G₂/M (**Figura 39C**). Análises morfológicas indicaram uma alta frequência de aberrações mitóticas em células tratadas com C2E1, corroborando ainda mais a falha na progressão do ciclo celular (**Figura 40**).

Figura 38. C2E1 induz morte celular em células de leucemia mieloide e linfóide aguda



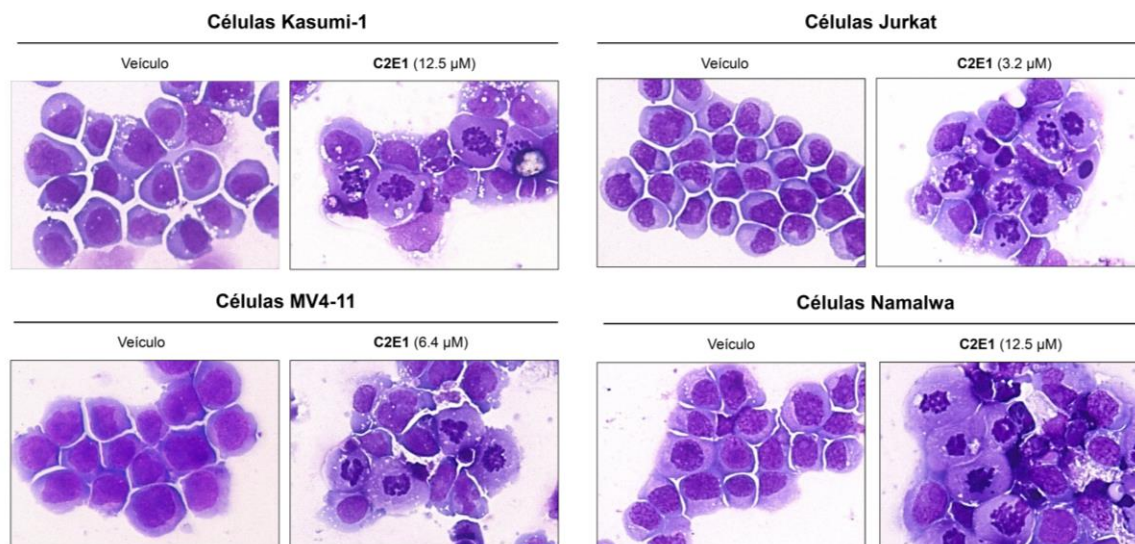
(A) A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células Kasumi-1, MV4-11, Jurkat e Namalwa tratadas com concentrações crescentes de Composto 2 E1 (1,6; 3,2; 6,4; 12,5 e 25 µM) durante 48 horas usando marcação com anexina V/iodeto de propídio (PI). Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes superior e inferior direito (Q2 + Q3) contêm cumulativamente a população de morte celular (células de anexina V+). **(B)** Os gráficos de barras representam a média ± DP de pelo menos quatro experimentos independentes que quantificam a morte celular. Os valores de *p* e linhagens celulares estão indicados nos gráficos; **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,0001; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 39. C2E1 desencadeia a parada do ciclo celular nas fases G₂/M em células de leucemia aguda



(A) As fases do ciclo celular foram determinadas analisando o conteúdo de DNA através da marcação com iodeto de propídio e citometria de fluxo nas células indicadas tratadas com veículo ou C2E1 (3,2, 6,4 ou 12,5 μM) por 48 horas. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado. **(B)** O gráfico de barras verticais representa a média ± DP das porcentagens de células em subG1 de pelo menos três experiências independentes. **(C)** A média ± DP das distribuições celulares nas fases G₀/G₁, S e G₂/M do ciclo celular (excluindo SubG₁) de pelo menos três experimentos independentes são plotadas em gráficos de barras horizontais. Os valores de *p* e linhas celulares estão indicados nos gráficos. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

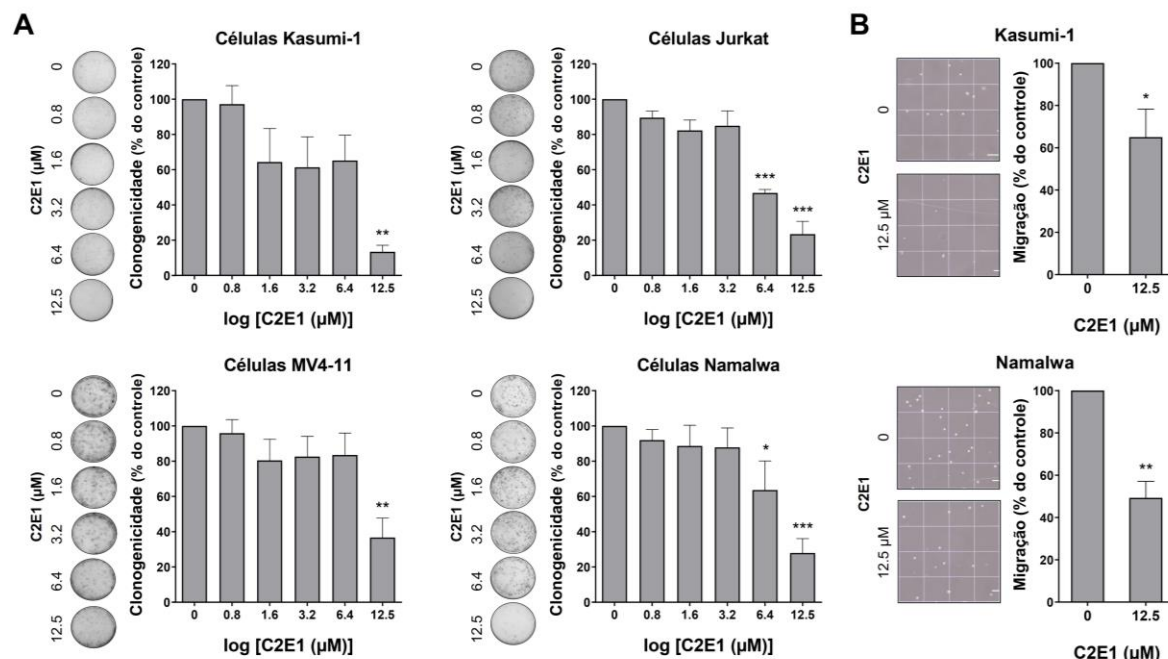
Figura 40. C2E1 induz mitoses aberrantes em células de leucemia aguda



Células Kasumi-1, MV4-11, Jurkat e Namalwa foram tratadas com veículo ou C2E1 por 48 horas, fixadas e coradas com corante de Rosenfeld. Imagens com ampliação de 400 $\times$ e 1000 $\times$ são exibidas.

4.12. C2E1 reduz a clonogenicidade e a migração celular leucêmica

A exposição prolongada ao C2E1 reduziu significativamente o crescimento clonal autônomo nas células Kasumi-1, MV4-11, Jurkat e Namalwa (**Figura 41A**). Além disso, o tratamento breve com C2E1 reduziu a migração celular induzida por CXCL12 nas células Kasumi-1 e Namalwa (**Figura 41B**).

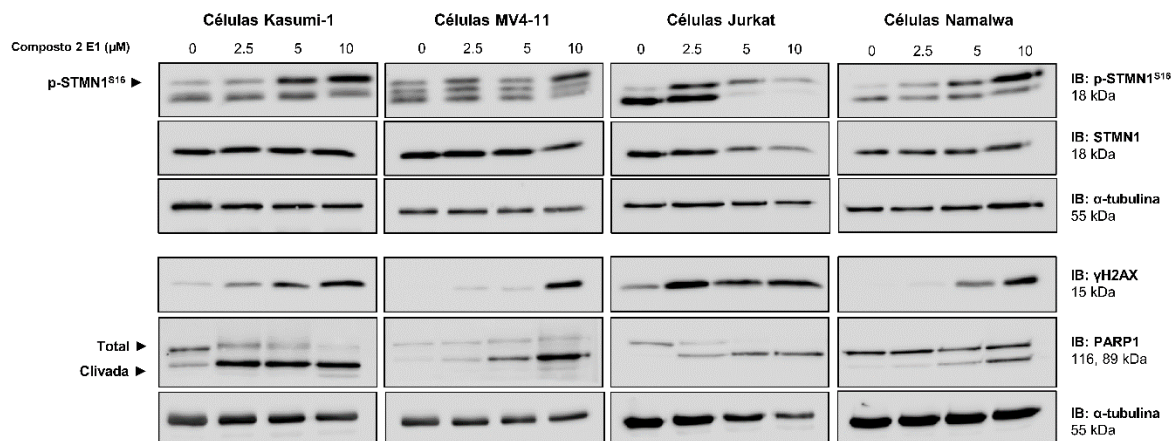
Figura 41. C2E1 reduz o potencial clonogênico e a migração de células leucêmicas

(A) Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição do reagente MTT após 8 dias de cultura celular na presença de veículo ou C2E1 (0,8, 1,6, 3,2, 6,4 e 12,5 μM). Imagens de colônias são mostradas para um experimento, e gráficos de barras representam a média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$; Teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. **(B)** As células Kasumi-1 e Namalwa foram expostas ao veículo ou C2E1 (12,5 μM) e deixadas migrar durante 16 h na presença de 100 ng/ml de CXCL12 na câmara inferior das placas *transwell*. As imagens representam a contagem de células em uma câmara de Neubauer que migrou, e os gráficos de barras mostram a média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Teste *t* de Student.

4.13. C2E1 induz marcadores moleculares de dano ao DNA e apoptose em células de leucemia mieloide e linfóide

No cenário molecular, os níveis de expressão de proteínas consideradas marcadores de proliferação (STMN1 e p-STMN1^{S16}), dano ao DNA (γH2AX) e apoptose (PARP1 clivado) foram avaliados. Após o tratamento com C2E1, uma baixa concentração induziu a fosforilação de STMN1, enquanto em altas concentrações, a expressão de STMN1 mostrou uma tendência para regulação negativa. Além disso, a exposição ao C2E1 induziu significativamente a expressão de γH2AX e a clivagem de PARP1 em todas as linhagens celulares analisadas (**Figura 42**).

Figura 42. C2E1 induz marcadores moleculares de dano ao DNA e apoptose em células de leucemia aguda

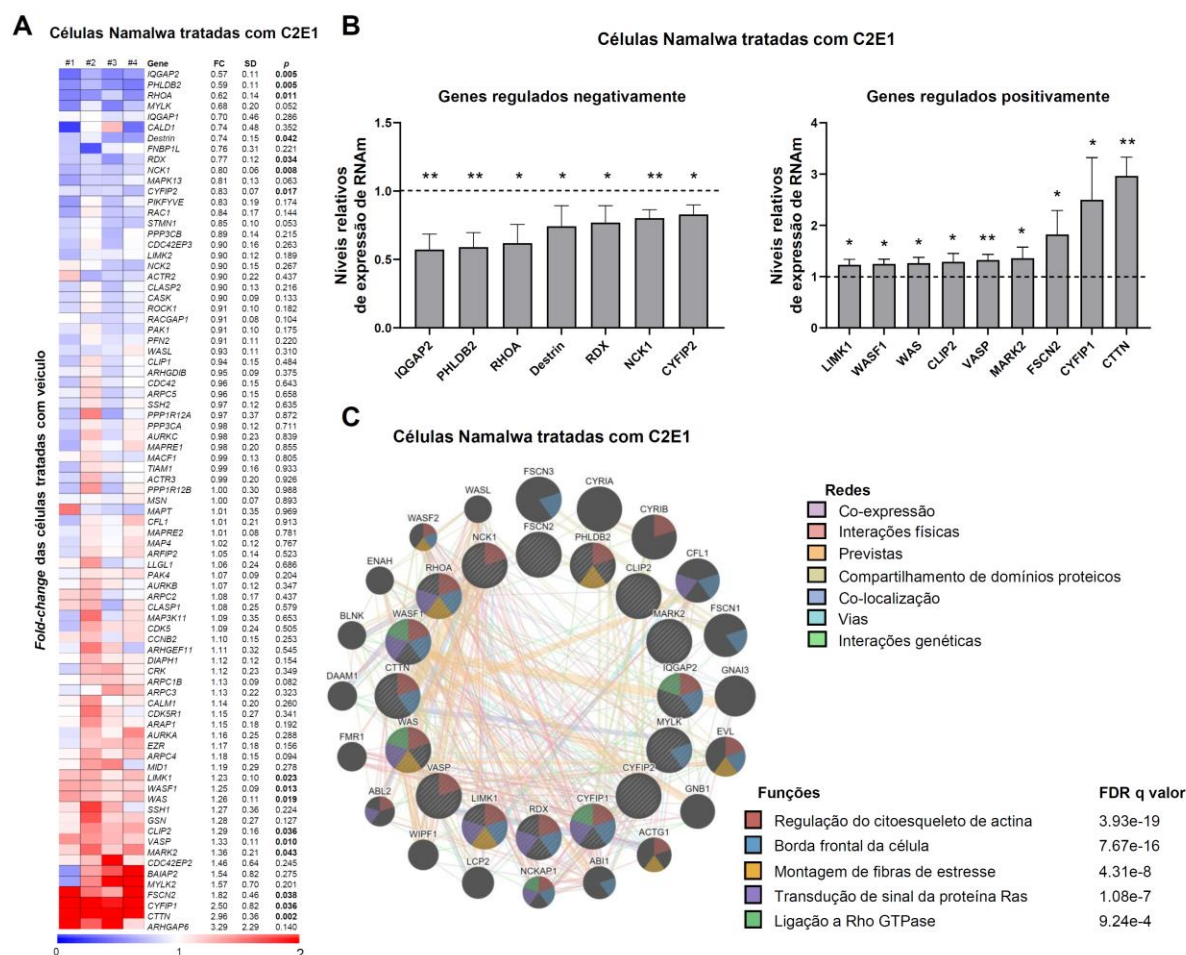


Análise de Western blot para níveis de proteína de fosfo(p)-stathmin 1^{S16}, stathmin 1, γH2AX e PARP1 (total e clivada) em extratos celulares totais de células de leucemia aguda tratadas com veículo e C2E1 (2,5, 5 e 10 μM) por 48 horas; as membranas foram incubadas com os anticorpos especificados e reveladas usando o sistema de substrato de duração estendida SuperSignal West Dura e o sistema de documentação de gel G: BOX Chemi XX6.

4.14. C2E1 modula genes relacionados à regulação do citoesqueleto em células de leucemia linfoblástica aguda

Na análise do perfil de expressão gênica por PCR array, entre os 84 genes relacionados à regulação do citoesqueleto analisados, 7 genes foram regulados negativamente (IQGAP2, PHLDB2, RHOA, Destrin, RDX, NCK1 e CYFIP2), e 9 positivamente (LIMK1, WASF1, WAS, CLIP2, VASP, MARK2, FSCN1, CYFIP1 e CTTN) em células Namalwa após exposição ao C2E1 por 48 horas (**Figura 43A-B**). A análise de rede gênica revelou uma correlação entre a exposição ao C2E1 com a regulação da organização do citoesqueleto de actina, borda frontal da célula, montagem de fibras de estresse, transdução de sinal de proteína Ras e ligação a Rho GTPase (todos FDR < 0,05; **Figura 43C**).

Figura 43. C2E1 modula genes relacionados ao citoesqueleto em células de leucemia aguda



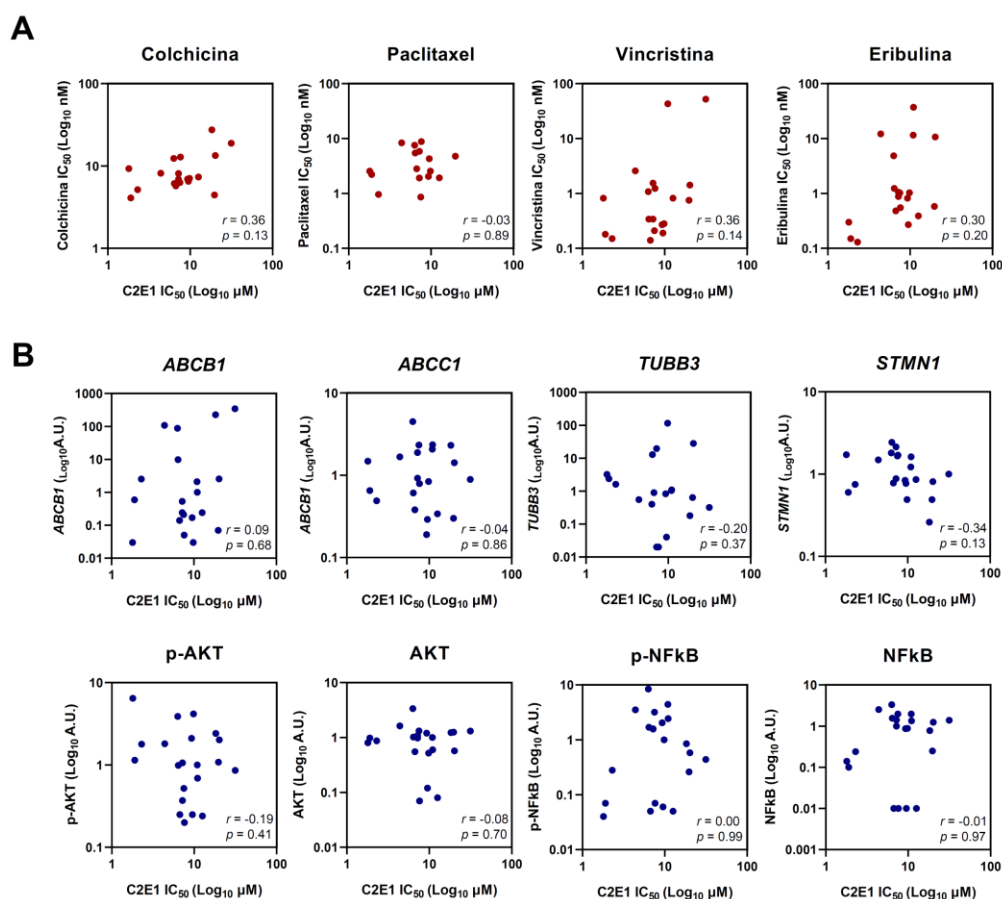
(A) O mapa de calor ilustra a análise quantitativa por RT-PCR de genes relacionados ao citoesqueleto em células Namalwa tratadas com C2E1 (3,2 μ M; n = 3) por 48 horas. Os dados são representados como *fold-change* em comparação com células tratadas com veículo, com genes regulados positivamente e regulados negativamente mostrados em azul e vermelho, respectivamente. (B) O gráfico de barras destaca os genes modulados significativamente. Os valores de *p* estão indicados nos gráficos; **p* < 0,05, ***p* < 0,01; Teste t de student. (C) A rede para genes modulados por C2E1 foi construída utilizando o banco de dados GeneMANIA. Os genes significativamente modulados são ilustrados como círculos hachurados; os genes interagentes incluídos na modelagem do software são indicados por círculos sem hachurados. As principais interações biológicas e funções associadas são descritas. FDR, taxa de descoberta falsa.

4.15. C2E1 não se correlaciona com biomarcadores de resistência a microtúbulos

Os valores de IC₅₀ do C2E1 não se correlacionaram significativamente com os valores de IC₅₀ de fármacos clinicamente utilizados que atuam nos microtúbulos, incluindo colchicina, paclitaxel, vincristina e eribulina (Figura 44A). Em seguida,

avaliamos a expressão gênica ou proteica de biomarcadores específicos associados à resistência em neoplasias hematológicas e tumores sólidos, determinando a expressão de genes que codificam a bomba de efluxo transmembranar de drogas (ABCB1 e ABCC1), tubulina beta 3 da classe III (TUBB3), STMN1 e marcadores da via PI3K/AKT (p-AKT e AKT), bem como a expressão e ativação da via de sinalização mediada pelo NFkB (p-NFkB e NFkB) (197-202). Nenhum desses alvos moleculares se correlacionou com os valores de IC₅₀ do C2E1 em linhagens celulares de neoplasias hematológicas (**Figura 44B**). Esses achados sugerem que o C2E1 poderia ser uma substituição estratégica para fármacos que visam os microtúbulos e que exibam esses mecanismos de resistência.

