



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

ANA BEATRIZ DA LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS EM
MODELO DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

FORTALEZA-CE

2025

ANA BEATRIZ DA LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS EM
MODELO DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências médicas da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências médicas.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Carvalho
Montenegro

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Pantoja
Mesquita

FORTALEZA
2025

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Universidade Federal do
Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- L1a LIMA, Ana Beatriz da.
Avaliação do efeito anticâncer de naftoquinonas sintéticas em modelo de leucemia
mielóide aguda / Ana Beatriz da Lima. – 2025.
67 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.
Coorientação: Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita.
1. Naftoquinonas. 2. Leucemia mieloide Aguda. 3. Citotoxicidade. 4. Apoptose. 5.
Espécies reativas de oxigênio. I. Título.

CDD 610

ANA BEATRIZ DA LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS EM
MODELO DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências médicas da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências médicas.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Carvalho
Montenegro

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof.^a Dra. Mariana Brito Dantas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e aos meus guias espirituais, que me acompanham nessa jornada rumo à construção do meu futuro. Sempre me aconselhando e mostrando os melhores caminhos a seguir, eles são o alicerce da minha força. Sem Deus e sem eles, eu não seria nada, nem teria conseguido chegar tão longe ou alcançar meus objetivos da forma que tem acontecido. Gostaria de dedicar um agradecimento especial a uma criança que me inspirou profundamente, me fez acreditar que eu era capaz de conquistar tudo o que almejava. Muito obrigada, Mariazinha, por ser a minha luz e o meu farol no momento certo!

Agradeço à minha mãe, que sempre me deu o apoio necessário, pegou na minha mão e enfrentou os desafios do mundo ao meu lado. Há uma frase que ela sempre me diz e que me dá forças: “Não se preocupe, minha filha, eu pegarei na sua mão, e seremos eu e você contra o mundo.” Desde então, nunca temo os desafios que aparecem, pois sei que, se fraquejar, ela estará ali para segurar a minha mão e lutar ao meu lado. Mãe, você é a minha maior inspiração, como mulher e como profissional. Sei que não foi fácil me criar sozinha e me educar para ser quem sou hoje, mas você fez isso de forma exemplar. Obrigada por ser meu maior exemplo. Eu te amo!

Agradeço à minha avó. Apesar de não estar mais presente fisicamente, sinto que ela está comigo em espírito. Vó, sinto tanto a sua falta, mas sei que, de onde está, a senhora olha e ora por mim, assim como fazia em vida. Dedico esse mestrado à senhora! Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelo colo e pelas palavras de conforto nos momentos mais difíceis. Lembro-me de quando recebi o primeiro “não” na minha vida acadêmica. A senhora me colocou no colo, fez carinho em minha cabeça e disse: “Oh, minha menina, não se preocupe, você vai conseguir de novo. Eu sei que vai. Vou rezar meus terços, e com a força de Deus e de Nossa Senhora, você vai alcançar seus sonhos.” Espero estar te orgulhando. Eu te amo, vó!

Ao meu amigo, irmão e pai de santo, Ramon Castro, agradeço profundamente. Você foi um presente indispensável na minha vida, sempre me aconselhando, motivando e ajudando nesta caminhada. Sua presença traz cor ao mundo, e você será sempre muito amado por mim e pela minha mãe. Estaremos juntos até o fim! A minha melhor amiga, Mariana, minha pessoa, agradeço por estar ao meu lado em todas as situações, sejam elas apocalípticas ou sérias. Nossa conexão transcende esta vida, e a distância nunca será capaz de diminuir a nossa amizade. São apenas quilômetros insignificantes diante do amor que sinto por você. Te amo, amiga!

Aos meus amigos e colegas de laboratório, meu muito obrigado por serem uma equipe incrível e companheiros de jornada. Juntos, conquistaremos grandes objetivos! Agradeço especialmente aos professores Pedro Souza e Felipe Mesquita, que sempre me socorrem nos momentos mais caóticos dos experimentos e que compartilham seu vasto conhecimento comigo. Suas conversas durante os almoços me fazem perceber o quanto sou sortuda em ter dois grandes cientistas e profissionais como inspiração. Um agradecimento especial à minha amiga e colega de laboratório, Daiane Maria, que desde o início me ajuda, compartilhando seus conhecimentos e me apoiando incondicionalmente. Você é um anjo que o mestrado trouxe para a minha vida. Obrigada por ser essa amiga incrível e sensacional!

Agradeço também ao meu amigo Emerson Lucena, por me ajudar sempre que preciso, por toda a paciência, por todo o ensinamento e conselhos, obrigada amigo!

À minha orientadora, minha profunda gratidão por sempre me receber de braços abertos, acreditar no meu potencial e me oferecer os puxões de orelha necessários. Seu apoio foi essencial para o meu crescimento pessoal e como cientista. Obrigada por fazer parte desta jornada tão crucial para a minha vida.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento, como CAPES, FUNCAP e CNPq, bem como ao Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), por tornarem possível a realização desta pesquisa.

RESUMO

O câncer, incluindo a leucemia mieloide aguda (LMA), permanece como uma das principais causas de mortalidade global, evidenciando a necessidade urgente de desenvolver terapias inovadoras e direcionadas. Neste estudo, investigou-se inicialmente o efeito citotóxico de derivados de naftoquinonas em um painel de diferentes linhagens tumorais. Entre elas, a linhagem celular HL60 foi selecionada como modelo experimental de leucemia promielocítica aguda, e as moléculas LC04 e LC14 destacaram-se por seu alto potencial terapêutico. Foram realizados ensaios de viabilidade celular (Alamar Blue), integridade de membrana (iodeto de propídeo), ciclo celular, microscopia eletrônica de varredura (MEV), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e expressão gênica (RT-qPCR). Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM ou CI50 com intervalo de confiança de 95%, obtidos por regressão não linear. As análises quantitativas foram baseadas em três experimentos independentes, e a significância estatística foi determinada por ANOVA, seguida dos testes de Bonferroni ou Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Prism 5.0 (GraphPad Software). Nos resultados obtidos, as moléculas LC04 e LC14 apresentaram CI50 de 0,74 μ M e 1,08 μ M, respectivamente. No ciclo celular, LC14 reduziu a fase G0/G1 (34,40%) e aumentou a população Sub-G1 (13,60%), indicando fragmentação de DNA, enquanto LC04 causou parada na fase G0/G1 e reduziu a fase S (22,30%). Ambas as moléculas induziram alterações morfológicas observadas por MEV, com LC14 provocando danos celulares mais severos. No ensaio de EROs, LC04 e LC14 elevaram significativamente os níveis de estresse oxidativo após 3 horas (12% e 15%, respectivamente) e 6 horas (35% e 45%, respectivamente). A expressão gênica revelou que LC14 reduziu BCL2 e aumentou BAX, enquanto ambas as moléculas induziram TP53, com LC04 apresentando maior impacto ($p < 0,01$). LC14 também elevou H2AFX e reduziu PARP1, sugerindo indução de danos ao DNA. Esses achados reforçam o potencial terapêutico de LC04 e LC14, evidenciando suas características moleculares promissoras.