Figura 44. A resposta ao C2E1 não está associada à resposta a agentes antimicrotúbulos em uso clínico ou a marcadores de resistência em células de neoplasias hematológicas



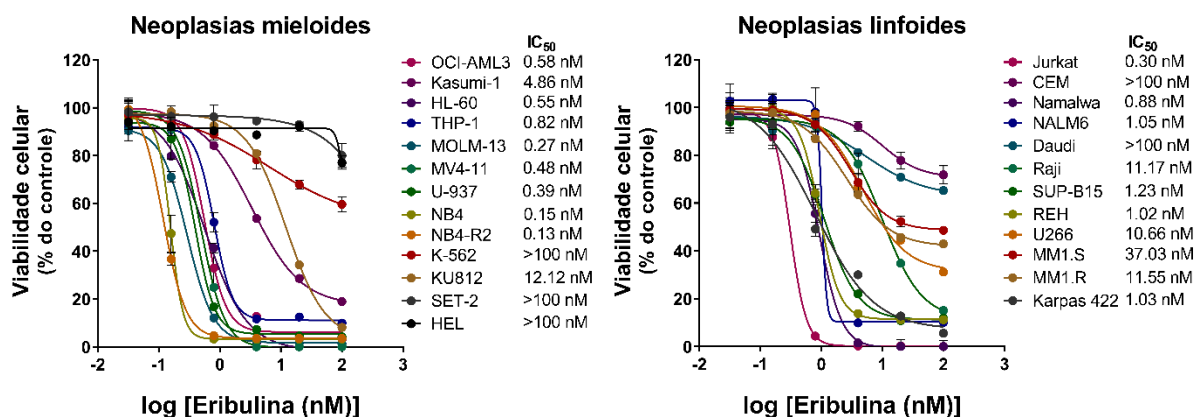
Gráficos de correlação **(A)** entre os valores de IC₅₀ de C2E1 e colchicina, paclitaxel, vincristina ou eribulina e **(B)** entre os valores de IC₅₀ de C2E1 e expressão de ABCB1, ABCC1, TUBB3, STMN1, p-AKT, AKT, p-NFkB ou NFkB nas células cancerígenas do sangue. Os valores p e r estão indicados; Teste de correlação de Spearman.

PARTE III

4.16. Eribulina reduz a viabilidade celular de linhagens celulares de neoplasias hematológicas

Inicialmente, a atividade antineoplásica da eribulina foi avaliada em um amplo painel de linhagens celulares de neoplasias mieloides e linfoides. A eribulina exibe atividade citotóxica na faixa de nanomolar (valores de IC_{50} variando de 0,13 a 12,12 nM), e apenas 5 das 21 linhagens celulares de neoplasias hematológicas foram consideradas resistentes à droga ($IC_{50} > 100$ nM). Entre os modelos mieloides, as linhagens celulares com ativação constitutiva de tirosina quinase causada pelas mutações BCR::ABL1 e JAK2^{V617F} (K-562, KU812, SET-2 e HEL) apresentaram valores de IC_{50} mais altos para a eribulina (de 12,12 a >100 nM). Entre os modelos linfoides, as linhagens celulares derivadas de mieloma múltiplo (U266, MM1.S e MM1.R) apresentaram valores de IC_{50} mais altos para a eribulina (de 10,66 a 37,03 nM) (**Figura 45** e **Tabela 7**). Nos leucócitos normais, a eribulina não impactou a viabilidade celular, sugerindo seletividade para células sanguíneas malignas e uma janela terapêutica favorável (**Figura 46**). Com base nesses achados, 6 células de leucemias agudas foram selecionadas para uma análise adicional (NB4, NB4-R2, OCI-AML3, MOLM-13, Jurkat e Namalwa). Como mostrado na **Figura 47**, a eribulina exibiu citotoxicidade dependente da concentração e do tempo em todas as células de leucemia avaliadas.

Figura 45. A eribulina reduz a viabilidade celular de linhagens celulares de neoplasias hematológicas



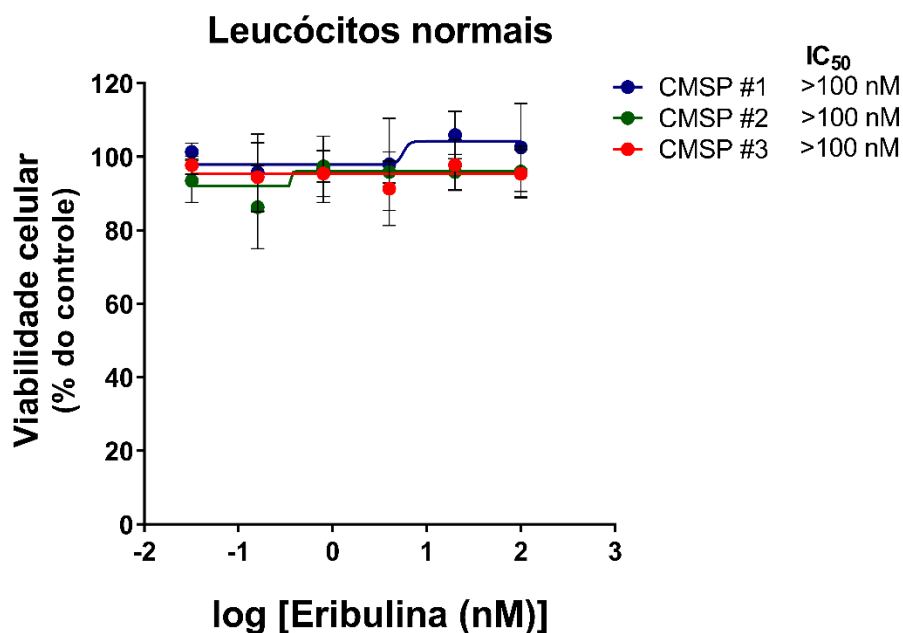
As curvas dose-resposta foram analisadas pelo ensaio de metiltiazoltrazólio (MTT) em um painel de células de neoplasias mieloides e linfóides tratados com concentrações crescentes de eribulina (0,032 – 100 nM) por 72 h.

Tabela 7. Características das linhagens celulares e sua sensibilidade à eribulina

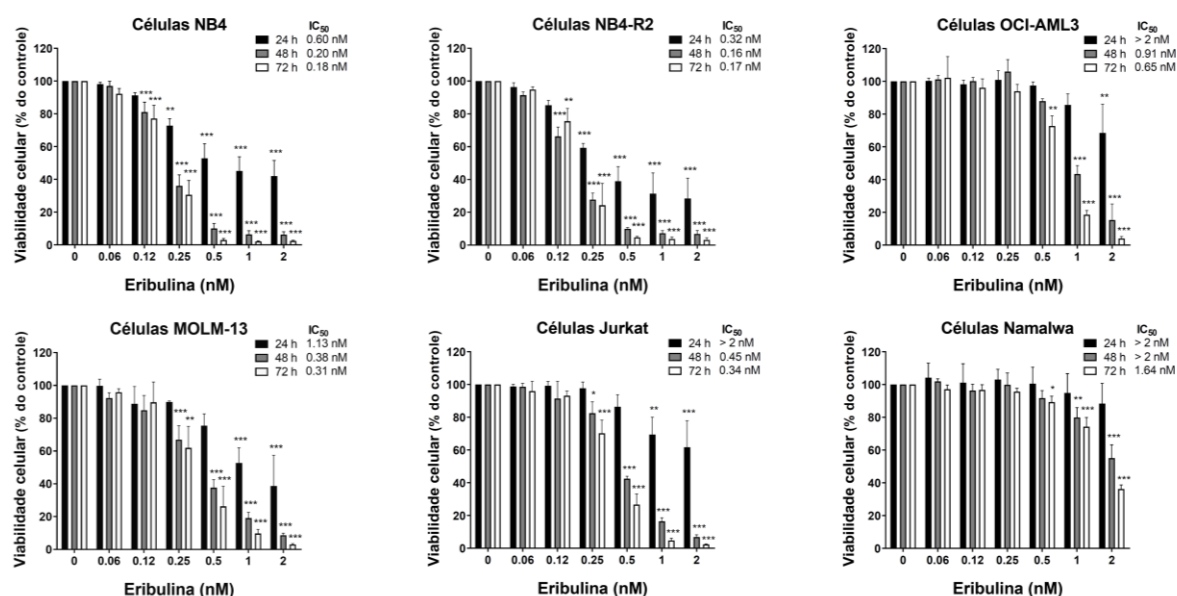
Linhagem	Neoplasia Hematológica	Eribulina IC ₅₀ (nM)
OCI-AML3	Leucemia mieloide aguda	0.58
Kasumi-1	Leucemia mieloide aguda	4.86
HL-60	Leucemia mieloide aguda	0.55
THP-1	Leucemia mieloide aguda	0.82
MOLM-13	Leucemia mieloide aguda	0.27
MV4-11	Leucemia mieloide aguda	0.48
U-937	Leucemia mieloide aguda	0.39
NB4	Leucemia promielocítica aguda	0.15
NB4-R2	Leucemia promielocítica aguda ¹	0.13
K-562	Leucemia mieloide crônica	>100
KU812	Leucemia mieloide crônica	12.12
SET-2	Neoplasia mieloproliferativa	>100
HEL	Neoplasia mieloproliferativa	>100
Jurkat	Leucemia linfoblástica aguda T	0.30
CEM	Leucemia linfoblástica aguda T	>100
Namalwa	Linfoma de Burkitt	0.88
NALM6	Leucemia linfoblástica aguda B	1.05
Daudi	Linfoma de Burkitt	>100
Raji	Linfoma de Burkitt	11.17
SUP-B15	Leucemia linfoblástica aguda B	1.23
REH	Leucemia linfocítica aguda, não-T; não-B	1.02
U266	Mieloma múltiplo	10.66
MM1.S	Mieloma múltiplo	37.03
MM1.R ²	Mieloma múltiplo ²	11.55
Karpas 442	Linfoma difuso de grandes células B	1.03

¹ Leucemia promielocítica aguda resistente ao ácido all-transretinóico.

² Mieloma múltiplo resistente a glicocorticoides.

Figura 46. A eribulina não exibe atividade citotóxica em leucócitos normais

As curvas dose-resposta foram analisadas pelo ensaio de metiltiazoltrazólio (MTT) em um painel de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de três doadores saudáveis tratados com concentrações crescentes de eribulina (0,032 – 100 nM) por 72 h. Note-se que nas concentrações testadas a IC₅₀ não foi alcançada (IC₅₀ > 100 nM) em leucócitos normais.

Figura 47. A eribulina exibe atividade citotóxica seletiva dependente da concentração e do tempo em células malignas mieloides e linfoides

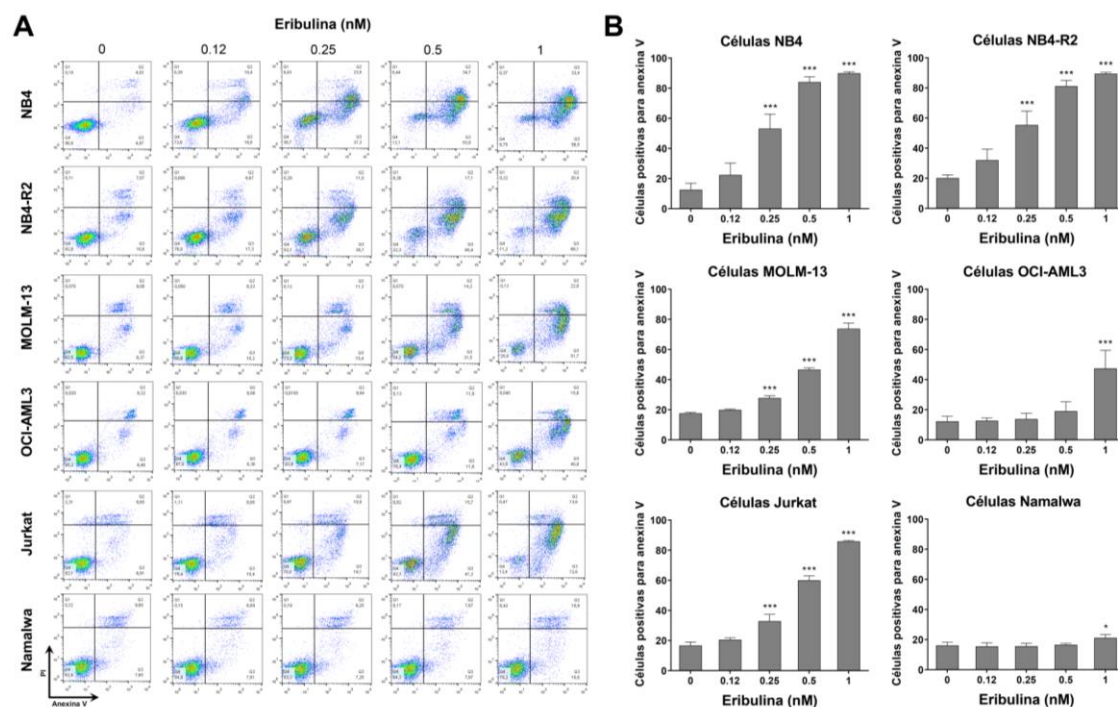
Os gráficos de barras representam respostas de concentração e tempo à eribulina (0,06 – 2 nM) após 24, 48 e 72 horas de exposição em células NB4, NB4-R2, OCI-AML3, MOLM-13, Jurkat e Namalwa. Os valores são expressos como a porcentagem de células viáveis para cada condição em relação aos controles não tratados. Os resultados são apresentados como média ± DP de pelo

menos quatro experimentos independentes. Os valores de p e linhagens celulares estão indicados nos gráficos; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.17. Eribulina promove apoptose e parada do ciclo celular e reduz a clonogenicidade em células de leucemia aguda

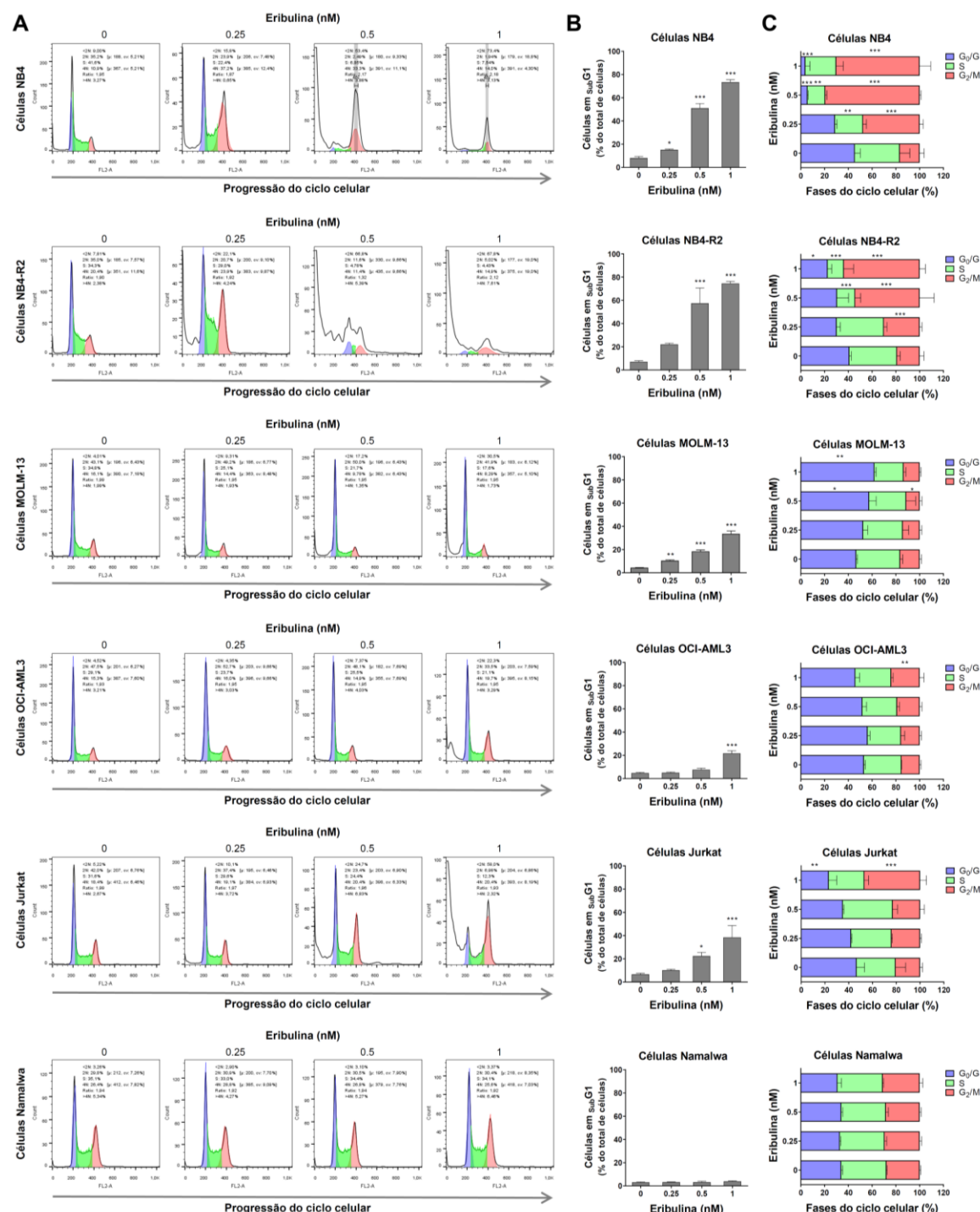
Em seguida, os mecanismos celulares desencadeados pela eribulina nas células de leucemia foram investigados. A eribulina induziu significativamente a apoptose dependente da concentração nas células de leucemia, conforme observado pela exposição de fosfatidilserina (todos $p < 0,05$, **Figura 48**), e aumentou as populações de células subG1 (todos $p < 0,05$, **Figura 49B**). A eribulina também induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M para as células NB4, NB-R2, OCI-AML3 e Jurkat e na fase G₀/G₁ para a MOLM-13 (todos $p < 0,05$, **Figura 49C**). As análises morfológicas revelaram uma alta frequência de aberrações mitóticas após o tratamento com eribulina por 72 horas (**Figura 50**), o que corrobora os achados relacionados ao ciclo celular. Da mesma forma, a exposição prolongada à eribulina diminuiu expressivamente o crescimento clonal autônomo nas células NB4, NB4-R2, MOLM-13, OCI-AML3 e Jurkat (todos $p < 0,05$, **Figura 51**). As células Namalwa foram menos sensíveis à eribulina, o que está em conformidade com os ensaios iniciais de viabilidade celular.

Figura 48. A eribulina desencadeia apoptose em células leucêmicas



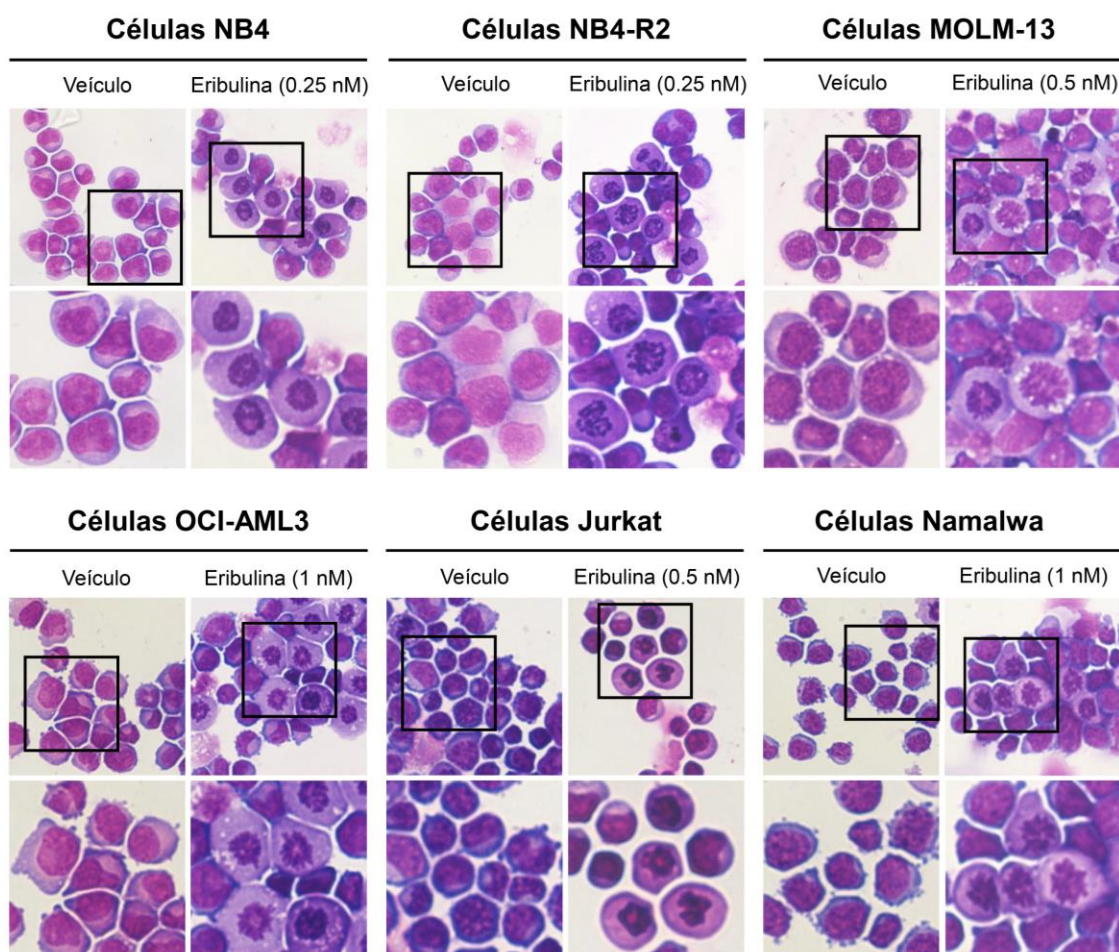
(A) A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células NB4, NB4-R2, MOLM-13, OCI-AML3, Jurkat e Namalwa tratadas com concentrações graduadas de eribulina (0,12, 0,25, 0,5 e 1 nM) por 72 h usando marcação com anexina V / iodeto de propídio (PI). Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; o quadrante superior e inferior direito (Q2 + Q3) contém cumulativamente a população apoptótica (células de anexina V+). **(B)** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de pelo menos quatro experimentos independentes que quantificam a morte celular por apoptose. Os valores de p e as linhas celulares estão indicados nos gráficos; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 49. A eribulina bloqueia o ciclo celular em G₂/M em células de leucemia



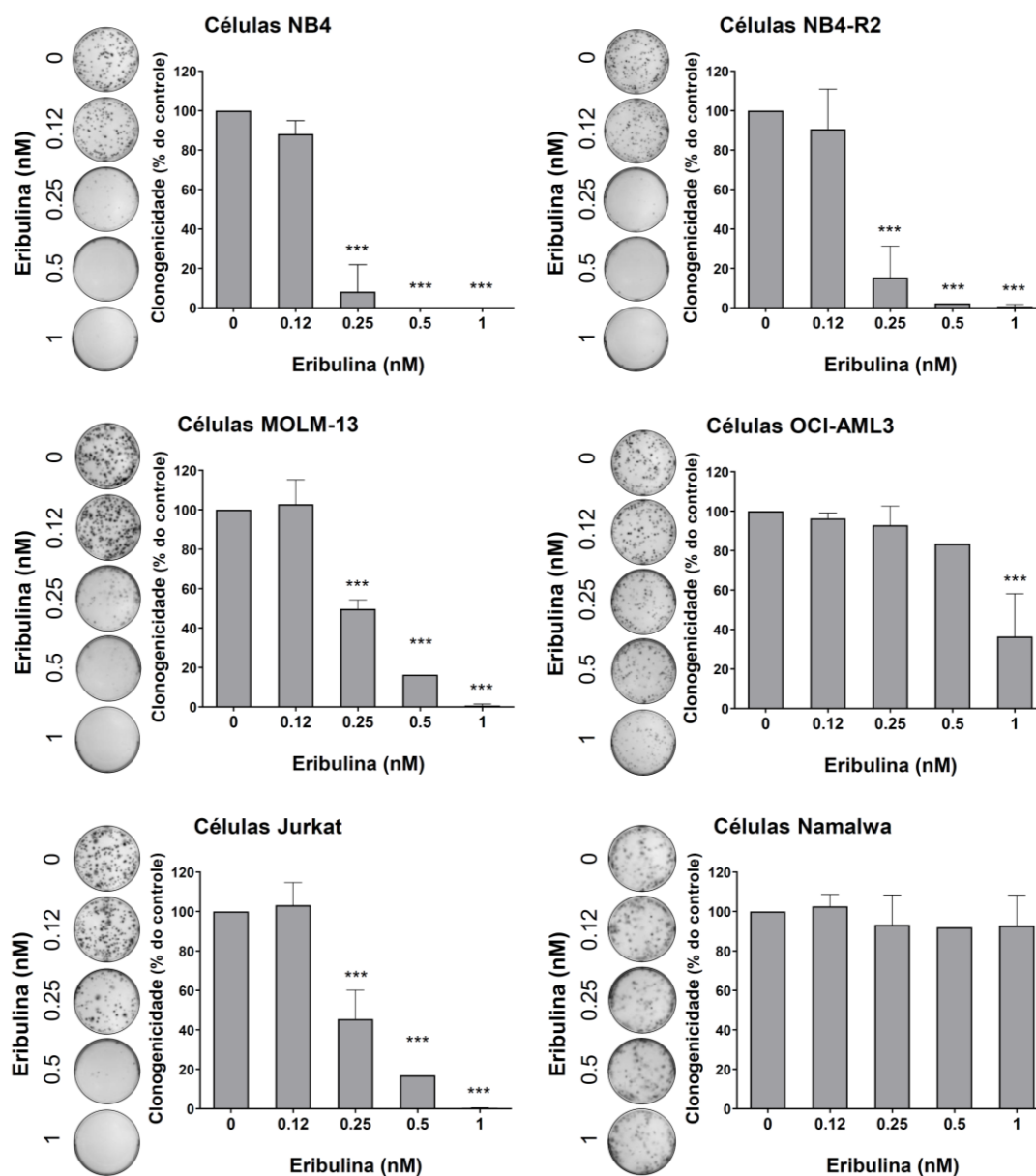
As fases do ciclo celular foram determinadas por análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio e citometria de fluxo em células NB4, NB4-R2, MOLM-13, OCI-AML3, Jurkat e Namalwa tratadas com eribulina (0,25, 0,5 e 1 nM) ou veículo por 72h. **(A)** Um histograma representativo para cada condição é ilustrado. **(B)** O gráfico de barras verticais representa a média $\pm$ DP das porcentagens de células em subG1 de pelo menos três experimentos independentes. **(C)** O gráfico de barras horizontais representa a média $\pm$ DP das distribuições celulares que estão nas fases G₀/G₁, S e G₂/M do ciclo celular (excluindo subG₁) de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de p e linhas celulares estão indicados nos gráficos; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 50. Mitoses aberrantes são observadas após exposição à eribulina em células de leucemia aguda



Células NB4, NB4-R2, MOLM-13, OCI-AML3, Jurkat e Namalwa foram tratadas com veículo ou eribulina por 72 h, fixadas e coradas com corante de Rosenfeld. Imagens com ampliação de 400× e 1000× são ilustradas.

Figura 51. A eribulina reduz a clonogenicidade das células leucêmicas mieloides e linfoides



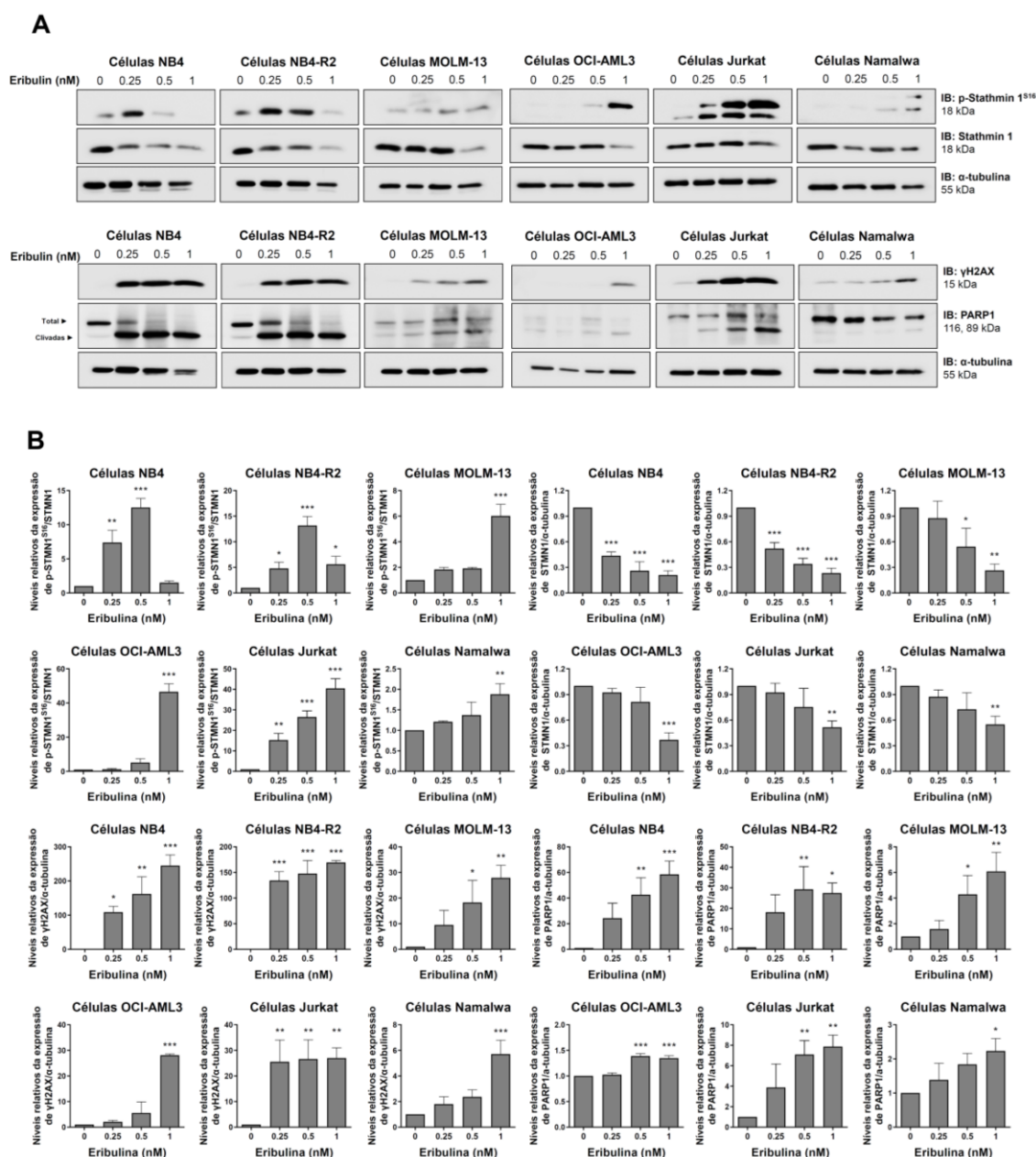
As colônias contendo células viáveis foram detectadas adicionando reagente MTT após 8 dias de cultura das células na presença de veículo ou eribulina (0,12, 0,25, 0,5 e 1 nM). Imagens de colônias são mostradas para um experimento e gráficos de barras mostram a média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.18. Eribulina induz marcadores moleculares de dano ao DNA e apoptose em células de leucemia mieloide e linfóide aguda

A nível molecular, foram avaliados os níveis de STMN1 e sua forma inativa (p-STMN1^{S16}) (marcador de proliferação), γ H2AX (marcador de dano ao DNA) e a

clivagem do PARP1 (marcador de apoptose). Em concentrações baixas de eribulina, observou-se uma indução da fosforilação de STMN1, enquanto em concentrações altas, a expressão de STMN1 foi reduzida (todos $p < 0,05$). Além disso, a exposição à eribulina induziu significativamente a expressão de γ H2AX e a clivagem do PARP1 em todas as linhagens celulares analisadas (**Figura 52**).

Figura 52. A eribulina induz marcadores moleculares de danos no DNA e apoptose em células de leucemia aguda



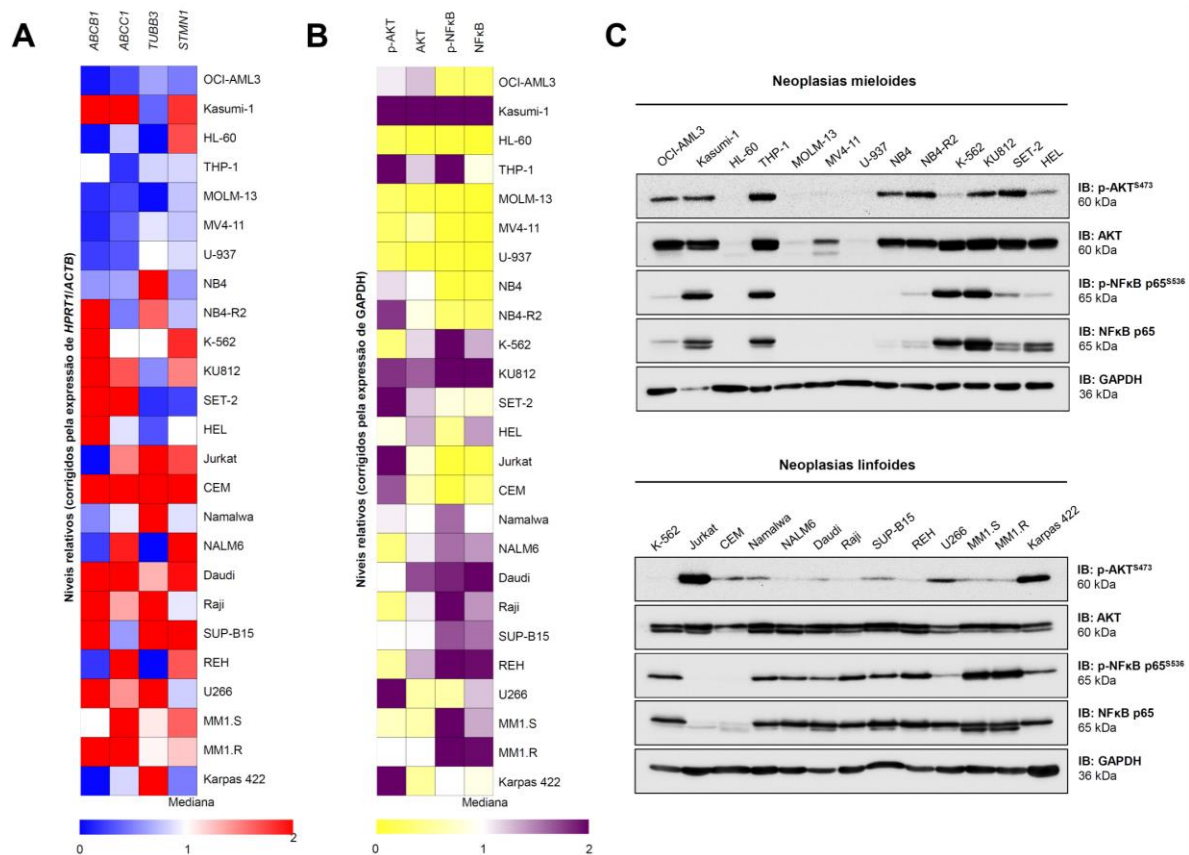
(A) Análise de Western blot para níveis de fosfo (p) -STMN1^{S16}, STMN1, γ H2AX e PARP1 (total e clivado) em extratos celulares totais de células de leucemia aguda tratadas com veículo e eribulina (0,25; 0,5 e 1 nM) por 48 horas; as membranas foram incubadas com os anticorpos

indicados e desenvolvidas com o SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate System e Gel Doc XR+. **(B)** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes que quantificam as intensidades das bandas proteicas indicadas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.19. A glicoproteína-P e as vias mediadas pelo NF- κ B estão relacionadas à resistência à eribulina em neoplasias hematológicas

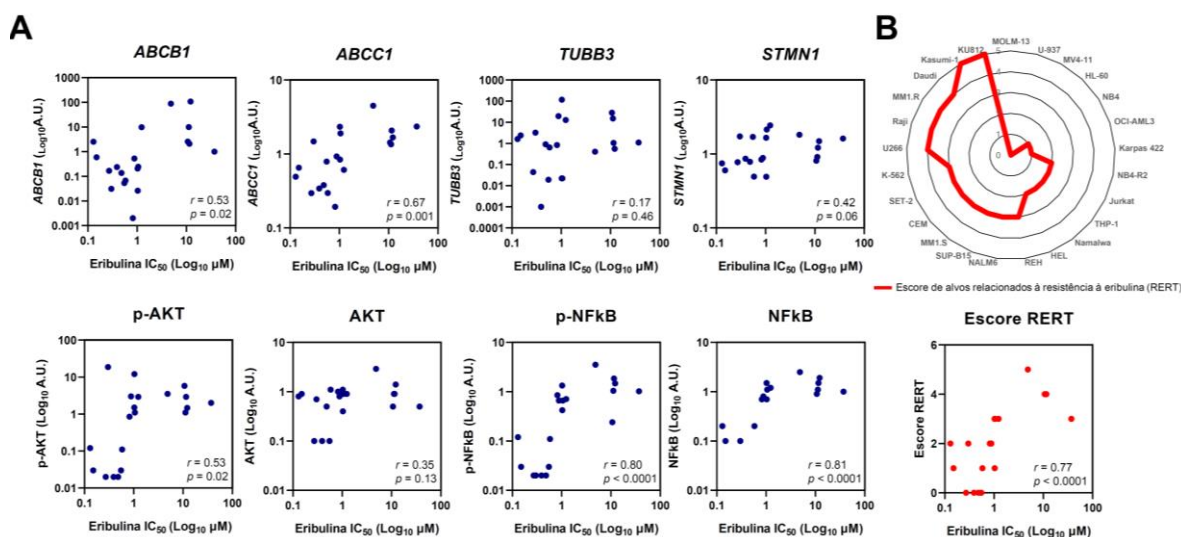
Em seguida, avaliamos se os biomarcadores de resposta já conhecidos para tumores sólidos poderiam ser aplicados no contexto das neoplasias hematológicas (198-203). Primeiramente, determinamos a expressão dos genes que codificam a bomba de efluxo de drogas transmembrana (ABCB1 e ABCC1), que codifica a tubulina beta 3 classe III (TUBB3) e STMN1 (**Figura 53A**), e os marcadores da expressão e ativação da via de sinalização mediada por PI3K/AKT e NF- κ B (**Figura 53B-C**). Entre esses alvos moleculares, ABCB1 ($r = 0,53$, $p = 0,02$), ABCC1 ($r = 0,67$, $p = 0,001$), p-AKT ($r = 0,53$, $p = 0,02$), p-NF- κ B ($r = 0,80$, $p < 0,0001$) e NF- κ B ($r = 0,81$, $p < 0,0001$) estavam associados aos valores de IC₅₀ para eribulina nas linhagens celulares de neoplasias hematológicas (**Figura 54A**). Com base nesses dados, construímos um escore relacionado à resistência à eribulina (RERT) que previa precisamente a sensibilidade do medicamento nos modelos celulares avaliados (**Figura 54B**).