Palavras-chave: Naftoquinonas. Leucemia Mieloide Aguda. Citotoxicidade. Apoptose. Espécies Reativas De Oxigênio.

ABSTRACT

Cancer, including acute myeloid leukemia (AML), remains a major cause of global mortality, highlighting the urgent need for innovative and targeted therapies. In this study, we initially investigated the cytotoxic effects of naphthoquinone derivatives in a panel of different tumor cell lines. Among them, the HL60 cell line was selected as an experimental model of acute promyelocytic leukemia, with the molecules LC04 and LC14 standing out due to their high therapeutic potential. Cell viability (Alamar Blue), membrane integrity (propidium iodide), cell cycle analysis, scanning electron microscopy (SEM), reactive oxygen species (ROS) production, and gene expression (RT-qPCR) assays were performed. Data were expressed as mean $\pm$ SEM or IC₅₀ with a 95% confidence interval, obtained through nonlinear regression. Quantitative analyses were based on three independent experiments, and statistical significance was determined using ANOVA, followed by Bonferroni or Tukey post hoc tests ($p < 0.05$), using Prism 5.0 software (GraphPad Software). The results showed that LC04 and LC14 had IC₅₀ values of 0.74 μ M and 1.08 μ M, respectively. Regarding the cell cycle, LC14 reduced the G₀/G₁ phase (34.40%) and increased the Sub-G₁ population (13.60%), indicating DNA fragmentation, while LC04 induced G₀/G₁ phase arrest and decreased the S phase (22.30%). Both molecules caused morphological alterations observed by SEM, with LC14 inducing more severe cellular damage. In the ROS assay, LC04 and LC14 significantly increased oxidative stress levels after 3 h (12% and 15%, respectively) and 6 h (35% and 45%, respectively). Gene expression analysis revealed that LC14 downregulated BCL2 and upregulated BAX, while both molecules induced TP53 expression, with LC04 having a greater impact ($p < 0.01$). Additionally, LC14 upregulated H2AFX and downregulated PARP1, suggesting the induction of DNA damage. These findings reinforce the therapeutic potential of LC04 and LC14, highlighting their promising molecular characteristics.

Keywords: Naphthoquinones. Acute Myeloid Leukemia. Cytotoxicity. Apoptosis. Reactive Oxygen Species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características fenotípicas associadas ao desenvolvimento do câncer.....	12
Figura 2 – Imagem ilustrando etapas da hematopoese.....	13
Figura 3 – Ilustração da translocação entre os cromossomos 15 e 17.....	18
Figura 4 – Análise de concentração única nas linhagens de leucemia promielocítica aguda HL60 e tumores sólidos AGP-01 e HCT-116.....	37
Figura 5 – Análise da alteração da integridade da membrana da linhagem celular HL60.....	39
Figura 6 – As moléculas LC04 e LC14 induzem fragmentação no DNA e bloqueio no ciclo celular nas na linhagem HL60.....	41
Figura 7 – Análise de MEV das células HL60 após exposição às moléculas LC04 e LC14 e Doxorubicina a uma concentração de 1 μ M.....	42
Figura 8 – A exposição aos compostos LC04 e LC14 leva ao aumento na produção de EROs na linhagem leucêmica HL60 após o tempo de 3 e 6 horas.....	43
Figura 9 – Expressão relativa de mRNA de genes associados à apoptose e ao reparo do DNA em células da linhagem HL60 após tratamento com as naftoquinonas sintéticas LC04 e LC14 (1 μ M) por 18 horas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade inibitória de 30 substâncias testadas na concentração de 10 μ M após 72 horas de tratamento nas linhagens celulares AGP-01, HCT-116 e HL60.....	36
Tabela 2 – Análise da citotoxicidade na linhagem de leucemia promielocítica aguda HL60.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATO	Trióxido de Arsênico
ATRA	Ácido All-Trans-Retinoico
CNN1	1,4-naftoquinona
CNN16	8-hydroxy-2-((4-nitrophenyl)thio)naphthalene-1,4-dione
CT	<i>Threshold Cycle</i>
DCFHDA	2'-7'-diclorofluorescina diacetato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAB	<i>French American British</i>
FISH	Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência
GO	Gemtuzumab Ozogamicina
CI50	Inibição de 50% do Crescimento Celular
ICC	<i>International Consensus Classification</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	Iodeto de Propídeo
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
RC	Remissão Completa