Figura 53. Determinação da expressão gênica de ABCB1, ABCC1, TUBB3 e STMN1, e da expressão/ativação das vias PI3K/AKT e NF-κB



Os mapas de calor ilustram a expressão de genes **(A)** ou proteínas **(B)** associadas à resistência à eribulina num painel de linhagens celulares de neoplasias hematológicas. Os dados genéticos são representados como expressão relativa corrigida pela expressão de *HPRT1/ACTB*, genes regulados negativamente e regulados positivamente são apresentados em azul e vermelho, respectivamente. Os dados de expressão proteica são representados como níveis relativos corrigidos pela expressão de GAPDH, as proteínas reguladas negativamente e reguladas positivamente são apresentadas em amarelo e roxo, respectivamente. **(C)** Análise representativa de western blot para fosfo (p) -AKT^{S473}, AKT, (p) - NF-κB p65^{S536} e NF-κB p65 em extratos celulares totais de linhagens celulares de neoplasias mieloides e linfóides.

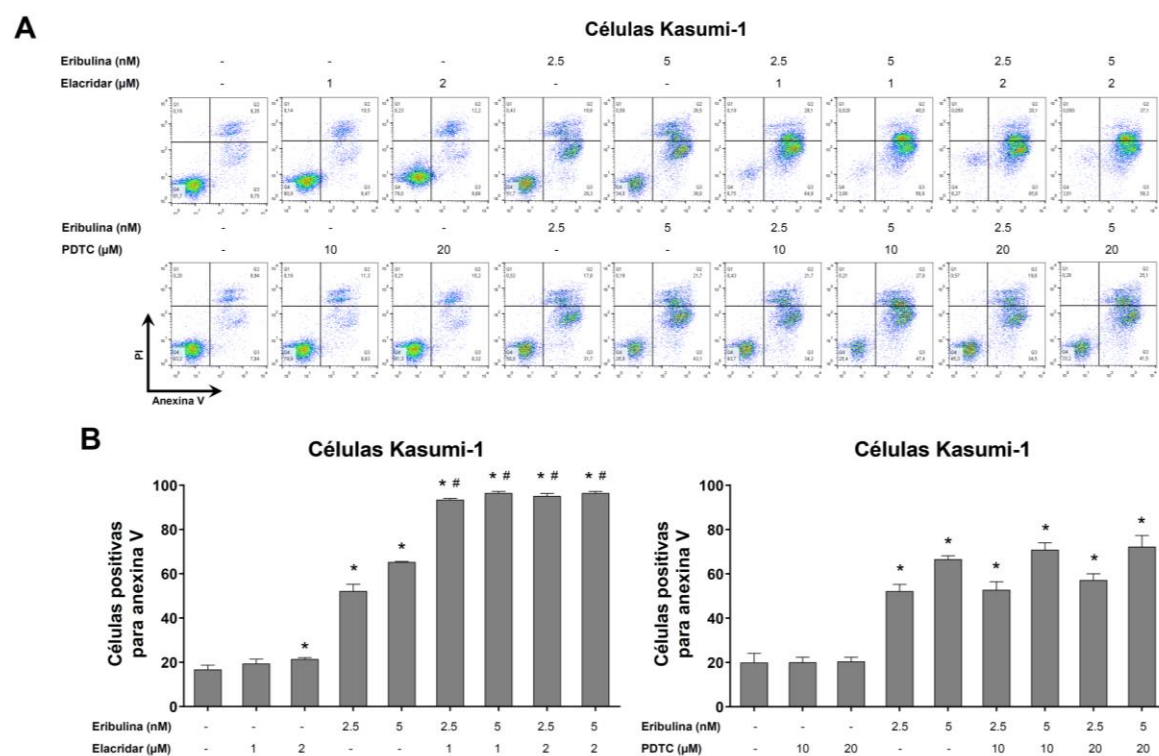
Figura 54. A resistência à eribulina está associada à alta expressão/ativação de MDR1, NF-κB e AKT em células neoplásicas sanguíneas



(A) Gráficos de correlação entre a expressão de ABCB1, ABCC1, TUBB3, STMN1, p-AKT, AKT, p-NF-κB ou NF-κB e valores de IC_{50} para eribulina em células cancerígenas do sangue. **(B)** Utilizando marcadores moleculares que se correlacionam significativamente com IC_{50} da eribulina em neoplasias hematológicas, foi criado um escore de alvos relacionados à resistência à eribulina (RERT), no qual cada linhagem celular recebe um ponto para cada gene/proteína regulado positivamente (a mediana foi usada como ponto de corte, máximo de pontos = 5). O gráfico de radar mostra a distribuição de pontos entre as linhas celulares analisadas. Observe que a pontuação se correlaciona precisamente com a sensibilidade ao medicamento nos modelos celulares avaliados.

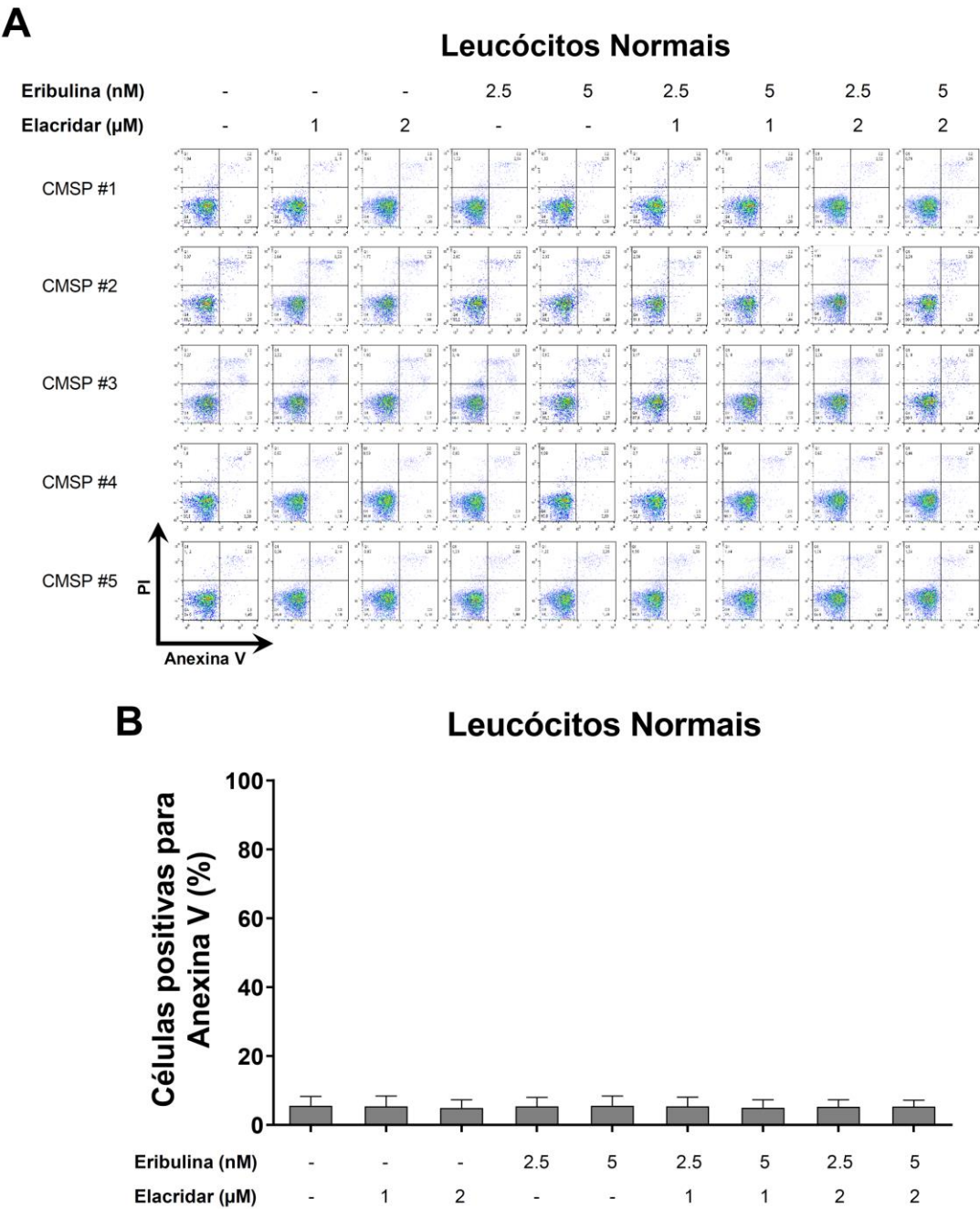
Por fim, utilizando inibidores farmacológicos da glicoproteína-P (elacridar) e do NF-κB (PDTC), observamos que a resistência conferida pela bomba de efluxo de drogas, mas não a ativação do NF-κB, é reversível, e pode eliminar um modelo de célula leucêmica com a ativação de ambos os processos moleculares (**Figura 55**). É importante ressaltar que a combinação de eribulina e elacridar não foi tóxica para os leucócitos normais (**Figura 56**).

Figura 55. O inibidor da glicoproteína-P, elacridar, potencializa a apoptose induzida pela eribulina em células Kasumi-1



(A) A apoptose foi detectada por citometria de fluxo utilizando coloração com APC-anexina V e iodeto de propídio. Os gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes superior e inferior direito contêm cumulativamente a população apoptótica (células de anexina V+). **(B)** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes que quantificam a morte celular apoptótica em células Kasumi-1 após exposição ao veículo, eribulina (2,5 e 5 nM) e/ou elacridar (1 e 2 μ M) e/ou PDTC (10 e 20 μ M) durante 72 horas. Os valores de p estão indicados nos gráficos; * $p < 0,05$ para células tratadas com eribulina, elacridar e/ou PDTC versus células tratadas com veículo, # $p < 0,05$ para células tratadas com eribulina, elacridar ou PDTC versus tratamento combinado nas doses correspondentes; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 56. O tratamento combinado de elacridar e eribulina não induz apoptose em leucócitos normais



O tratamento combinado de elacridar e eribulina em leucócitos normais não induz apoptose em células Kasumi-1. **(A)** A detecção da apoptose foi realizada por meio de citometria de fluxo utilizando coloração com APC-anexina V e iodeto de propídio. Os gráficos de pontos apresentados são representativos para cada condição, sendo que os quadrantes superior e inferior direitos acumulam a população apoptótica (células de anexina V+). **(B)** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes que quantificam a morte celular apoptótica em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após exposição ao veículo, eribulina (2,5 e 5 nM) e/ou elacridar (1 e 2 μ M) durante 72 horas. Os valores de p estão indicados nos gráficos; $*p < 0,05$ para células tratadas com eribulina e/ou elacridar *versus* células tratadas com veículo, $\#p < 0,05$ para células tratadas com eribulina ou elacridar *versus* tratamento combinado nas doses correspondentes; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

PARTE I

Na primeira parte da tese, descrevemos a elevada expressão de STMN1 e sua correlação com as características clínicas e biológicas da LPA. STMN1 é uma proteína desestabilizadora de microtúbulos que contribui para a proliferação celular em neoplasias hematológicas, incluindo leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda e neoplasias mieloproliferativas (170-172, 204). Um estudo anterior identificou que a expressão da oncoproteína PML::RAR α induziu a expressão e ativação de STMN1 em células leucêmicas U937 (176). No entanto, sua relevância no contexto da LPA foi pouco explorada. Utilizando duas coortes independentes de LPA, confirmamos a alta expressão de STMN1. No entanto, os níveis de RNAm de STMN1 não tiveram efeito nos resultados clínicos e não foram associados a características clínicas relevantes.

Utilizando ferramentas de bioinformática e dados de RNA-seq de uma coorte de LPA recentemente publicada (180), associamos os níveis elevados de STMN1 com assinaturas genéticas relacionadas à proliferação e metabolismo, incluindo alvos de E2F, sinalização PI3K/AKT/mTOR e glicólise. De fato, foi relatado que E2F ativa a expressão de STMN1 em tumores sólidos (37). Da mesma forma, a via PI3K/AKT/mTOR tem sido associada à expressão e ativação de STMN1, uma vez que a inibição farmacológica de PI3K, AKT e S6K por LY294002, MK2206 e AD80, respectivamente, reduz os níveis de STMN1 (205-207). STMN1 é um dos genes utilizados para uma assinatura genética relacionada à glicólise que prevê a recorrência do câncer de mama e do adenocarcinoma de próstata (208, 209). No entanto, a relação entre STMN1 e glicólise na leucemia ainda não foi relatada anteriormente.

Embora muitos detalhes do papel de STMN1 na hematopoiese tenham sido descobertos nos últimos anos, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Até o momento, foi estabelecido que STMN1 é altamente expresso em progenitores hematopoéticos e reduzido durante a diferenciação celular para eritrócitos e megacariócitos (168). A expressão anormal de STMN1 reduz a capacidade de maturação de progenitores megacariocíticos (167). Recentemente, o papel de STMN1 na diferenciação eritroide e megacariocítica foi destacado em um modelo murino knockout (169). No presente estudo, confirmamos que STMN1 é altamente expresso

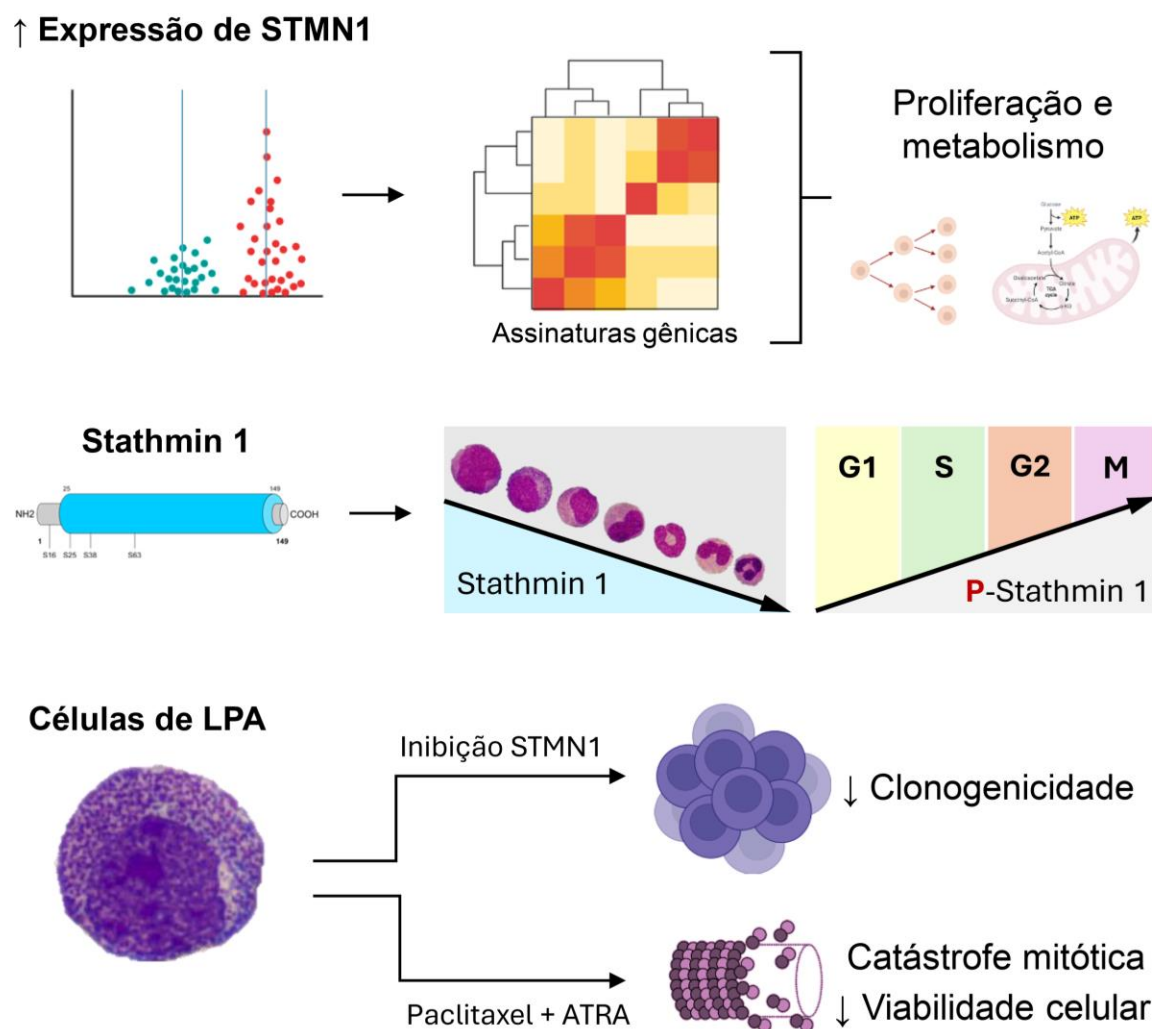
em progenitores hematopoéticos e, além da redução observada em eritrócitos e megacariócitos, é reduzido em células mieloides mais maduras. Em células NB4, mas não em células NB4-R2, o tratamento com ATRA reduziu a expressão de STMN1 e o potencial proliferativo, sugerindo um efeito associado à diferenciação celular e não diretamente à exposição ao medicamento. Em nossa análise de enriquecimento gênico, a expressão de STMN1 em pacientes com LPA foi associada a alvos do MYC, um fator de transcrição associado à autorrenovação e pluripotência (210). Além disso, a inibição de STMN1 reduziu o crescimento clonal em modelos celulares de LPA. No geral, nossas descobertas corroboram funções previamente descritas de STMN1 na hematopoiese e fornecem novas evidências do papel dessa proteína na mielopoese, capacidade proliferativa e clonogenicidade no contexto da LPA.

Uma descoberta significativa foi a alta fosforilação de STMN1 em modelos celulares de LPA. A fosforilação de STMN1 na serina 16 resulta em uma menor afinidade entre STMN1 e os dímeros de α -/ β -tubulina, inibindo sua atividade desestabilizadora de microtúbulos (161). Experimentos de sincronização do ciclo celular mostraram que a fosforilação de STMN1 está associada à mitose, durante a qual STMN1 precisa ser inibido para promover a formação do fuso mitótico e a correta segregação dos cromossomos (211). A associação entre a expressão de STMN1 e a assinatura genética para o ponto de verificação G₂/M e reparo do DNA sugere que a expressão anormal desse gene pode estar associada à instabilidade genômica. De fato, a superexpressão de STMN1 induz mitoses aberrantes, poliploidização e perda cromossômica em células leucêmicas K562 (173). Estudos pré-clínicos forneceram evidências promissoras sobre a eficácia de inibidores de PARP em modelos de LPA (212, 213). Notavelmente, em nosso estudo, a inibição de STMN1 contribuiu para uma resposta apoptótica mais eficaz ao olaparibe em linhagens celulares de LPA, sugerindo que a expressão desse gene poderia ser considerada um potencial marcador de resposta em investigações futuras.

Estudos anteriores relataram que baixas doses de paclitaxel inibem a atividade de STMN1 e reduzem a viabilidade celular em modelos de neoplasias hematológicas (171, 172). Em nosso estudo, observamos que as células NB4 e NB4-R2 exibiram alta sensibilidade ao paclitaxel, induzindo apoptose e catástrofe mitótica. Nas células NB4-R2, o ATRA potencializou os efeitos antineoplásicos do paclitaxel, o que foi associado a um aumento no dano ao DNA e apoptose. Nas últimas décadas, aprendemos mais sobre as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do paclitaxel em tumores

sólidos (214), isso pode ajudar a redirecionar este medicamento para neoplasias hematológicas para as quais existem opções terapêuticas limitadas. Portanto, compreender os contextos nos quais as alterações na dinâmica dos microtúbulos podem ser alvos promissores é de interesse para o campo da hematologia.

Figura 57. Representação esquemática dos achados do papel da Stathmin 1 em leucemia promielocítica aguda.



A Stathmin 1 é altamente expressa em medula óssea de pacientes com LPA. Análises de bioinformática associaram a expressão de STMN1 com assinaturas genéticas relacionadas à proliferação e ao metabolismo em LPA. Em relação à dinâmica de expressão da Stathmin, esta foi altamente expressa em progenitores hematopoiéticos, reduzida durante a diferenciação celular, e sua fosforilação foi predominante em células de LPA em mitose. Nas células NB4 e NB4-R2, a inibição de STMN1 diminuiu o crescimento celular autônomo e o tratamento com paclitaxel (agente único ou combinado com ATRA) induziu a estabilização dos microtúbulos, resultando em catástrofe mitótica com repercussões na viabilidade celular, mesmo em células resistentes ao ATRA. Imagem do autor. Criado com BioRender.com.

PARTE II

Já na parte II do trabalho, os efeitos antileucêmicos de novos ciclopenta[β]indóis sintéticos em linhagens celulares de LPA sensíveis e resistentes ao ATRA foram investigados. Os ciclopenta[β]indóis estão presentes em vários compostos naturais e sintéticos biologicamente ativos, sendo diretamente responsáveis por seus efeitos biológicos (215-217). Dentre as funções biológicas descritas para compostos que contêm a porção ciclopenta[β]indol, foram relatadas atividades abortivas e antiestrogênicas, atividade antagonista do receptor de prostaglandina D2, atividade agonista do receptor de progesterona, atividade antioxidante e inseticida (218-225).

Devido à grande relevância dessa classe de compostos, vários protocolos sintéticos foram descritos para sintetizar esse núcleo heterocíclico, como a indolização de Fischer, a reação intramolecular de Friedel-Crafts e a ciclização catalisada por paládio, mas muitos desses protocolos apresentam baixo rendimento e baixa estereosseletividade (226, 227). Os cicloenta[β]indóis utilizados no presente estudo foram obtidos por meio de uma sequência de reações utilizando adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH) como blocos de construção e cloreto de índio III como catalisador ácido. O diferencial desta síntese é que se trata de uma síntese diastereosseletiva, já relatada pelo nosso grupo de pesquisa (185), que também avaliou os efeitos de alguns ciclopenta[β]indóis em um painel de linhagens celulares de tumores humanos. Alguns dos ciclopenta[β]indóis testados mostraram atividade antitumoral semelhante à da doxorrubicina, mas com maior seletividade. Por exemplo, o derivado de ciclopenta[β]indol substituído por um grupo 4-metoxifenil em C3 (metil-7-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-1,2,3,4-tetraidro-cicloenta[β]indol-2-carboxilato) apresentou 12 vezes mais potência do que a doxorrubicina para inibir completamente o crescimento celular em linhagens de células de câncer ovariano, OVCAR-3 (185).

No presente estudo, entre os três enantiômeros puros dos novos ciclopenta[β]indóis sintéticos testados, o composto 2 (C2) exibiu efeitos citotóxicos mais elevados, reduziu o crescimento clonal autônomo, geralmente associado à agressividade na leucemia (228), e induziu apoptose e parada do ciclo celular em células de LPA sensíveis e resistentes à ATRA. Além disso, C2 não apresentou citotoxicidade em leucócitos normais, o que sugere seletividade para células hematopoiéticas malignas. Vale ressaltar que observações iniciais usando NB4 como modelo celular de LPA geram evidências do potencial terapêutico do ATRA e trióxido

de arsênio (229, 230), que atualmente são a primeira linha de tratamento nesta doença com resultados clínicos superiores às opções terapêuticas anteriores (91). NB4-R2 é um subclone resistente ao ATRA da linhagem celular NB4 de LPA, que altera o aminoácido Gln903 para um códon de parada, gerando uma forma truncada de PML::RAR α que perdeu 52 aminoácidos em seu C-terminal (231). Na clínica, a resistência ao ATRA representa um desafio terapêutico no tratamento da LPA, e novas opções terapêuticas são de interesse (108, 232).

No cenário molecular, o C2 reduziu a expressão de STMN1 e induziu a clivagem de PARP1, a fosforilação de H2AX e CHK2. Em células de leucemia aguda, STMN1 desempenha um papel importante na progressão do ciclo celular e clonogenicidade, sendo um marcador de proliferação de células hematopoiéticas normais e malignas (168, 170). Em tumores malignos, STMN1 integra múltiplas vias de sinalização, regulando a dinâmica dos microtúbulos, sequestrando dímeros livres de tubulina ou induzindo diretamente a catástrofe dos microtúbulos, e a alta expressão de STMN1 tem sido associada à aceleração na mitose, migração e invasão (161). Apesar da importância de STMN1 no fenótipo maligno de vários tipos de câncer hematológico e sólido, inibidores farmacológicos eficazes de STMN1 ainda não foram descritos (233). PARP1 é um dos vários substratos celulares conhecidos das caspases e pode ser clivado e inativado pelas caspases ativas 3 e 7, sendo essa clivagem considerada como um indicador de apoptose, formando fragmentos de 24 kDa e 89 kDa (234, 235).

H2AX é uma variante da família de proteínas H2A, que é um componente do octâmero de histonas em nucleossomos. Na presença de danos ao DNA, H2AX é fosforilado na serina 139, sendo chamado de γ H2AX (236-238). Da mesma forma, CHK2 também é fosforilado em resposta a danos ao DNA (239). No ensaio de polimerização de tubulina *in vivo*, as células NB4 e NB4-R2 mostraram uma diminuição significativa nos níveis de tubulina polimerizada. O acúmulo de danos ao DNA é uma das características da catástrofe mitótica, um tipo de morte celular que ocorre durante a mitose (240). Entre os genes relacionados a danos ao DNA investigados, CDKN1A, GADD45A, PMAIP1 e XRCC3 foram modulados pelo C2 em células NB4 e NB4-R2. As expressões de CDKN1A e GADD45A são induzidas por danos ao DNA e associadas à parada no crescimento e apoptose (241, 242). PMAIP1 (também conhecido como NOXA) é um membro BH3-only da família BCL2 que atua como uma proteína pró-apoptótica, e sua expressão também é ativada em resposta a

danos ao DNA (243). XRCC3 desempenha um papel na reparação de quebras duplas no DNA/recombinação para manter a estabilidade cromossômica, e sua regulação negativa tem sido associada ao aumento da apoptose induzida por quimioterapia (244). Em conjunto, esses dados indicam que o C2 perturba a dinâmica dos microtúbulos, o que reduz a viabilidade celular através da parada no ciclo celular e danos ao DNA, desencadeando, em última análise, a apoptose.

Quanto à estrutura-atividade, nossos resultados sugerem que o trimetoxi que possui grupos O-metila mais livres apresentou menor atividade citotóxica, e quando a liberdade desses grupos foi restrita usando o O-CH₂-CH₂-O, a atividade citotóxica aumentou, sendo ainda mais aprimorada ao restringi-la com o O-CH₂-O. Esses dados sugerem que a restrição da liberdade dos grupos favorece interações de ligação de hidrogênio com grupos funcionais no sítio ativo. Experimentos de docking molecular apoiam essa hipótese, uma vez que as principais interações, uma com o átomo de oxigênio sp² do grupo carboxila e outra com um átomo de oxigênio sp³ do anel de dioxolano de cinco membros, foram observadas para o composto 2 (C2).

Após descoberta, discutida acima e publicada (184), do mecanismo de ação e do potencial anticâncer do ciclopenta[β]indol C2 em LPA, prosseguimos com avaliação do ciclopenta[β]indol C2 (agora designado C2E1) e seu enantiômero designado C2E2. Nossos resultados revelaram que o enantiômero C2E1, mas não o C2E2, exibiu um efeito inibitório na polimerização da tubulina. Através de análises de docking molecular, observamos diferenças na interação do composto com o sítio de ligação da tubulina, especialmente na região de ancoragem do anel A da colchicina. Pela análise de docking, há evidências de que, devido à diferente estereoquímica do C2E2 em comparação com o C2E1, seu grupo éster é sobreposto à região do anel A da colchicina. Por outro lado, com base na previsão de ancoragem, a porção indol-7-ol do C2E1 se sobrepõe a essa região. A importância do anel A na ação da colchicina é crucial, pois ele serve como o local primário para sua interação com a tubulina (137, 245, 246). Este anel facilita a ligação da colchicina à tubulina, e alterações ou modificações no anel A podem impactar significativamente a ligação efetiva da colchicina à tubulina, influenciando assim sua atividade farmacológica e eficácia terapêutica (137, 245, 246).

Diante dessas descobertas, direcionamos nossos estudos para analisar os efeitos do tratamento com C2E1 em um painel molecularmente heterogêneo de

linhagens celulares de neoplasias hematológicas. Observamos que entre as células leucêmicas expostas ao C2E1, houve uma redução significativa na viabilidade celular, a qual foi dependente de concentração e tempo e associada a um aumento na morte celular e parada do ciclo celular. A parada do ciclo celular na fase G₂/M observada em células leucêmicas tratadas com C2E1 pode estar diretamente relacionada à interferência desse composto na formação e função dos microtúbulos, essenciais para a correta progressão mitótica, resultando em desorganização do citoesqueleto, comprometimento da segregação cromossômica e eventos aberrantes durante a divisão celular, culminando em catástrofe mitótica (247). Essas descobertas destacam a importância dos microtúbulos na integridade do ciclo celular e sugerem o potencial do C2E1 como um agente para modular seletivamente a proliferação celular.

Além disso, o tratamento com o composto C2E1 resultou na redução da clonogenicidade celular autônoma, uma característica associada à malignidade. A clonogenicidade refere-se à capacidade das células leucêmicas proliferarem de forma independente, formando colônias. O aumento da clonogenicidade contribui para a progressão da doença, e células com alta clonogenicidade frequentemente apresentam maior resistência aos tratamentos quimioterápicos, pois a formação de colônias autônomas pode levar ao desenvolvimento de subpopulações celulares com características diferentes, criando heterogeneidade tumoral onde algumas células podem adquirir mutações ou características que as tornam mais agressivas ou resistentes (248-251).

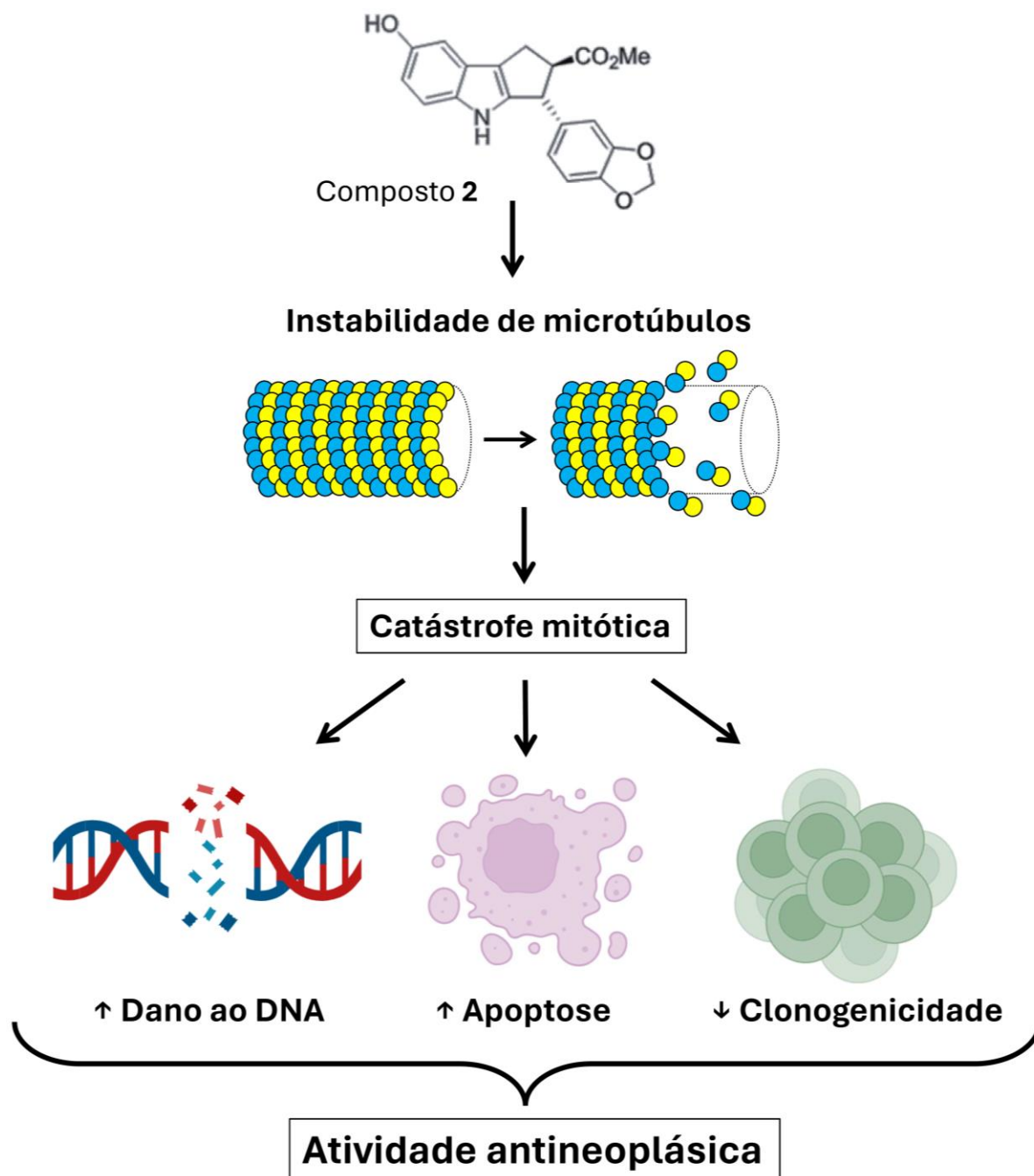
O C2E1 também foi eficaz na redução da migração celular nos modelos Kasumi-1 e Namalwa, que apresentam essa capacidade devido à quimiotaxia pelo quimiocina CXCL12 (252, 253). É importante destacar que a migração celular desempenha um papel crucial na progressão, especialmente na LLA, devido à influência da quimiocina CXCL12, também conhecida como fator 1 derivado de células estromais (SDF-1). As células leucêmicas migram para o nicho hematopoiético na medula óssea, onde, graças à interação entre o receptor CXCR4 nas células leucêmicas e o CXCL12 no nicho hematopoiético, encontram suporte e resistem aos tratamentos (254, 255). O sistema nervoso central libera CXCL12, criando um ambiente propício para a migração das células leucêmicas para o cérebro e medula espinhal. Essa interação facilita a entrada das células leucêmicas no sistema nervoso

central, contribuindo para a complexidade do tratamento e resistência às terapias, resultando em respostas terapêuticas menos eficazes (256).

No nível molecular, o tratamento com o composto C2E1 induziu marcadores de danos ao DNA (γ H2AX), apoptose (PARP clivado) e redução da proliferação (p-STMN1) (170, 236, 257). Para investigar o impacto do C2E1 na regulação do citoesqueleto, realizamos um PCR array com 84 genes associados a essa função. Observamos que sete desses genes foram positivamente regulados, enquanto nove foram negativamente regulados pelo composto C2E1. Os genes modulados estão relacionados a vários processos associados ao citoesqueleto de actina, sugerindo o desencadeamento de mecanismos compensatórios celulares para utilizar outra proteína do citoesqueleto, a actina, para realizar funções da tubulina diante de perturbações.

No âmbito da pesquisa em andamento e ensaios clínicos, foram desenvolvidos novos inibidores de tubulina (recentemente patenteados) que mostraram eficácia terapêutica contra leucemias agudas, indicando um campo promissor para estudos adicionais (135). Outro ponto interessante é que, devido à diversidade de sítios de ligação de agentes antimicrotúbulos à tubulina, a aquisição de resistência ou falha no tratamento com um agente específico não implica resistência a todos os agentes com esse mecanismo de ação. Em outras palavras, quanto maior o repertório de agentes antimicrotúbulos, maiores são as possibilidades de manter a resposta por meio da substituição entre agentes (128). Um exemplo seria o uso de eribulina em pacientes resistentes ao paclitaxel (258). Recentemente, Peerzada et al. (259) enfatizaram a importância da pesquisa de novos compostos que se ligam ao sítio da colchicina devido ao seu potencial de evitar a resistência mediada pela bomba de efluxo – glicoproteína-P. Além disso, a ausência de inibidores aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) que visam o sítio da colchicina destaca a importância de explorar e desenvolver tais compostos para fins terapêuticos (259).

Figura 58. Representação esquemática dos efeitos do composto 2 sobre os modelos celulares de leucemia mieloide e linfóide aguda.



O composto 2 interfere na dinâmica de microtúbulos ao se ligar ao sítio da colchicina na tubulina, de modo que gera catástrofe mitótica, causando danos ao DNA e desencadeando a apoptose, além de diminuir a clonogenicidade das células leucêmicas. Imagem do autor. Criado com BioRender.com.

PARTE III

Nesta terceira parte do trabalho, investigamos os efeitos celulares e moleculares do eribulina em um painel molecularmente heterogêneo de linhagens celulares de neoplasias hematológicas, incluindo leucemia mieloide aguda, neoplasias mieloproliferativas, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiplo e modelos de linfoma. A eribulina é um análogo sintético simplificado da halicondrina B, uma molécula isolada de uma esponja marinha rara, *Halichondria okadai* (141). Atualmente, é aprovada para pacientes pré-tratados e refratários à antraciclina e taxano com câncer de mama metastático e lipossarcoma metastático (258, 260). No contexto das neoplasias hematológicas, nosso estudo é pioneiro e abre a possibilidade de usar a eribulina para pacientes com essas doenças.

A eribulina é um inibidor de microtúbulos e exerce sua propriedade anticâncer principalmente pela inibição da tubulina e da mitose (142, 261, 262). Ao contrário de outros medicamentos antimitóticos, como vimblastina e paclitaxel, que atenuam as fases de encurtamento e crescimento da instabilidade dinâmica dos microtúbulos, a eribulina inibe o crescimento dos microtúbulos por um mecanismo de envenenamento final (142). Assim, ela não causa o encurtamento da tubulina, mas os transforma em agregados não produtivos (142).