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RXR	Receptor X Retinóide
SD	Síndrome de Diferenciação
SFB	Soro Fetal Bovino
TP	Tempo de Protrombina
tPA	Plasminogênio Tecidual
TTPa	Tromboplastina Parcial Ativada
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Câncer	11
1.2 Hematopoese	12
1.3 Leucemia	14
1.3.1 Leucemia Promielocítica Aguda	17
1.3.2 Tratamento	21
1.4. Naftoquinonas	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Substâncias químicas	27
3.2 Cultivo celular	27
3.3 Avaliação da Citotoxicidade por Alamar Blue	28
3.4 Avaliação da Integridade de membrana	29
3.5 Avaliação do Ciclo celular	30
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.7 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	33
3.8 Isolamento de mRNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR	34
3.9 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	35
4.1 As moléculas derivadas de naftoquinonas demonstraram maior atividade citotóxica na linhagem de leucemia mieloide aguda HL60	35
4.2 As moléculas LC04 e LC14 induz alteração na integridade de membrana na linhagem HL60	38
4.3 As moléculas LC04 e LC14 induzem fragmentação no DNA e bloqueio no ciclo celular nas na linhagem HL60	40
4.4 LC04 e LC14 induzem alterações morfológicas e danos na membrana da célula HL60	42
4.5 As moléculas LC04 e LC14 promoveram a produção de EROs	43
4.6 Análise de expressão de mRNA	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERENCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença complexa que representa um dos maiores desafios para a saúde pública global. Classificado como uma enfermidade multifatorial, ele resulta de interações entre predisposições genéticas, exposição a fatores ambientais e hábitos de vida, culminando no desenvolvimento de células anormais que se dividem de maneira descontrolada (BENNETT *et al.*, 2018; FITZMAURICE *et al.*, 2019; SUNG *et al.*, 2021). Com uma carga significativa em termos de mortalidade e morbidade, o câncer continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo, especialmente entre populações idosas (SIEGEL *et al.*, 2022).

Estima-se que a prevalência do câncer continue a crescer nas próximas décadas, em parte devido ao envelhecimento populacional e à urbanização crescente, que contribuem para a exposição a fatores de risco como o sedentarismo, alimentação inadequada e tabagismo (KAYYAL-TARABEIA *et al.*, 2024; RAMAMOORTHY *et al.*, 2024). O impacto dessa doença, no entanto, não é uniforme: há uma variação considerável na incidência e mortalidade entre os diferentes tipos de câncer e regiões geográficas, refletindo desigualdades em acesso a diagnósticos precoces, tratamentos e políticas preventivas (SIEGEL *et al.*, 2025).

Do ponto de vista biológico, os tumores são caracterizados por mecanismos de proliferação e sobrevivência celular, permitindo-lhes superar barreiras fisiológicas que normalmente impediriam o crescimento anormal (ZHANG *et al.*, 2024a). Essas alterações decorrem de falhas nos mecanismos de reparo do DNA, acumulando mutações e levando à transformação maligna. Além disso, a heterogeneidade genética e molecular dos tumores influencia a resposta ao tratamento, tornando o desenvolvimento de terapias direcionadas uma prioridade para a pesquisa oncológica (MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015; PETERS; GONZALEZ, 2018).

A compreensão dos mecanismos biológicos que sustentam o desenvolvimento e a progressão do câncer tem desempenhado um papel crucial no avanço de terapias mais eficazes contra a doença. Estudos pioneiros conduzidos por Hanahan e Weinberg, em 2000, identificaram um conjunto de características distintivas das

células cancerosas, responsáveis por seu comportamento agressivo e descontrolado (HANAHAAN; WEINBERG, 2000). Em 2011, os mesmos autores ampliaram essa análise, incorporando novas características que aprofundaram o entendimento sobre os processos envolvidos na tumorigenese. Esses avanços têm fornecido uma base científica robusta para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas e inovadoras (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). A Figura 1 ilustra os mecanismos identificados por esses pesquisadores, destacando sua relevância no contexto do estudo do câncer.

Figura 1 – Características fenotípicas associadas ao desenvolvimento do câncer.



Fonte: Adaptado de HANAHAAN; WEINBERG, 2011

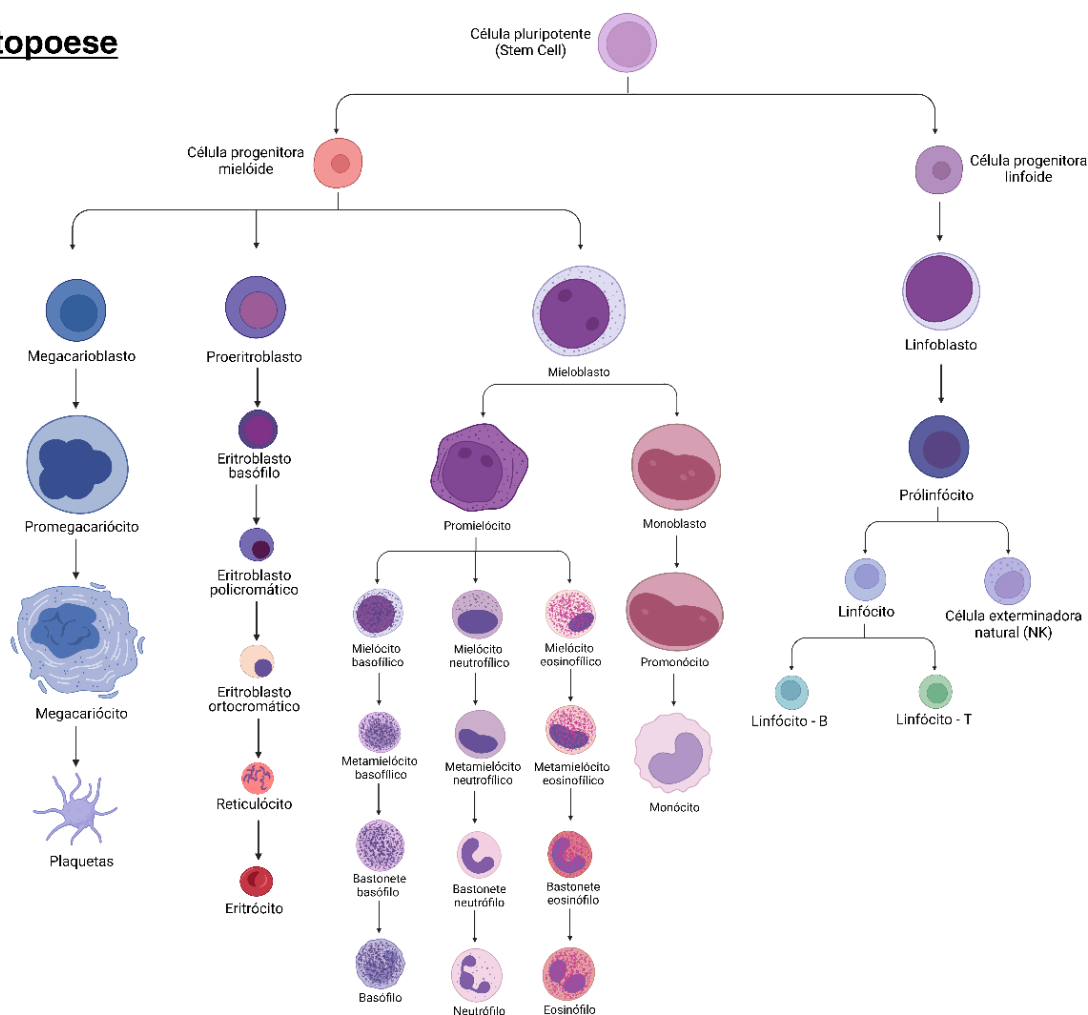
1.2 Hematopoese

A hematopoese, como evento central na formação das células sanguíneas, estabelece a base para compreendermos o funcionamento do sistema hematopoiético e suas relações com diversas patologias, incluindo neoplasias como

as leucemias. Este processo é responsável pela formação e desenvolvimento das células sanguíneas. As células tronco hematopoiéticas com alta capacidade proliferativa sofrem influência de hormônios e interleucinas que serão seus principais estimuladores de diferenciação (JAFFREDO *et al.*, 2021; LIGGETT; SANKARAN, 2020). Em consequência disso, irão dar origem a duas linhagens de células, mieloide e linfóide, com uma capacidade proliferativa reduzida. A partir dessas, irão originar-se células precursoras que em seguida, após a etapa de amadurecimento, se transformarão em células mais diferenciadas e especializadas, adaptando-se para pôr em prática seus papéis funcionais no organismo, é possível visualizar a ilustração dessas etapas através da Figura 1 (RIEGER; SCHROEDER, 2012; TILL; MCCULLOCH; SIMINOVITCH, 1964; WU; ZHANG; LUCAS, 2021).

Figura 2 – Imagem ilustrando etapas da hematopoese.

Hematopoese



Fonte: Adaptado de HOFFBRAND, 2018.

O sistema hematopoiético é altamente regulado e possui a capacidade de autorregeneração, mantendo desta forma, o equilíbrio durante a produção das células sanguíneas, como as células que participam do sistema imune inato e adaptativo, células que participam do processo de hemostasia e as células que possuem o papel fundamental em carrear oxigênio pelo organismo. Desta forma, esse processo biológico possui a capacidade de desencadear resposta sob a medula óssea, diante de estímulos como situações de estresse, traumas e infecções (BECKER *et al.*, 1965; FRÖBEL *et al.*, 2021; MÜLLER-SIEBURG *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2023).

Portanto, em condições normais, as células-tronco hematopoiéticas mantêm-se em um estado de quiescência celular, onde estão metabolicamente ativas, mas não realizam divisão celular. Este estado funciona como um sistema de preservação que evita o estresse de replicação dessas células, evitando também, a sobrecarga da medula (BURKE; STARTZELL, 2008; CHEN *et al.*, 2020). Essas células podem ainda ser ativadas pelos estímulos citados anteriormente, no entanto, essas influências externas ou internas podem gerar alterações nesse processo, ocasionando em um esgotamento do compartimento de células tronco e progenitoras, resultando em falhas na medula e levando a um possível desenvolvimento de células leucêmicas (FLACH *et al.*, 2014; QIN *et al.*, 2021; WILSON *et al.*, 2008).

1.3 Leucemia

Compreender os aspectos fundamentais da hematopoese nos conduz à análise das patologias que comprometem esse processo, como a leucemia, uma das condições mais graves do sistema hematopoiético. Estima-se que, no Brasil, entre 2023 e 2025, ocorrerão aproximadamente 10,04 novos casos de leucemia a cada 100 mil homens e 6,24 a cada 100 mil mulheres. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), as leucemias estão entre os 10 tipos de câncer que mais causam mortes entre homens e mulheres no país, sendo responsáveis por 3.602 óbitos em 2022, o que ressalta a gravidade desse problema de saúde pública no Brasil (INCA, 2023).

A leucemia é uma neoplasia que irá desencadear a proliferação de células hematopoiéticas de forma irregular e descontrolada, no qual, não irão conseguir desempenhar seu papel principal no organismo (BURKE; STARTZELL, 2008; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023). Dentre os sintomas apresentados, o paciente pode desenvolver anemia, imunidade baixa e sangramentos que ocorrem devido a um quadro de pancitopenia, onde há uma redução no número de hemácias, leucócitos e plaquetas, além disso, o paciente poderá apresentar inchaço nos linfonodos, esplenomegalia e hepatomegalia, o diagnóstico é realizado através do hemograma, análise da medula óssea, avaliação genética das células e imunofenotipagem (ALEIXO *et al.*, 2024; INCA, 2021).

Os tipos de leucemia podem ser agrupados com base na velocidade de progressão e no tipo de célula afetada. Nesse sentido, a leucemia pode ser classificada como crônica, visto que apresenta uma progressão mais lenta, ou aguda, uma vez que se caracteriza por uma evolução rápida e agressiva. Além disso, essas doenças também podem ser classificadas com base no tipo de glóbulo branco afetado, sendo classificadas como linfóides ou mielóides, dependendo da origem celular hematopoiética (ANILKUMAR; MANOJ; SAGI, 2023; KARUNARATHNA *et al.*, 2001). Aonde podem ser divididas entre quatro principais: a leucemia mieloide aguda (LMA), a leucemia mieloide crônica (LMC), a leucemia linfocítica aguda (LLA) e a leucemia linfocítica crônica (LLC) (INCA, 2021).

A LMA tem maior ocorrência em adultos, e afeta células mielóides imaturas, com progressão rápida e agressiva, sendo comum a presença de bastões de Auer em blastos e promielócitos. Em contraste, a LMC envolve as células mielóides, tendo presente toda a linhagem maturativa. Progride lentamente e se associa às mutações no cromossomo BCR-ABL. Por outro lado, a LLA é um câncer mais comum pediátrico, afetando a linhagem linfóide através da transformação maligna a proliferação não controlada de uma célula progenitora com diferenciação anormal, resultando em um alto número de blastos circulantes. Já a LLC é caracterizada pelo progressivo acúmulo de linfócitos malignos fenotipicamente maduros, afetando principalmente indivíduos adultos, geralmente a partir dos 50 anos (MOREIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; Puggina, 2024).