No presente estudo, a eribulina apresentou um alto efeito citotóxico em células de câncer sanguíneo com impacto mínimo nos leucócitos normais. Em concordância, a eribulina tem sido relatada como um potente agente quimioterápico com um perfil de toxicidade baixo a moderado (263). O fenótipo celular observado para o tratamento com eribulina nas células de leucemia indicou que o mecanismo de ação celular primário do medicamento é conservado: bloqueio do ciclo celular em G₂/M e morte celular após parada mitótica prolongada e irreversível (142, 143, 264, 265).

Molecularmente, a eribulina reduziu a expressão e a atividade de STMN1, induziu a clivagem do PARP1 e a fosforilação do H2AX. STMN1 atua como marcador de proliferação de células hematopoiéticas normais e malignas, desempenhando um papel fundamental na progressão do ciclo celular e clonogenicidade em células de leucemia aguda (161, 168, 170). Recentemente, a expressão de STMN1 foi indicada como um alvo molecular da eribulina e associada à resposta ao medicamento (202). PARP1 é um dos substratos celulares das caspases e, quando é clivado e inativado

pelas caspases ativas 3 e 7, é considerado um indicador de apoptose, formando fragmentos de 24 kDa e 89 kDa (234, 235). H2AX é um componente do octâmero de histonas em nucleossomos que, na presença de danos ao DNA, é fosforilado na serina 139 (ou seja, H2AX), tornando-se assim um marcador de danos ao DNA (236). Em geral, o cenário molecular do tratamento de células de leucemia aguda com eribulina resultou em redução da proliferação celular, apoptose e danos ao DNA.

Apesar de sua importância para o arsenal antineoplásico, agentes antimicrotúbulos apresentam vários mecanismos de resistência que podem levar ao fracasso do tratamento e redução das taxas de sobrevivência (266). Assim, compreender os mecanismos de resistência relacionados à eribulina pode melhorar as taxas de resposta. Nos últimos anos, vários mecanismos foram relatados, especialmente a ativação da glicoproteína-P e vias mediadas por PI3K/AKT e NF- κ B (198, 199, 201, 203, 267). De fato, no presente estudo, a sensibilidade à eribulina foi associada aos níveis de expressão de ABCB1, ABCC1, p-AKT, p- NF- κ B e NF- κ B nas células de câncer sanguíneo.

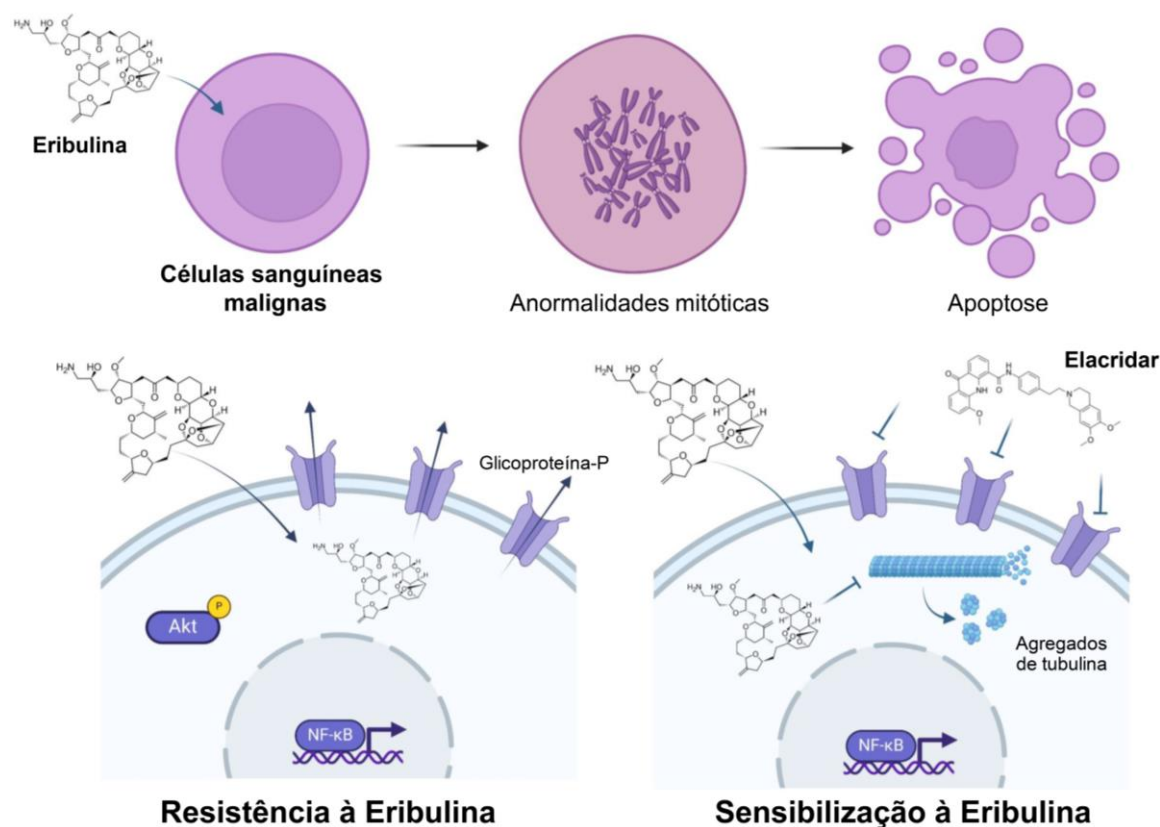
O fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR) representa um desafio no manejo terapêutico de várias neoplasias, uma vez que as células cancerosas tornam-se irresponsivas a muitos medicamentos antineoplásicos (268, 269). Vários mecanismos celulares e moleculares mediam esse processo complexo, e um dos mais explorados é o aumento dos transportadores de efluxo de drogas, responsáveis pela redução da concentração intracelular do fármaco (269-272). Estudos anteriores associaram a superexpressão da subfamília B dos membros de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) com a resistência à eribulina (198, 199, 273).

A ativação da via PI3K/AKT/mTOR contribui para o desenvolvimento tumoral e a resistência às terapias antineoplásicas (274). Um estudo anterior relatou que a ativação da via PI3K/AKT induz resistência primária ou adaptação precoce à eribulina em modelos de câncer de mama HER2-negativo (267). Da mesma forma, a regulação positiva da via NF- κ B aumentou a resistência à eribulina em modelos de câncer de mama (201, 203).

Em nosso estudo, o tratamento combinado de eribulina e elacridar aumentou significativamente a apoptose induzida pela eribulina em células de leucemia resistentes a medicamentos. Curiosamente, estudos anteriores relataram que o

elacridar melhorou a resposta a outros agentes quimioterápicos. Por exemplo, na leucemia mieloide crônica, a combinação de elacridar com imatinibe atenuou a resistência associada aos transportadores de efluxo de drogas (275). Além disso, o elacridar superou a resistência a inibidores da topoisomerase em cânceres de pulmão pequenas células (276) e gástrico (277). Adicionalmente, em câncer de próstata, foi demonstrado que a resistência ao olaparibe também poderia ser superada usando elacridar (278). Além disso, células de câncer oral altamente resistentes à eribulina, como as KBV20C, foram sensibilizadas por um co-tratamento com uma baixa dose de elacridar (279).

Figura 59. Representação esquemática dos efeitos da eribulina e elacridar sobre os modelos celulares leucêmicos.



A eribulina causa anormalidades mitóticas que induzem a apoptose em células sanguíneas malignas. A resistência à eribulina está associada a marcadores específicos, como NF-κB, p-AKT e glicoproteína-P. O elacridar, um inibidor da glicoproteína-P, potencializa os efeitos antineoplásicos da eribulina, sugerindo que o tratamento combinado pode superar a resistência à eribulina. Imagem do autor. Criado com BioRender.com.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados combinados de nossos estudos sobre STMN1 (**Parte I**), o composto sintético da classe dos ciclopenta[β]indóis (C2E1) (**Parte II**) e a eribulina (**Parte III**) destacam o potencial dos microtúbulos como alvos terapêuticos nas leucemias. Demonstramos que a STMN1 está implicada na diferenciação granulocítica e na progressão do ciclo celular na leucemia promielocítica aguda (LPA), enquanto o composto C2E1 exibe efeitos antineoplásicos na LPA e nas leucemias agudas (LMA e LLA), abrindo caminho para modificações moleculares que ampliem sua eficácia. Além disso, demonstramos que a eribulina interrompe a dinâmica dos microtúbulos e sugerimos estratégias de tratamento combinado para superar a resistência à própria eribulina. Nossos resultados fornecem uma compreensão aprofundada da dinâmica dos microtúbulos e abrem portas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para as leucemias, posicionando os microtúbulos como alvos promissores no tratamento dessas doenças hematológicas.

Na **Parte I**, em relação à STMN1 em LPA, nossos resultados mostraram que STMN1 estava altamente expresso em LPA, mas não teve efeito sobre os resultados clínicos. STMN1 foi reduzido durante a diferenciação granulocítica, e sua atividade foi modulada durante a progressão do ciclo celular em células PML::RAR α . Em modelos celulares de LPA, o agente farmacológico paclitaxel foi eficiente em induzir a estabilização dos microtúbulos, reduzir a viabilidade celular e aumentar a catástrofe mitótica como agente único ou combinado com ATRA, incluindo células resistentes ao ATRA. Nosso estudo fornece novas perspectivas sobre o papel de STMN1 e da dinâmica dos microtúbulos em LPA.

Na **Parte II**, em relação ao Composto 2 (C2) em LPA, o presente estudo identificou um novo ciclopenta[β]indol sintético que exibe efeitos antineoplásicos, induzindo desregulação do ciclo celular e apoptose nas linhagens celulares NB4 e NB4-R2. Nossa análise molecular exploratória identificou redução de marcadores de proliferação e estabilidade de tubulina, e indução de marcadores de dano ao DNA e apoptose. Esses resultados lançam luz sobre a relação estrutura-atividade dos ciclopenta[β]indóis, permitindo novas modificações moleculares para melhorar a potência e seletividade, aumentando o arsenal antineoplásico. Em relação a

ampliação do estudo dos enantiômeros de C2 (C2E1 e C2E2), aprimoramos a compreensão da ligação do composto à tubulina, o que pode sugerir modificações moleculares para aumentar sua eficácia. Além disso, utilizando um painel molecularmente heterogêneo de neoplasias hematológicas, o C2E1 exibiu efeitos antileucêmicos relevantes. Nossos resultados apontam para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes antimicrotúbulos sem resistência cruzada com agentes atualmente em uso clínico no tratamento oncológico.

Na **Parte III**, finalmente, em relação à eribulina em modelos celulares de leucemias agudas, nossos dados indicam que a eribulina interrompe a dinâmica dos microtúbulos e leva à catástrofe mitótica e morte celular em células de câncer sanguíneo. A expressão e ativação dos alvos relacionados a MDR1, PI3K/AKT e NF- κ B podem ser biomarcadores da resposta à eribulina em neoplasias hematológicas. Além disso, o tratamento combinado de eribulina com elacridar pode superar a resistência a medicamentos nessas doenças. Estudos futuros devem determinar se a eribulina pode ser reposicionada para tratar cânceres sanguíneos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kfoury Y, Mercier F, Scadden DT. SnapShot: The hematopoietic stem cell niche. *Cell*. 2014;158(1):228- e1.
2. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-36.
3. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. 2010;11(7):585-93.
4. Congdon KL, Reya T. Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):302-7.
5. Ceredig R, Rolink AG, Brown G. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(4):293-300.
6. Sysmex. Haematopoiesis. Disponível em: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/haematopoiesis/>.
7. Sive JI, Gottgens B. Transcriptional network control of normal and leukaemic haematopoiesis. *Exp Cell Res*. 2014;329(2):255-64.
8. Sachs L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4742-9.
9. Smith NM, Horne CH, Carpenter FH, Stigbrand T, Carlsson-Bostedt L. Immunohistochemical definition of antigenic determinants of pregnancy-associated alpha 2-glycoprotein (alpha 2-PAG) using monoclonal antibodies. *J Pathol*. 1988;154(4):329-34.
10. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-7.
11. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
12. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014;506(7488):328-33.
13. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-78.
14. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010;327(5965):542-5.
15. Hu D, Shilatifard A. Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. *Genes Dev*. 2016;30(18):2021-41.
16. Shimada A. Hematological malignancies and molecular targeting therapy. *Eur J Pharmacol*. 2019;862:172641.
17. Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov*. 2015;5(1):22-4.
18. Elert E. Living with leukaemia. *Nature*. 2013;498(7455):S2-3.

19. INCA. Estimativa | 2023 Incidência de Câncer no Brasil 2022 [Instituto Nacional de Câncer (INCA) / Ministério da Saúde]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>.
20. Ferlay J EM, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>.
21. INCA. Atlas on-line de mortalidade 2020 [Instituto Nacional de Câncer (INCA) / Ministério da Saúde]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>.
22. Tallman MS. Acute leukemias. Hematol Oncol Clin North Am. 2011;25(6):xi-xii.
23. Enright H, Bond J. Chronic leukemias. Dis Mon. 2008;54(4):242-55.
24. Zhao X, Li Y, Wu H. A novel scoring system for acute myeloid leukemia risk assessment based on the expression levels of six genes. Int J Mol Med. 2018;42(3):1495-507.
25. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015;373(12):1136-52.
26. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute leukemia. Emerg Med Clin North Am. 2014;32(3):579-96.
27. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2010;115(3):453-74.
28. Mayani H, Flores-Figueroa E, Chavez-Gonzalez A. In vitro biology of human myeloid leukemia. Leuk Res. 2009;33(5):624-37.
29. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. N Engl J Med. 2006;354(19):2034-45.
30. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976;33(4):451-8.
31. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
32. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. Blood. 2022;140(11):1200-28.
33. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2023;98(3):502-26.
34. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.

35. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(14):1051-62.
36. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368(9550):1894-907.
37. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
38. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-89.
39. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(1):35-63.
40. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2009;361(13):1249-59.
41. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2013;88(4):318-27.
42. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441.
43. Podoltsev NA, Stahl M, Zeidan AM, Gore SD. Selecting initial treatment of acute myeloid leukaemia in older adults. *Blood Rev*. 2017;31(2):43-62.
44. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Cavenagh J, Kjeldsen L, et al. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. *Blood*. 2015;125(25):3878-85.
45. He PF, Zhou JD, Yao DM, Ma JC, Wen XM, Zhang ZH, et al. Efficacy and safety of decitabine in treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(25):41498-507.
46. Chen Y, Yang T, Zheng X, Yang X, Zheng Z, Zheng J, et al. The outcome and prognostic factors of 248 elderly patients with acute myeloid leukemia treated with standard-dose or low-intensity induction therapy. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(30):e4182.
47. Cassileth PA, Harrington DP, Hines JD, Oken MM, Mazza JJ, McGlave P, et al. Maintenance chemotherapy prolongs remission duration in adult acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 1988;6(4):583-7.
48. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med*. 1994;331(14):896-903.
49. Sorrow ML, Storb RF, Sandmaier BM, Maziarz RT, Pulsipher MA, Maris MB, et al. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2014;32(29):3249-56.
50. Gupta V, Tallman MS, Weisdorf DJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood*. 2011;117(8):2307-18.

51. Bose P, Vachhani P, Cortes JE. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(3):17.
52. Forman SJ, Rowe JM. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult. *Blood*. 2013;121(7):1077-82.
53. Shah A, Andersson TM, Rachet B, Bjorkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol*. 2013;162(4):509-16.
54. Thomas X, Le Jeune C. Treatment of Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(1):2.
55. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CA, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011;117(8):2469-75.
56. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2020;395(10230):1146-62.
57. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;7(6):e577.
58. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(11):1645-66.
59. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2015;121(15):2517-28.
60. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999;17(12):3835-49.
61. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
62. Duffield AS, Mullighan CG, Borowitz MJ. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Arch*. 2023;482(1):11-26.
63. Yoon JH, Lee S. Diagnostic and therapeutic advances in adults with acute lymphoblastic leukemia in the era of gene analysis and targeted immunotherapy. *Korean J Intern Med*. 2024;39(1):34-56.
64. Shah A, John BM, Sondhi V. Acute lymphoblastic leukemia with treatment-naive Fanconi anemia. *Indian Pediatr*. 2013;50(5):508-10.
65. German J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;93(1):100-6.
66. Bielorai B, Fisher T, Waldman D, Lerenthal Y, Nissenkorn A, Tohami T, et al. Acute lymphoblastic leukemia in early childhood as the presenting sign of ataxia-telangiectasia variant. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013;30(6):574-82.

67. Chessells JM, Harrison G, Richards SM, Bailey CC, Hill FG, Gibson BE, et al. Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Arch Dis Child*. 2001;85(4):321-5.
68. Sehgal S, Mujtaba S, Gupta D, Aggarwal R, Marwaha RK. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010;53(1):63-7.
69. Geriniere L, Bastion Y, Dumontet C, Salles G, Espinouse D, Coiffier B. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. *Ann Oncol*. 1994;5(5):437-40.
70. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(11):1243-6.
71. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-64.
72. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012;22(2):153-66.
73. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Barta SK, Borate U, et al. Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(10):1240-79.
74. Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(11):1517-27.
75. Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010;150(4):389-405.
76. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2003;98(7):1337-54.
77. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1005-15.
78. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*. 2015;125(26):3977-87.
79. Gottlieb AJ, Weinberg V, Ellison RR, Henderson ES, Terebelo H, Rafla S, et al. Efficacy of daunorubicin in the therapy of adult acute lymphocytic leukemia: a prospective randomized trial by cancer and leukemia group B. *Blood*. 1984;64(1):267-74.
80. Scavino HF, George JN, Sears DA. Remission induction in adult acute lymphocytic leukemia. Use of vincristine and prednisone alone. *Cancer*. 1976;38(2):672-7.
81. Larson RA, Dodge RK, Burns CP, Lee EJ, Stone RM, Schulman P, et al. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood*. 1995;85(8):2025-37.

82. Narayanan S, Shami PJ. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;81(1):94-102.
83. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC Cooperative Study Group. *Br J Haematol*. 1988;68(4):487-94.
84. Rovelli A, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Conter V, Giudici G, Jankovic M, et al. Microgranular variant of acute promyelocytic leukemia in children. *J Clin Oncol*. 1992;10(9):1413-8.
85. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. Acute promyelocytic leukemia: biology and treatment. *Semin Oncol*. 1997;24(1):92-102.
86. Rowley JD, Golomb HM, Vardiman J, Fukuhara S, Dougherty C, Potter D. Further evidence for a non-random chromosomal abnormality in acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer*. 1977;20(6):869-72.
87. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;93(10):3167-215.
88. Mandelli F, Avvisati G, Lo Coco F. Advances in the understanding and management of acute promyelocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2002;6(1):60-71; discussion 86-7.
89. Menendez A, Gonzalez A, Cabrera H, Mesa J, Martinez G, Espinoza E, et al. Clinical spectrum of extramedullary acute promyelocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2000;64(3):201-3.
90. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-67.
91. Rego EM, Kim HT, Ruiz-Arguelles GJ, Undurraga MS, Uriarte Mdel R, Jacomo RH, et al. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. *Blood*. 2013;121(11):1935-43.
92. Avvisati G, Lo Coco F, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphologic features and prognostic factors. *Semin Hematol*. 2001;38(1):4-12.
93. Reiter A, Lengfelder E, Grimwade D. Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. *Acta Haematol*. 2004;112(1-2):55-67.
94. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008;111(5):2505-15.
95. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009;113(9):1875-91.
96. Zhou GB, Chen SJ, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: a model of molecular target based therapy. *Hematology*. 2005;10 Suppl 1:270-80.
97. Fenaux P, Chevret S, Guerci A, Fegueux N, Dombret H, Thomas X, et al. Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. European APL group. *Leukemia*. 2000;14(8):1371-7.

98. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol*. 2001;38(1):13-25.
99. Frankel SR, Eardley A, Lauwers G, Weiss M, Warrell RP, Jr. The "retinoic acid syndrome" in acute promyelocytic leukemia. *Ann Intern Med*. 1992;117(4):292-6.
100. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, et al. Clinical description of 44 patients with acute promyelocytic leukemia who developed the retinoic acid syndrome. *Blood*. 2000;95(1):90-5.
101. De Botton S, Dombret H, Sanz M, Miguel JS, Caillot D, Zittoun R, et al. Incidence, clinical features, and outcome of all trans-retinoic acid syndrome in 413 cases of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood*. 1998;92(8):2712-8.
102. Vahdat L, Maslak P, Miller WH, Jr., Eardley A, Heller G, Scheinberg DA, et al. Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RAR-alpha isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid. *Blood*. 1994;84(11):3843-9.
103. Di Noto R, Schiavone EM, Ferrara F, Manzo C, Lo Pardo C, Del Vecchio L. Expression and ATRA-driven modulation of adhesion molecules in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 1994;8(11):1900-5.
104. Dubois C, Schlageter MH, de Gentile A, Balitrand N, Toubert ME, Krawice I, et al. Modulation of IL-8, IL-1 beta, and G-CSF secretion by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 1994;8(10):1750-7.
105. Larson RS, Brown DC, Sklar LA. Retinoic acid induces aggregation of the acute promyelocytic leukemia cell line NB-4 by utilization of LFA-1 and ICAM-2. *Blood*. 1997;90(7):2747-56.
106. McClellan JS, Kohrt HE, Coutre S, Gotlib JR, Majeti R, Alizadeh AA, et al. Treatment advances have not improved the early death rate in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2012;97(1):133-6.
107. Gallagher RE, Moser BK, Racevskis J, Poire X, Bloomfield CD, Carroll AJ, et al. Treatment-influenced associations of PML-RARalpha mutations, FLT3 mutations, and additional chromosome abnormalities in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(10):2098-108.
108. Noguera NI, Catalano G, Banella C, Divona M, Faraoni I, Ottone T, et al. Acute Promyelocytic Leukemia: Update on the Mechanisms of Leukemogenesis, Resistance and on Innovative Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10).
109. Duprez E, Ruchaud S, Houge G, Martin-Thouvenin V, Valensi F, Kastner P, et al. A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features. *Leukemia*. 1992;6(12):1281-7.
110. Shao W, Benedetti L, Lamph WW, Nervi C, Miller WH, Jr. A retinoid-resistant acute promyelocytic leukemia subclone expresses a dominant negative PML-RAR alpha mutation. *Blood*. 1997;89(12):4282-9.
111. Kitamura K, Kiyoi H, Yoshida H, Saito H, Ohno R, Naoe T. Mutant AF-2 domain of PML-RARalpha in retinoic acid-resistant NB4 cells: differentiation induced by RA is triggered directly through PML-RARalpha and its down-regulation in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 1997;11(11):1950-6.

112. Nason-Burchenal K, Allopenna J, Begue A, Stehelin D, Dmitrovsky E, Martin P. Targeting of PML/RARalpha is lethal to retinoic acid-resistant promyelocytic leukemia cells. *Blood*. 1998;92(5):1758-67.
113. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):253-65.
114. Muroyama A, Lechler T. Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development*. 2017;144(17):3012-21.
115. Dogterom M, Koenderink GH. Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):38-54.
116. Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(12):711-26.
117. Janke C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol*. 2014;206(4):461-72.
118. Luduena RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol*. 1998;178:207-75.
119. Verdier-Pinard P, Wang F, Burd B, Angeletti RH, Horwitz SB, Orr GA. Direct analysis of tubulin expression in cancer cell lines by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry*. 2003;42(41):12019-27.
120. Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(1):18-24.
121. Ligon LA, Shelly SS, Tokito M, Holzbaur EL. The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization. *Mol Biol Cell*. 2003;14(4):1405-17.
122. Galmarini CM, Kamath K, Vanier-Viorner A, Hervieu V, Peiller E, Falette N, et al. Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1793-9.
123. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res*. 2002;62(9):2462-7.
124. Hayden JH, Bowser SS, Rieder CL. Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J Cell Biol*. 1990;111(3):1039-45.
125. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res*. 1996;56(4):816-25.
126. Cragg GM. Paclitaxel (Taxol): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med Res Rev*. 1998;18(5):315-31.
127. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med*. 1995;332(15):1004-14.
128. Liaw TY, Chang MH, Kavallaris M. The cytoskeleton as a therapeutic target in childhood acute leukemia: obstacles and opportunities. *Curr Drug Targets*. 2007;8(6):739-49.

129. Yared JA, Tkaczuk KH. Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Des Devel Ther.* 2012;6:371-84.
130. Vandecandelaere A, Martin SR, Engelborghs Y. Response of microtubules to the addition of colchicine and tubulin-colchicine: evaluation of models for the interaction of drugs with microtubules. *Biochem J.* 1997;323 (Pt 1)(Pt 1):189-96.
131. Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005;5(1):65-71.
132. Banyal A, Tiwari S, Sharma A, Chanana I, Patel SKS, Kulshrestha S, et al. Vinca alkaloids as a potential cancer therapeutics: recent update and future challenges. *3 Biotech.* 2023;13(6):211.
133. Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, He L, Horwitz SB, Norris MD, et al. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res.* 2001;61(15):5803-9.
134. McMahon CM, Luger SM. Relapsed T Cell ALL: Current Approaches and New Directions. *Curr Hematol Malig Rep.* 2019;14(2):83-93.
135. Haider K, Rahaman S, Yar MS, Kamal A. Tubulin inhibitors as novel anticancer agents: an overview on patents (2013-2018). *Expert Opin Ther Pat.* 2019;29(8):623-41.
136. Sivakumar G. Colchicine semisynthetics: chemotherapeutics for cancer? *Curr Med Chem.* 2013;20(7):892-8.
137. McLoughlin EC, O'Boyle NM. Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(1).
138. Shetty N, Gupta S. Eribulin drug review. *South Asian J Cancer.* 2014;3(1):57-9.
139. Jimenez PC, Wilke DV, Costa-Lotufo LV. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics (Sao Paulo).* 2018;73(suppl 1):e482s.
140. Dabydeen DA, Burnett JC, Bai R, Verdier-Pinard P, Hickford SJ, Pettit GR, et al. Comparison of the activities of the truncated halichondrin B analog NSC 707389 (E7389) with those of the parent compound and a proposed binding site on tubulin. *Mol Pharmacol.* 2006;70(6):1866-75.
141. Towle MJ, Salvato KA, Budrow J, Wels BF, Kuznetsov G, Aalfs KK, et al. In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Cancer Res.* 2001;61(3):1013-21.
142. Jordan MA, Kamath K, Manna T, Okouneva T, Miller HP, Davis C, et al. The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(7):1086-95.
143. Kuznetsov G, Towle MJ, Cheng H, Kawamura T, TenDyke K, Liu D, et al. Induction of morphological and biochemical apoptosis following prolonged mitotic blockage by halichondrin B macrocyclic ketone analog E7389. *Cancer Res.* 2004;64(16):5760-6.
144. Sebastian J, Rathinasamy K. Microtubules and Cell Division: Potential Pharmacological Targets in Cancer Therapy. *Curr Drug Targets.* 2023;24(11):889-918.

145. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9552-6.
146. Chen JG, Horwitz SB. Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Res*. 2002;62(7):1935-8.
147. Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell*. 1999;10(4):947-59.
148. Skibbens RV, Skeen VP, Salmon ED. Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J Cell Biol*. 1993;122(4):859-75.
149. Waters JC, Mitchison TJ, Rieder CL, Salmon ED. The kinetochore microtubule minus-end disassembly associated with poleward flux produces a force that can do work. *Mol Biol Cell*. 1996;7(10):1547-58.
150. De Donato M, Mariani M, Petrella L, Martinelli E, Zannoni GF, Vellone V, et al. Class III beta-tubulin and the cytoskeletal gateway for drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol*. 2012;227(3):1034-41.
151. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(3):194-204.
152. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*. 2002;53:615-27.
153. Isbrucker RA, Cummins J, Pomponi SA, Longley RE, Wright AE. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(1):75-82.
154. Marzaro G, Coluccia A, Ferrarese A, Brun P, Castagliuolo I, Conconi MT, et al. Discovery of biaryl aminoquinazolines as novel tubulin polymerization inhibitors. *J Med Chem*. 2014;57(11):4598-605.
155. Muhlradt PF, Sasse F. Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity. *Cancer Res*. 1997;57(16):3344-6.
156. La Regina G, Bai R, Coluccia A, Famigliini V, Pelliccia S, Passacantilli S, et al. New Indole Tubulin Assembly Inhibitors Cause Stable Arrest of Mitotic Progression, Enhanced Stimulation of Natural Killer Cell Cytotoxic Activity, and Repression of Hedgehog-Dependent Cancer. *J Med Chem*. 2015;58(15):5789-807.
157. Curmi PA, Gavet O, Charbaut E, Ozon S, Lachkar-Colmerauer S, Manceau V, et al. Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct Funct*. 1999;24(5):345-57.
158. Ozon S, Guichet A, Gavet O, Roth S, Sobel A. Drosophila stathmin: a microtubule-destabilizing factor involved in nervous system formation. *Mol Biol Cell*. 2002;13(2):698-710.
159. Steinmetz MO. Structure and thermodynamics of the tubulin-stathmin interaction. *J Struct Biol*. 2007;158(2):137-47.
160. Marklund U, Larsson N, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J*. 1996;15(19):5290-8.

161. Belletti B, Baldassarre G. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(11):1249-66.
162. Ng DC, Lin BH, Lim CP, Huang G, Zhang T, Poli V, et al. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *J Cell Biol*. 2006;172(2):245-57.
163. Verma NK, Dourlat J, Davies AM, Long A, Liu WQ, Garbay C, et al. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12349-62.
164. Wei Z, Jiang X, Qiao H, Zhai B, Zhang L, Zhang Q, et al. STAT3 interacts with Skp2/p27/p21 pathway to regulate the motility and invasion of gastric cancer cells. *Cell Signal*. 2013;25(4):931-8.
165. Liu X, Liu H, Liang J, Yin B, Xiao J, Li J, et al. Stathmin is a potential molecular marker and target for the treatment of gastric cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(4):6502-9.
166. Rubin CI, French DL, Atweh GF. Stathmin expression and megakaryocyte differentiation: a potential role in polyploidy. *Exp Hematol*. 2003;31(5):389-97.
167. Iancu-Rubin C, Gajzer D, Tripodi J, Najfeld V, Gordon RE, Hoffman R, et al. Down-regulation of stathmin expression is required for megakaryocyte maturation and platelet production. *Blood*. 2011;117(17):4580-9.
168. Machado-Neto JA, Saad ST, Traina F. Stathmin 1 in normal and malignant hematopoiesis. *BMB Rep*. 2014;47(12):660-5.
169. Ramlogan-Steel CA, Steel JC, Fathallah H, Iancu-Rubin C, Atweh GF. Stathmin 1 deficiency induces erythro-megakaryocytic defects leading to macrocytic anemia and thrombocythemia in Stathmin 1 knock out mice. *Blood Cells Mol Dis*. 2021;87:102522.
170. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, Favaro P, Lazarini M, Lorand-Metze I, Costa FF, et al. Stathmin 1 is involved in the highly proliferative phenotype of high-risk myelodysplastic syndromes and acute leukemia cells. *Leuk Res*. 2014;38(2):251-7.
171. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, Favaro P, Lazarini M, da Silva Santos Duarte A, Lorand-Metze I, et al. Stathmin 1 inhibition amplifies ruxolitinib-induced apoptosis in JAK2V617F cells. *Oncotarget*. 2015;6(30):29573-84.
172. Machado-Neto JA, Rodrigues Alves APN, Fernandes JC, Coelho-Silva JL, Scopim-Ribeiro R, Fenerich BA, et al. Paclitaxel induces Stathmin 1 phosphorylation, microtubule stability and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *Heliyon*. 2017;3(9):e00405.
173. Holmfeldt P, Sellin ME, Gullberg M. Upregulated Op18/stathmin activity causes chromosomal instability through a mechanism that evades the spindle assembly checkpoint. *Exp Cell Res*. 2010;316(12):2017-26.
174. Jeha S, Luo XN, Beran M, Kantarjian H, Atweh GF. Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cells. *Cancer Res*. 1996;56(6):1445-50.
175. Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, Wallenstein S, Atweh GF. Effects of stathmin inhibition on the mitotic spindle. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 5):909-16.

176. Zada AA, Geletu MH, Pulikkan JA, Muller-Tidow C, Reddy VA, Christopeit M, et al. Proteomic analysis of acute promyelocytic leukemia: PML-RAR α leads to decreased phosphorylation of OP18 at serine 63. *Proteomics*. 2006;6(21):5705-19.
177. Machado-Neto JA TF. Stathmin 1. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2015:126-36.
178. Carrouer TL AS, Tondeur S, Lhermitte L, Lamb N, Reme, T PV, Hamamah S, Klein B, De Vos J Amazonia!: An Online Resource to Google and Visualize Public Human whole Genome Expression Data. *The Open Bioinformatics Journal*. 2010;4:5-10.
179. Sanz MA, Lo Coco F, Martin G, Avvisati G, Rayon C, Barbui T, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*. 2000;96(4):1247-53.
180. Lin X, Qiao N, Shen Y, Fang H, Xue Q, Cui B, et al. Integration of Genomic and Transcriptomic Markers Improves the Prognosis Prediction of Acute Promyelocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2021;27(13):3683-94.
181. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
182. Kohl M, Wiese S, Warscheid B. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks. *Methods Mol Biol*. 2011;696:291-303.
183. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3448-9.
184. Vicari HP, Lima K, Gomes RDC, Fernandes DC, da Silva JCL, Rodrigues Junior MT, et al. Synthetic cyclopenta[b]indoles exhibit antineoplastic activity by targeting microtubule dynamics in acute myeloid leukemia cells. *Eur J Pharmacol*. 2021;894:173853.
185. Santos MS, Fernandes DC, Rodrigues MT, Jr., Regiani T, Andricopulo AD, Ruiz AL, et al. Diastereoselective Synthesis of Biologically Active Cyclopenta[b]indoles. *J Org Chem*. 2016;81(15):6626-39.
186. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 2003;34(2):374-8.
187. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
188. Mistry SJ, Atweh GF. Stathmin inhibition enhances okadaic acid-induced mitotic arrest: a potential role for stathmin in mitotic exit. *J Biol Chem*. 2001;276(33):31209-15.
189. Prota AE, Danel F, Bachmann F, Bargsten K, Buey RM, Pohlmann J, et al. The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J Mol Biol*. 2014;426(8):1848-60.

190. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 2012;4(1):17.
191. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc.* 2016;11(5):905-19.
192. Bietz S, Urbaczek S, Schulz B, Rarey M. Protoss: a holistic approach to predict tautomers and protonation states in protein-ligand complexes. *J Cheminform.* 2014;6:12.
193. Goodsell DS, Olson AJ. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins.* 1990;8(3):195-202.
194. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.* 1997;267(3):727-48.
195. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004;60(Pt 12 Pt 1):2126-32.
196. J. Gasteiger MM. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron.* 1980;36:3219-28.
197. Vicari HP, Lima K, Costa-Lotufo LV, Machado-Neto JA. Cellular and Molecular Effects of Eribulin in Preclinical Models of Hematologic Neoplasms. *Cancers (Basel).* 2022;14(24).
198. Nabekura T, Kawasaki T, Jimura M, Mizuno K, Uwai Y. Microtubule-targeting anticancer drug eribulin induces drug efflux transporter P-glycoprotein. *Biochem Biophys Rep.* 2020;21:100727.
199. Oba T, Izumi H, Ito KI. ABCB1 and ABCC11 confer resistance to eribulin in breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2016;7(43):70011-27.
200. Yahiro K, Matsumoto Y, Fukushi JI, Kawaguchi KI, Endo M, Setsu N, et al. Class III beta-Tubulin Overexpression Induces Chemoresistance to Eribulin in a Leiomyosarcoma Cell Line. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2018;2018:8987568.
201. Teng X, Hayashida T, Murata T, Nagayama A, Seki T, Takahashi M, et al. A transposon screen identifies enhancement of NF-kappaB pathway as a mechanism of resistance to eribulin. *Breast Cancer.* 2021;28(4):884-95.
202. Yoshie M, Ishida A, Ohashi H, Nakachi N, Azumi M, Tamura K. Stathmin dynamics modulate the activity of eribulin in breast cancer cells. *Pharmacol Res Perspect.* 2021;9(4):e00786.
203. Lai TC, Fang CY, Jan YH, Hsieh HL, Yang YF, Liu CY, et al. Kinase shRNA screening reveals that TAOK3 enhances microtubule-targeted drug resistance of breast cancer cells via the NF-kappaB signaling pathway. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):164.
204. Hanash SM, Strahler JR, Kuick R, Chu EH, Nichols D. Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *J Biol Chem.* 1988;263(26):12813-5.
205. Jiang W, Huang S, Song L, Wang Z. STMN1, a prognostic predictor of esophageal squamous cell carcinoma, is a marker of the activation of the PI3K pathway. *Oncol Rep.* 2018;39(2):834-42.

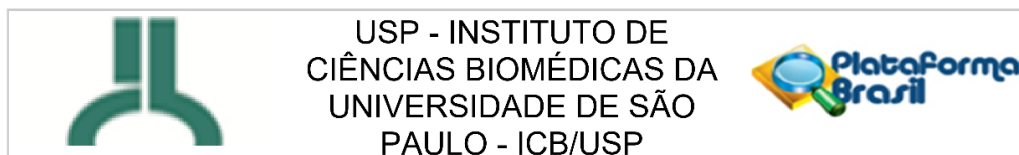
206. Li M, Yang J, Zhou W, Ren Y, Wang X, Chen H, et al. Activation of an AKT/FOXO1/STMN1 pathway drives resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Br J Cancer*. 2017;117(7):974-83.
207. Carlos J, Lima K, Costa-Lotufo LV, Leitao A, Machado-Neto JA. AD80, a multikinase inhibitor, exhibits antineoplastic effects in acute leukemia cellular models targeting the PI3K/STMN1 axis. *Invest New Drugs*. 2021;39(4):1139-49.
208. Tang J, Luo Y, Wu G. A glycolysis-related gene expression signature in predicting recurrence of breast cancer. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(24):24983-94.
209. Xu Z, Xu L, Liu L, Li H, Jin J, Peng M, et al. A Glycolysis-Related Five-Gene Signature Predicts Biochemical Recurrence-Free Survival in Patients With Prostate Adenocarcinoma. *Front Oncol*. 2021;11:625452.
210. Chappell J, Dalton S. Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(12):a014381.
211. Holmfeldt P, Brannstrom K, Stenmark S, Gullberg M. Aneugenic activity of Op18/stathmin is potentiated by the somatic Q18-->e mutation in leukemic cells. *Mol Biol Cell*. 2006;17(7):2921-30.
212. Esposito MT, Zhao L, Fung TK, Rane JK, Wilson A, Martin N, et al. Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. *Nat Med*. 2015;21(12):1481-90.
213. Faraoni I, Compagnone M, Lavorgna S, Angelini DF, Cencioni MT, Piras E, et al. BRCA1, PARP1 and gammaH2AX in acute myeloid leukemia: Role as biomarkers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(3):462-72.
214. Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy. *Cancers (Basel)*. 2015;7(4):2360-71.
215. Baran PS, Richter JM. Enantioselective total syntheses of welwitindolinone A and fischerindoles I and G. *J Am Chem Soc*. 2005;127(44):15394-6.
216. Richter JM, Ishihara Y, Masuda T, Whitefield BW, Llamas T, Pohjakallio A, et al. Enantiospecific total synthesis of the hapalindoles, fischerindoles, and welwitindolinones via a redox economic approach. *J Am Chem Soc*. 2008;130(52):17938-54.
217. Uhlig S, Botha CJ, Vralstad T, Rolen E, Miles CO. Indole-diterpenes and ergot alkaloids in *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) infected with *Claviceps cynodontis* from an outbreak of tremors in cattle. *J Agric Food Chem*. 2009;57(23):11112-9.
218. Levesque JF, Day SH, Chauret N, Seto C, Trimble L, Bateman KP, et al. Metabolic activation of indole-containing prostaglandin D2 receptor 1 antagonists: impacts of glutathione trapping and glucuronide conjugation on covalent binding. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(11):3038-43.
219. Nicoll-Griffith DA, Seto C, Aubin Y, Levesque JF, Chauret N, Day S, et al. In vitro biotransformations of the prostaglandin D2 (DP) antagonist MK-0524 and synthesis of metabolites. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(2):301-4.
220. Qiao MF, Ji NY, Liu XH, Li K, Zhu QM, Xue QZ. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(19):5677-80.