Embora as leucemias mieloides e linfoblásticas se diferenciem quanto à origem e à progressão clínica, ambas compartilham fatores de risco semelhantes e necessitam de abordagens específicas para diagnóstico e classificação. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da LMA, por exemplo, estão os fatores ambientais, como a exposição à radiação ionizante, pesticidas, herbicidas e benzeno; fatores genéticos, como síndromes e mutações específicas; e o uso de determinados quimioterápicos. (TAMAMYAN *et al.*, 2017). Devido a diversas manifestações genéticas, atipias e pleomorfismo celular presentes nas leucemias, a comunidade científica se reuniu e propôs um esquema de classificação definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo sistema de estadiamento *French American British* (FAB) para auxiliar no diagnóstico das leucemias mieloides agudas e leucemias linfoblásticas agudas (BRUNNING, 2003).

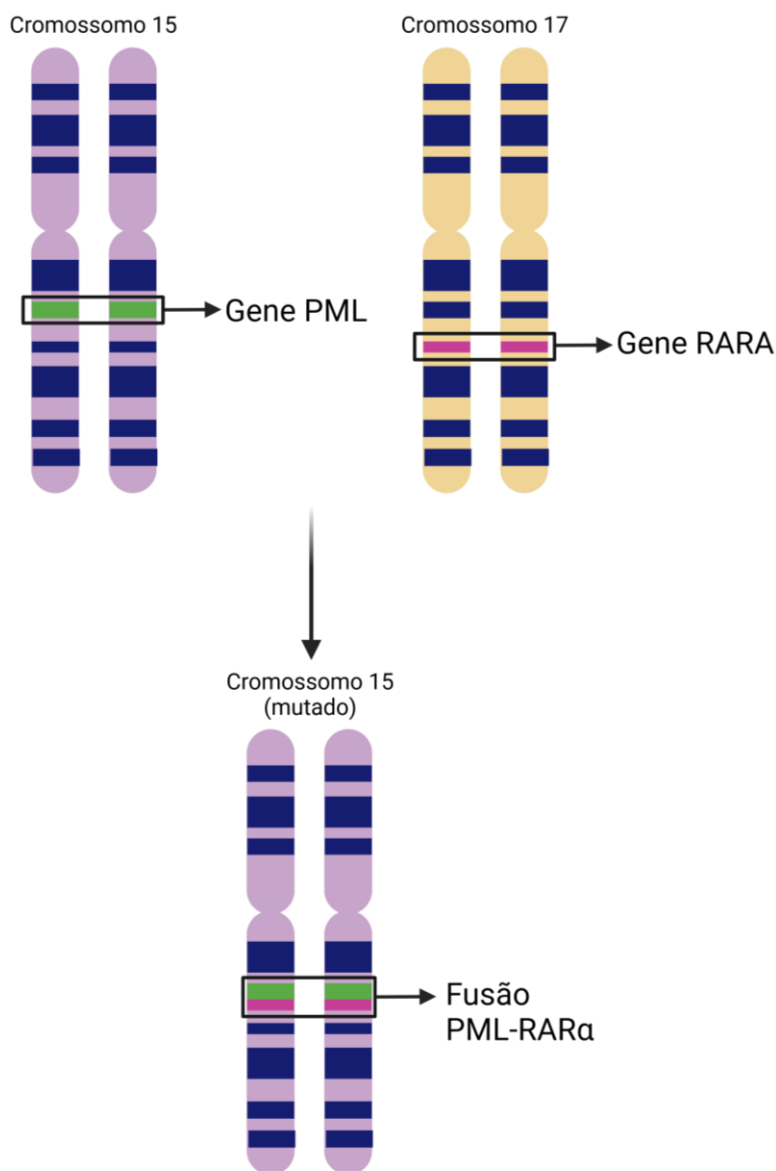
De acordo com a OMS as leucemias mieloides devem ser classificadas levando em consideração o maior nível de informações possíveis, como, morfologia, citotóxica, imunofenotipagem, genética, envolvimento das características clínicas (VARDIMAN *et al.*, 2009) e o modo de classificação proposto pela FAB, consiste em oito subtipos M0-M7, no qual irão ser definidos pelas características morfológicas das células leucêmicas e a sua distribuição, sendo considerados o tipo de linhagem mielóide envolvida e o grau de desenvolvimento (BENNETT *et al.*, 1976; RAWAT *et al.*, 2022).

Em 2022, o *International Consensus Classification* (ICC) atualizou a classificação anteriormente utilizada, introduzindo novas abordagens para categorizar neoplasias mieloides e leucemias agudas. No artigo, destaca-se que, além da presença de >20% de blastos para o diagnóstico de leucemias mieloides agudas, a análise de assinaturas genéticas pode permitir a dispensa desse critério de contagem de blastos. Entre as principais alterações genéticas na LMA, foram adicionadas translocações específicas, como t(8;21), inv(16), t(9;11) e inv(3), além de mutações nos genes *ASXL1*, *EZH2* e *RUNX1*. Também se inclui o rearranjo genético entre os genes *PML* e *RAR α* , que resulta na translocação t(15;17) e caracteriza a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) (ARBER *et al.*, 2022).

1.3.1 Leucemia Promielocítica Aguda

Entre os diversos tipos de leucemias mieloides agudas, a LPA se destaca por suas características únicas, que requerem uma abordagem diagnóstica e terapêutica específica. A LPA representa de 5% a 10% dos casos diagnosticados de LMA (SHIMONY; STAHL; STONE, 2023). Essa condição é caracterizada por uma translocação entre o cromossomo 15, onde se encontra o gene *PML*, responsável pela regulação do ciclo celular e pela resposta ao estresse celular, e o cromossomo 17, que abriga o gene *RAR α* , receptor do ácido retinoico e importante para a diferenciação celular via sinalização retinóide (KAKIZUKA *et al.*, 1991; MISTRY *et al.*, 2003; SHARMA; LIESVELD, 2023). A fusão entre esses genes resulta em uma proteína quimérica, *PML-RAR α* , que interfere na transcrição de genes essenciais para a diferenciação celular ao interagir com o DNA. Na Figura 2, é possível visualizar uma ilustração de como funciona a fusão do gene *PML-RAR α* . Além desse tipo de mutação, foram identificadas variantes raras envolvendo o gene *RAR α* e outros genes além do *PML*. Esses rearranjos podem incluir os genes *PLZF*, *NPM*, *NUMA* e *STAT5b*, influenciando diretamente o tratamento, especialmente o rearranjo envolvendo o gene *PLZF*, que confere resistência ao tratamento com retinóides (DEY *et al.*, 2024; GRIGNANI *et al.*, 1994; TESTA; PELOSI, 2024).

Figura 3 – Ilustração da translocação entre os cromossomos 15 e 17. A troca de material genético entre o gene PML (no cromossomo 15) e o gene $RAR\alpha$ (no cromossomo 17) resulta na formação do gene de fusão PML- $RAR\alpha$, responsável pela patogênese da LPA.



Fonte: Adaptado de Venci *et al.*, 2017.

Durante a hematopoese, o ácido retinoico se liga ao gene $RAR\alpha$, ativando uma cascata de sinalização que promove a maturação dos promielócitos em granulócitos. Contudo, quando ocorre a translocação t(15;17), a proteína PML- $RAR\alpha$ formada por essa fusão interfere na interação com o receptor, alterando a cascata de sinalização e bloqueando a ativação de genes necessários para a diferenciação (GRIGNANI *et al.*, 1993; LIQUORI *et al.*, 2020). Esse bloqueio ocorre porque a

proteína *PML-RAR α* forma heterodímeros com o receptor RXR (receptor X retinóide) e, ao contrário da proteína não mutada, liga-se fortemente ao DNA, reprimindo a expressão gênica (GRIGNANI *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 2021).

Esse mecanismo provoca o acúmulo de células promielocíticas com bloqueio da diferenciação, resultando em um processo de leucemogênese e no acúmulo dessas células na medula óssea. Isso leva o paciente a apresentar sintomas semelhantes aos das leucemias agudas de maneira geral, como disfunção medular em decorrência do acúmulo de células promielocíticas indiferenciadas (DE THÉ; LE BRAS; LALLEMAND-BREITENBACH, 2012; HILLESTAD, 1957; VAID *et al.*, 2021). Essa situação faz com que o paciente desenvolva infecções devido à deficiência de leucócitos funcionais, resultando em imunidade comprometida, anemias e hemorragias. Além disso, a associação da LPA com coagulopatias representa um dos principais fatores de risco da doença (HAMBLEY; TOMULEASA; GHIAUR, 2021; WARRELL *et al.*, 1993).

A correlação da LPA com coagulopatias exige um diagnóstico e tratamento rápidos, uma vez que, geralmente, o paciente apresenta distúrbios de coagulação que, se não tratados prontamente, podem levá-lo ao óbito (HERMSEN; HAMBLEY, 2023; KWAAN; CULL, 2014). Estudos indicam que as células leucêmicas promielocíticas têm a capacidade de liberar micropartículas contendo grandes quantidades de fator tecidual na corrente sanguínea, o que ativa a cascata de coagulação e contribui para o desenvolvimento de coágulos potencialmente prejudiciais ao paciente (FALANGA *et al.*, 1998; HERMSEN; HAMBLEY, 2023; KWAAN, 2014; ZHAO *et al.*, 2021).

Além da formação de coágulos, alguns pacientes podem apresentar sintomas hemorrágicos, como hematomas, hemorragias, epistaxe e hematúria. Acredita-se que essa condição seja desencadeada por uma hiper fibrinólise primária mediada por uma proteína denominada Anexina II, que é expressa em abundância pelos blastos da LPA (HISADA, 2024; MANTHA *et al.*, 2018; MENELL *et al.*, 1999). Essa proteína promove a depleção de fibrinogênio ao interagir com o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), aumentando a atividade catalítica da enzima responsável pela conversão de plasminogênio em plasmina e liberando grandes

quantidades dessa substância. Esse processo resulta na destruição prematura dos coágulos de fibrina nos locais de sangramento, o que, por sua vez, causa hemorragias (LIU *et al.*, 2011; NAYMAGON; MASCARENHAS, 2020; SABLJIC *et al.*, 2024).

No entanto, existem fatores e parâmetros que podem ajudar a prever essas condições hemorrágicas, como a contagem de leucócitos e blastos no sangue periférico do paciente, a contagem de plaquetas, o tempo de protrombina (TP), o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e os níveis de fibrinogênio (ABLA *et al.*, 2017; NAYMAGON; MASCARENHAS, 2020; SINGH *et al.*, 2023).

Para o diagnóstico inicial da LPA, a presença de promielócitos com morfologia displásica, hipergranulação na coloração azurófila e a identificação de bastonetes de Auer, assim como a avaliação de coagulopatias com tempo de TTPa elevado, alterações no TP, níveis de dímeros-D elevados e trombocitopenia, permitem um pré-diagnóstico e a aplicação imediata do ácido all-trans-retinoico (ATRA) (DE FIGUEIREDO-PONTES *et al.*, 2024; KAYSER; CONNEELY, 2023; YOKOYAMA, 2024). No entanto, o diagnóstico genético é essencial, pois permite uma melhor compreensão dos casos responsivos ao tratamento com ATRA e trióxido de arsênio (ATO), a identificação de variantes raras resistentes ao ATRA e a definição de alvos para o monitoramento da doença, utilizando isoformas de PML/RAR α por RT-PCR. (GALLAGHER, 2003; POLAMPALLI *et al.*, 2011; SPINELLI *et al.*, 2014; STÅHLBERG *et al.*, 2016).

Além disso, também podem ser utilizadas técnicas de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e análise por citometria de fluxo. (BLACKBURN; BENDER; BROWN, 2019; PAIETTA *et al.*, 2004; SANZ *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2020). A imunofenotipagem permite identificar marcadores como CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD9, CD18, CD2, CD11a e CD11b. A análise da presença desses antígenos auxilia na identificação rápida, com alta precisão, sensibilidade e especificidade (HORNA *et al.*, 2014; OELSCHLAEGEL *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2020).