221. Ratni H, Blum-Kaelin D, Dehmlow H, Hartman P, Jablonski P, Masciadri R, et al. Discovery of tetrahydro-cyclopenta[b]indole as selective LXRs modulator. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(6):1654-7.
222. Roll DM, Barbieri LR, Bigelis R, McDonald LA, Arias DA, Chang LP, et al. The lecanindoles, nonsteroidal progestins from the terrestrial fungus *Verticillium lecanii* 6144. *J Nat Prod*. 2009;72(11):1944-8.
223. Sturino CF, O'Neill G, Lachance N, Boyd M, Berthelette C, Labelle M, et al. Discovery of a potent and selective prostaglandin D2 receptor antagonist, [(3R)-4-(4-chloro-benzyl)-7-fluoro-5-(methylsulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[b]indol-3-yl]-acetic acid (MK-0524). *J Med Chem*. 2007;50(4):794-806.
224. Talaz O, Gulcin I, Goksu S, Saracoglu N. Antioxidant activity of 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indoles containing substituents on dihydroindeno part. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(18):6583-9.
225. Wong DC, Fong WP, Lee SS, Kong YC, Cheng KF, Stone G. Induction of estradiol-2-hydroxylase and ethoxyresorufin-O-deethylase by 3-substituted indole compounds. *Eur J Pharmacol*. 1998;362(1):87-93.
226. Ulrik S, Sørensen EP-V. Synthesis of Cyclopenta[b]indol-1-ones and Carbazol-4-ones from N-(2-Halophenyl)-Substituted Enaminones by Intramolecular Heck Reaction. *Helvetica*. 2004;87(1):82-9.
227. Xu B, Guo ZL, Jin WY, Wang ZP, Peng YG, Guo QX. Multistep one-pot synthesis of enantioenriched polysubstituted cyclopenta[b]indoles. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(4):1059-62.
228. Lowenberg B, van Putten WL, Touw IP, Delwel R, Santini V. Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1993;328(9):614-9.
229. Idres N, Benoit G, Flexor MA, Lanotte M, Chabot GG. Granulocytic differentiation of human NB4 promyelocytic leukemia cells induced by all-trans retinoic acid metabolites. *Cancer Res*. 2001;61(2):700-5.
230. Shao W, Fanelli M, Ferrara FF, Riccioni R, Rosenauer A, Davison K, et al. Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(2):124-33.
231. Duprez E, Benoit G, Flexor M, Lillehaug JR, Lanotte M. A mutated PML/RARA found in the retinoid maturation resistant NB4 subclone, NB4-R2, blocks RARA and wild-type PML/RARA transcriptional activities. *Leukemia*. 2000;14(2):255-61.
232. Baljevic M, Park JH, Stein E, Douer D, Altman JK, Tallman MS. Curing all patients with acute promyelocytic leukemia: are we there yet? *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(6):1215-33, viii.
233. Biaoxue R, Xiguang C, Hua L, Shuanying Y. Stathmin-dependent molecular targeting therapy for malignant tumor: the latest 5 years' discoveries and developments. *J Transl Med*. 2016;14(1):279.
234. Castri P, Lee YJ, Ponzio T, Maric D, Spatz M, Bembry J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and its cleavage products differentially modulate cellular protection through NF-kappaB-dependent signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(3):640-51.

235. Desroches A, Denault JB. Caspase-7 uses RNA to enhance proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase 1 and other RNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(43):21521-8.
236. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22(3):305-9.
237. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*. 1999;146(5):905-16.
238. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-68.
239. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*. 2014;6(6):442-57.
240. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004;23(16):2825-37.
241. Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9).
242. Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ, Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 2013;793:1-19.
243. Morsi RZ, Hage-Sleiman R, Kobeissy H, Dbaibo G. Noxa: Role in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(10):914-28.
244. Roos WP, Frohnapfel L, Quiros S, Ringel F, Kaina B. XRCC3 contributes to temozolomide resistance of glioblastoma cells by promoting DNA double-strand break repair. *Cancer Lett*. 2018;424:119-26.
245. Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med Res Rev*. 2008;28(1):155-83.
246. Liu J, Gao R, Gu X, Yu B, Wu Y, Li Q, et al. A New Insight into Toxicity of Colchicine Analogues by Molecular Docking Analysis Based on Intestinal Tight Junction Protein ZO-1. *Molecules*. 2022;27(6).
247. Denisenko TV, Sorokina IV, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitotic catastrophe and cancer drug resistance: A link that must to be broken. *Drug Resist Updat*. 2016;24:1-12.
248. Esquer H, Zhou Q, Abraham AD, LaBarbera DV. Advanced High-Content-Screening Applications of Clonogenicity in Cancer. *SLAS Discov*. 2020;25(7):734-43.
249. Yoshida GJ, Saya H. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Sci*. 2016;107(1):5-11.
250. Bighetti-Trevisan RL, Sousa LO, Castilho RM, Almeida LO. Cancer Stem Cells: Powerful Targets to Improve Current Anticancer Therapeutics. *Stem Cells Int*. 2019;2019:9618065.
251. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124-34.

252. Favaro P, Traina F, Machado-Neto JA, Lazarini M, Lopes MR, Pereira JK, et al. FMNL1 promotes proliferation and migration of leukemia cells. *J Leukoc Biol.* 2013;94(3):503-12.
253. Zepeda-Moreno A, Saffrich R, Walenda T, Hoang VT, Wuchter P, Sanchez-Enriquez S, et al. Modeling SDF-1-induced mobilization in leukemia cell lines. *Exp Hematol.* 2012;40(8):666-74.
254. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* 2005;106(6):1901-10.
255. Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 1998;91(12):4523-30.
256. Deak D, Gorcea-Andronic N, Sas V, Teodorescu P, Constantinescu C, Iluta S, et al. A narrative review of central nervous system involvement in acute leukemias. *Ann Transl Med.* 2021;9(1):68.
257. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, et al. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2021;296:100046.
258. Cortes J, O'Shaughnessy J, Loesch D, Blum JL, Vahdat LT, Petrakova K, et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *Lancet.* 2011;377(9769):914-23.
259. Peerzada MN, Dar MS, Verma S. Development of tubulin polymerization inhibitors as anticancer agents. *Expert Opin Ther Pat.* 2023;33(11):797-820.
260. Schoffski P, Chawla S, Maki RG, Italiano A, Gelderblom H, Choy E, et al. Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet.* 2016;387(10028):1629-37.
261. Okouneva T, Azarenko O, Wilson L, Littlefield BA, Jordan MA. Inhibition of centromere dynamics by eribulin (E7389) during mitotic metaphase. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(7):2003-11.
262. Smith JA, Wilson L, Azarenko O, Zhu X, Lewis BM, Littlefield BA, et al. Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. *Biochemistry.* 2010;49(6):1331-7.
263. Sekar P, Ravitchandirane R, Khanam S, Muniraj N, Cassinadane AV. Novel molecules as the emerging trends in cancer treatment: an update. *Med Oncol.* 2022;39(2):20.
264. Towle MJ, Salvato KA, Wels BF, Aalfs KK, Zheng W, Seletsky BM, et al. Eribulin induces irreversible mitotic blockade: implications of cell-based pharmacodynamics for in vivo efficacy under intermittent dosing conditions. *Cancer Res.* 2011;71(2):496-505.
265. Doodhi H, Protá AE, Rodríguez-García R, Xiao H, Custar DW, Bargsten K, et al. Termination of Protofilament Elongation by Eribulin Induces Lattice Defects that Promote Microtubule Catastrophes. *Curr Biol.* 2016;26(13):1713-21.

266. Cermak V, Dostal V, Jelinek M, Libusova L, Kovar J, Rosel D, et al. Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *Eur J Cell Biol.* 2020;99(4):151075.
267. Gris-Oliver A, Ibrahim YH, Rivas MA, Garcia-Garcia C, Sanchez-Guixé M, Ruiz-Pace F, et al. PI3K activation promotes resistance to eribulin in HER2-negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2021;124(9):1581-91.
268. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):219-34.
269. Li W, Zhang H, Assaraf YG, Zhao K, Xu X, Xie J, et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist Updat.* 2016;27:14-29.
270. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(10):714-26.
271. Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, Norris MD, Haber M. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist Updat.* 2016;26:1-9.
272. Assaraf YG, Brozovic A, Goncalves AC, Jurkovicova D, Line A, Machuqueiro M, et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 2019;46:100645.
273. Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? *Drug Metab Dispos.* 2014;42(4):623-31.
274. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 2014;46(6):372-83.
275. Alves R, Goncalves AC, Jorge J, Almeida AM, Sarmiento-Ribeiro AB. Combination of Elacridar with Imatinib Modulates Resistance Associated with Drug Efflux Transporters in Chronic Myeloid Leukemia. *Biomedicines.* 2022;10(5).
276. Omori M, Noro R, Seike M, Matsuda K, Hirao M, Fukuizumi A, et al. Inhibitors of ABCB1 and ABCG2 overcame resistance to topoisomerase inhibitors in small cell lung cancer. *Thorac Cancer.* 2022;13(15):2142-51.
277. Bar-Zeev M, Kelmansky D, Assaraf YG, Livney YD. beta-Casein micelles for oral delivery of SN-38 and elacridar to overcome BCRP-mediated multidrug resistance in gastric cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;133:240-9.
278. Lombard AP, Liu C, Armstrong CM, D'Abronzio LS, Lou W, Chen H, et al. Overexpressed ABCB1 Induces Olaparib-Taxane Cross-Resistance in Advanced Prostate Cancer. *Transl Oncol.* 2019;12(7):871-8.
279. Park Y, Son JY, Lee BM, Kim HS, Yoon S. Highly Eribulin-resistant KBV20C Oral Cancer Cells Can Be Sensitized by Co-treatment with the Third-generation P-Glycoprotein Inhibitor, Elacridar, at a Low Dose. *Anticancer Res.* 2017;37(8):4139-46.

ANEXO**Parecer consubstanciado do Conselho de ética e pesquisa em seres humanos****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Análise compreensiva de dados genômicos para identificação e validação de novos alvos terapêuticos envolvidos na regulação de citoesqueleto em leucemias agudas e crônicas

Pesquisador: João Agostinho Machado Neto

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 39510920.1.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.656.394

Apresentação do Projeto:

Trata-se de proposta de emenda ao projeto "Análise compreensiva de dados genômicos para identificação e validação de novos alvos terapêuticos envolvidos na regulação de citoesqueleto em leucemias agudas e crônicas".

Pesquisador Responsável: João Agostinho Machado Neto."

Solicita-se na emenda autorização para formação de biorrepositório que está justificada pelo texto do pesquisador e que segue: "o uso de amostras armazenadas para pesquisas futuras relacionadas a neoplasias hematológicas e outras doenças associadas a disfunções sanguíneas justifica-se por deficiência de conhecimento sobre a fisiopatologia e à limitação das opções terapêuticas em muitos contextos associados a essas doenças, especialmente quando há falha das terapias atuais...

"serão coletadas amostras de derivadas de sangue periférico e medula óssea. Uma vez que essas amostras são coletadas, é importante armazená-las para utilização em pesquisas futuras devido ao fato que essas amostras têm um valor inestimável para a pesquisa básica e pré-clínica no momento do diagnóstico e antes de qualquer tratamento, momento em que a carga de células malignas está maior."

O texto a seguir foi extraído de "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2002439_E3.pdf, postado em 25/08/2022.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

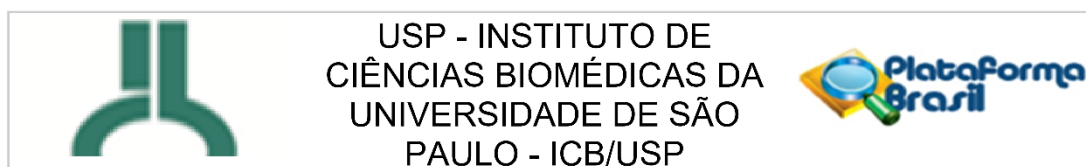
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 5.656.394

"Amostras sangue periférico ou medula óssea dos pacientes com leucemias agudas (Leucemia mieloide aguda e Leucemia Linfoblástica aguda) e amostras de sangue periférico dos pacientes com leucemia crônica (leucemia linfocítica crônica) serão prospectivamente colhidas dos pacientes adultos (> 18 anos) que preencham os seguintes critérios: (i) Diagnóstico de LMA, LLA ou LLC confirmado conforme rotina institucional; (ii)

As amostras serão coletadas no momento do diagnóstico ou recaída antes de qualquer tratamento. Para o grupo controle amostras de sangue periférico de doadores saudáveis serão prospectivamente colhidas de indivíduos adultos (>18 anos) que preencham os seguintes critérios: (i) Ausência de diagnóstico de qualquer tipo de neoplasia.. Serão incluídos pacientes diagnosticados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). As amostras serão submetidas à extração de RNA para investigação da expressão de genes de interesse e submetidas à separação de células para investigação dos efeitos de fármacos de interesse do presente projeto in vitro (ensaios de viabilidade celular, apoptose e investigação de vias de sinalização celular). Prevemos a inclusão de 50 pacientes com leucemias agudas, 30 pacientes com leucemia crônica e 15 indivíduos saudáveis."

Critério de Inclusão: Idade maior ou igual a 18 anos, diagnóstico primário de LMA, LLA ou LLC paciente com LMA, LLA ou LLC proveniente de recaída, não ter recebido nenhum tratamento farmacológico no diagnóstico ou após a recaída.

Critério de Exclusão: Idade menor a 18 anos, diagnóstico primário de LMA, LLA ou LLC que já tenha iniciado o tratamento quimioterápico, paciente com LMA, LLA ou LLC proveniente de recaída que já reiniciou o tratamento farmacológico."

Objetivo da Pesquisa:

O texto a seguir foi extraído de "PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_2002439_E3.pdf, postado em 25/08/2022. "Os objetivos deste projeto são (i) Identificar genes reguladores de citoesqueleto celular, cuja expressão diferencial prediz o desfecho clínico em pacientes com leucemia aguda; (ii) Verificar o impacto da inibição (farmacológica e/ou genética) dos genes selecionados sob a viabilidade, proliferação, clonogenicidade, apoptose e modulação em vias de sinalização em modelos de leucemias agudas e crônicas in vitro e in vivo. Nossa expectativa é gerar provas-de-conceito para identificação de novos alvos e o desenvolvimento de tratamentos que atuem no citoesqueleto celular de forma seletiva para as células neoplásicas."

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

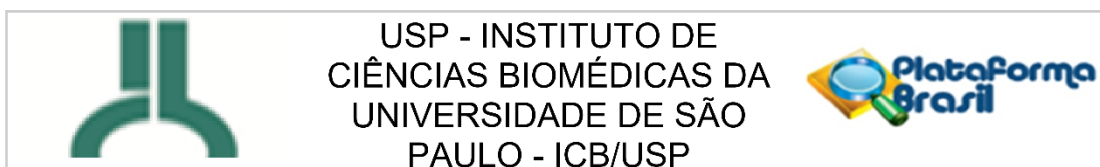
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 5.656.394

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O texto a seguir foi extraído de "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2002439_E3.pdf, postado em 25/08/2022.

"Riscos: O local da coleta de sangue ou medula óssea pode ficar roxo e/ou dolorido. Tontura ou infecção no local da coleta pode ocorrer raramente. A coleta de sangue será realizada com material descartável por pessoal treinado e experiente. Não são descritas sequelas ou complicações tardias para o referido procedimento.

Benefícios: Os participantes não terão nenhum benefício direto por fazer parte deste estudo."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa unicêntrica, desenvolvido em Instituição nacional, de caráter acadêmico.

Projeto bem estruturado e bem planejado. Objetivos claros e relevantes. Hipótese viável. Métodos adequados para atingir os objetivos. O grupo tem experiência no tema do estudo. Serão utilizadas amostras armazenadas em biorrepositório, cuja formação está sendo solicitada. Critérios de inclusão e exclusão bem definidos. Previsão de seleção de 95 participantes distribuídos em quatro grupos: um grupo controle e tres grupos constituídos por participantes portadores de cada um dos tipos de leucemia.

Previsão de início: 01/02/2021 (submissão inicial); Previsão de término: 31/01/2025.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de Apresentação Obrigatória foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências..."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que o pedido de emenda está bem justificado, conclui-se pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar a emenda ao projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

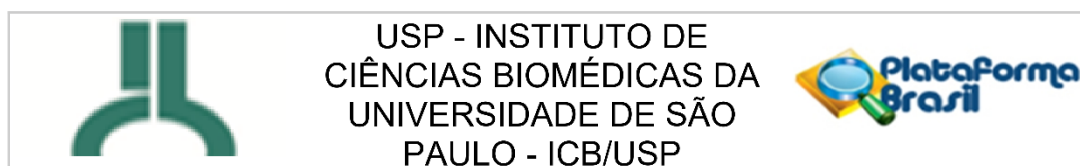
UF: SP

Telefone: (11)3091-7733

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 5.656.394

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	justificativa_26AGO22.pdf	29/08/2022 08:48:47	JANICLEIDE DE LIRA MONTEIRO	Aceito
Outros	declaracao_biorrepositorioassinado.pdf	29/08/2022 08:48:31	JANICLEIDE DE LIRA MONTEIRO	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2002439_E3.pdf	25/08/2022 10:58:19		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Participante_livia.pdf	25/08/2022 10:55:15	JEAN CARLOS LIPRERI DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_emenda.pdf	09/09/2021 14:49:57	JEAN CARLOS LIPRERI DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_biorrepositorio_emenda.pdf	04/09/2021 12:50:24	JEAN CARLOS LIPRERI DA SILVA	Aceito
Declaração de concordância	Anuencia_participantes.pdf	04/09/2021 12:49:47	JEAN CARLOS LIPRERI DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adulto_emenda.pdf	04/09/2021 12:49:23	JEAN CARLOS LIPRERI DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_CEP_emenda.pdf	04/09/2021 12:49:11	JEAN CARLOS LIPRERI DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Setembro de 2022

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br