Pacientes com diagnóstico de LPA são subdivididos em três grupos de risco. Aqueles classificados como de baixo e intermediário risco apresentam uma contagem de leucócitos inferior a 10.000/ μ L, enquanto pacientes de alto risco

possuem uma contagem superior a esse valor (ARBER *et al.*, 2022; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023; WATTS; TALLMAN, 2014). Essa estratificação de risco orienta a abordagem do tratamento: pacientes de baixo e intermediário risco pode ser tratados com a combinação de ATRA e ATO, sem a necessidade de quimioterapia citotóxica. Já para pacientes de alto risco, essa combinação não é suficiente, sendo necessário o uso adicional de quimioterapia citotóxica (ESTEY *et al.*, 2006; LANCET *et al.*, 2016; OSMAN *et al.*, 2018).

1.3.2 Tratamento

A busca por alternativas terapêuticas frente às limitações dos tratamentos convencionais levou ao interesse crescente pelas naftoquinonas, compostos químicos promissores. Antes do desenvolvimento e aplicação da terapia com ATRA, o tratamento da LPA consistia na administração de quimioterápicos padrões, como daunorrubicina e citarabina. Apesar de induzir remissão completa (RC) em cerca de 70-80% dos casos, esse tratamento apresentava taxas significativas de mortalidade devido a complicações hemorrágicas e recaídas frequentes da doença (CUNNINGHAM *et al.*, 1989; HUANG *et al.*, 1988). Com a introdução do ATRA no final da década de 1980, as taxas de RC aumentaram significativamente para aproximadamente 90%. No entanto, muitos pacientes ainda apresentavam recidivas e sinais de resistência ao tratamento (BERCIER; DE THÉ, 2024; BERNARD *et al.*, 1973; FENAUX *et al.*, 1993; FENAUX; DEGOS, 1991).

Assim, passou-se a administrar o ATRA em conjunto com quimioterápicos, como idarrubicina e daunorrubicina, pertencentes à classe das antraciclina. Observou-se que essa combinação melhorava significativamente as taxas de RC, alcançando até 95%, além de reduzir os casos de síndrome de diferenciação (AVVISATI *et al.*, 1996; BERCIER; DE THÉ, 2024; FENAUX *et al.*, 1999; SANZ *et al.*, 2009, 2019).

Foi identificado que a combinação de ATRA com ATO é a melhor opção para o tratamento da LPA, pois, na maioria dos casos, elimina a necessidade de quimioterápicos em conjunto com o ATRA. Observou-se que o ATO atua na degradação da proteína de fusão *PML-RAR α* , apresentando resultados significativos, com cerca de 85% dos pacientes recém-diagnosticados com LPA alcançando

remissão completa (NIU *et al.*, 1999; SOIGNET *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2001). Embora o mecanismo de ação do ATO não seja totalmente compreendido, sabe-se que ele possui efeitos dose-dependentes nas células de LPA, induzindo apoptose em altas concentrações e promovendo diferenciação celular em baixas concentrações (BERCIER; DE THÉ, 2024; SOIGNET *et al.*, 2001; TOMITA; KIYOI; NAOE, 2013).

No entanto, há limitações: a combinação ATRA/ATO mostra-se eficaz no tratamento de pacientes com LPA de baixo a intermediário risco, com contagem de leucócitos inferior a 10.000/ μ L, permitindo que essa abordagem dispense a quimioterapia nesses casos. Esse tratamento apresenta baixa toxicidade e proporciona uma melhora na qualidade de vida dos pacientes (ESTEY *et al.*, 2006; GHAVAMZADEH *et al.*, 2006). Em contrapartida, essa metodologia não é adequada para pacientes com LPA de alto risco, com contagem de leucócitos acima de 10.000/ μ L, sendo necessária a utilização de quimioterápicos, como idarrubicina ou gemtuzumab ozogamicina (GO), medicamentos comumente empregados para tratar leucocitose em pacientes leucêmicos, em conjunto com ATRA. Mesmo com a adição desses agentes, os pacientes de alto risco ainda apresentaram resultados inferiores e uma taxa de morte precoce de até 11% (GIANSANTI *et al.*, 2024; ILAND *et al.*, 2015; RAVANDI *et al.*, 2009, 2010; SANZ *et al.*, 2019).

A síndrome de diferenciação (SD), também conhecida como síndrome ATRA, é uma complicação que geralmente ocorre nos primeiros dias ou semanas de terapia com ATRA em pacientes com LPA. Essa síndrome pode desencadear efeitos colaterais como dispneia, infiltrados pulmonares, derrame pleural, febre, ganho de peso, edema periférico, hipotensão e, em casos graves, insuficiência renal aguda (DE BOTTON *et al.*, 1998; FRANKEL *et al.*, 1992; JURCIC; SOIGNET; MASLAK, 2007; STAHL; TALLMAN, 2019; WU *et al.*, 2024). Foi observado que pacientes tratados com ATRA/ATO apresentaram sobrecarga de fluidos, resultando em um ganho de peso de 10% ou mais, o que indica um desequilíbrio hídrico (CHAMOUN *et al.*, 2019; YILMAZ; KANTARJIAN; RAVANDI, 2021).

Além das complicações causadas pelos efeitos colaterais da terapia, também foram identificados casos de resistência ao tratamento com ATRA/ATO. Sabe-se que os mecanismos de ação dessa terapia consistem em o ATRA ativar

genes de transcrição que promovem a diferenciação celular e degradar a proteína quimérica *PML-RAR α* , enquanto, em sinergia, o ATO desencadeia o processo apoptótico das células LPA e apresenta efeitos pró-oxidantes (FRANKEL *et al.*, 1992; JURCIC; SOIGNET; MASLAK, 2007). No entanto, em casos onde há uma variação genética que afeta os domínios de interação de *RAR α* e de *PML-RAR α* , os pacientes tendem a apresentar resistência ao tratamento (IACCARINO *et al.*, 2019; WATTS; TALLMAN, 2014).

Estudos identificaram o perfil genético de pacientes que apresentaram resistência ao tratamento, revelando mutações nos genes *WT1*, *RAR α* e *NT5C2*. Foi observado que as células que sobreviveram ao tratamento apresentavam um perfil genético divergente em comparação com o início da terapia. Algumas mutações em genes como *ASXL1*, *DNMT3A* e *TP53* também foram relatadas em pacientes que recidivaram (IACCARINO *et al.*, 2019; LEHMANN-CHE *et al.*, 2018; VAN DELFT *et al.*, 2011). No entanto, a mutação *FLT3-ITD* foi considerada de maior risco, pois afeta significativamente a ação do ATRA ao impedir a degradação da proteína quimérica *PML-RAR α* (ESNAULT *et al.*, 2019; LEHMANN-CHE *et al.*, 2018; SHAO *et al.*, 1997).

No caso de resistência ao ATO, foram identificadas alterações em vias de sinalização e no sistema de oxirredução, sugerindo que mudanças no metabolismo celular podem influenciar a resistência ao fármaco. Além disso, fusões com o gene *RAR α* , sem a presença do gene *PML*, induzem resistência à terapia; no entanto, os mecanismos moleculares relacionados a esse tipo de resistência ainda não estão bem definidos na literatura (ADAMS; NASSIRI, 2015; ALEX *et al.*, 2014; BALASUNDARAM *et al.*, 2016; GUIDEZ *et al.*, 2007). Portanto, é necessário desenvolver novas terapias que auxiliem no tratamento da LPA, reduzindo os efeitos colaterais e explorando outras vias para superar esses mecanismos de resistência.

1.4. Naftoquinonas

As naftoquinonas são pequenas moléculas que possuem dois grupos carbonila em sua estrutura química, o que lhes permite participar de processos de oxirredução com outras biomoléculas. Elas são encontradas como produtos metabólicos de bactérias, fungos e algumas plantas (AHMADI *et al.*, 2020). Devido à sua ampla diversidade estrutural, as naftoquinonas apresentam várias atividades

biológicas, incluindo propriedades antiproliferativas, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, o que as torna potenciais agentes terapêuticos para diversas doenças, incluindo o câncer (EGHBALIFERIZ *et al.*, 2018; FUTURO *et al.*, 2018; KASHI *et al.*, 2024).

Os derivados das naftoquinonas veem sendo bastante estudados na última década, as modificações realizadas como a adição de grupamentos aminas, incorporação de uma estrutura heterocíclica de indol e um grupamento triazol, podem aumentar as probabilidades da molécula possuir uma atividade biológica significativa e específica (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2022; OLYAEI; SADEGHPOUR; KHALAJ, 2020). Foi analisado em um estudo que um derivado de 2-acetil-3-aminofenil-1,4-naftoquinonas⁹, mostrou um efeito antiproliferativo muito promissor em linhagens de câncer em modelo *in vitro* (DONG *et al.*, 2019).

Um dos principais mecanismos das naftoquinonas e seus derivados descritos na literatura é a sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), inibindo o transporte de elétrons e a ativação de diferentes enzimas, principalmente topoisomerases, devido a sua capacidade de formar ligações covalentes e característica eletrofílica. Devido a sua particularidade estrutural, as naftoquinonas podem ser potenciais agentes intercalantes de DNA (AMININ; POLONIK, 2020; FUTURO *et al.*, 2018; KUMAGAI *et al.*, 2012; LÓPEZ LÓPEZ *et al.*, 2014).

As naftoquinonas e seus derivados destacam-se por suas diversas atividades biológicas, tornando-se promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer (RAHMAN *et al.*, 2022). Esses compostos oferecem perspectivas inovadoras, especialmente no tratamento da leucemia, podendo representar alternativas eficazes em casos de resistência a terapias convencionais. Essa potencialidade reforça a importância de continuar investigando as aplicações terapêuticas das naftoquinonas no combate ao câncer (ANGULO-ELIZARI *et al.*, 2024; PEREYRA *et al.*, 2019).

No estudo conduzido por Da Rocha *et al.*, 2011, novas moléculas derivadas de naftoquinonas foram sintetizadas a partir do composto 8-hidroxi-alazona, apresentando excelentes resultados. Essas moléculas demonstraram

potenciais pró-oxidantes significativos quando testadas em linhagens de melanoma MDA-MB435, mostrando maior eficácia em comparação à doxorrubicina (DA ROCHA *et al.*, 2011). Com base nesses achados, o presente trabalho tem como objetivo identificar o potencial terapêutico e elucidar o mecanismo de ação de moléculas derivadas das naftoquinonas previamente investigadas. Essa abordagem busca contribuir para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes e inovadores no tratamento do câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar o efeito citotóxico e o mecanismo de ação *in vitro* das moléculas derivadas de 1,4-naftoquinona na linhagem celular de leucemia promielocítica aguda HL60.

2.2 *Objetivos específicos*

- Investigar o potencial citotóxico das moléculas derivadas de naftoquinonas em linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda HL60 e tumores sólidos AGP-01 e HCT-116.
- Analisar o efeito das moléculas LC04 e LC14 na integridade de membrana das células HL60.
- Avaliar a influência das moléculas LC04 e LC14 no ciclo celular da linhagem HL60.
- Avaliar os efeitos das moléculas LC04 e LC14 na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na linhagem celular HL60.
- Avaliar se as moléculas LC04 e LC14 interferem na expressão de genes relacionados a morte celular e ao reparo a danos no DNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substâncias químicas

As substâncias utilizadas neste estudo são provenientes de uma parceria com o laboratório do Prof. Dr. David Rodrigues da Rocha da Universidade Federal Fluminense (UFF). A síntese das naftoquinonas está em processo de patente e será descrita em publicação. As substâncias foram pesadas e diluídas em DMSO para uma solução mãe de 1 mM e armazenadas em alíquotas a -20 °C até o uso.

3.2 Cultivo celular

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens de células cancerígenas AGP-01, HCT-116 e HL60, todas de origem humana. A linhagem AGP-01 foi previamente estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa a partir da aspiração do líquido ascítico de um adenocarcinoma gástrico. Já a linhagem HCT-116, derivada de carcinoma colorretal, foi obtida do banco de células do Laboratório de Farmacogenética do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Por sua vez, a linhagem HL60, proveniente de leucemia promielocítica aguda, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), também vinculado ao NPDM/UFC.

As linhagens AGP-01 e HCT-116 foram mantidas em cultura no meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), enquanto a linhagem HL60 foi cultivada no meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute). Ambos os meios foram suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico, sendo as culturas mantidas em uma estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento celular foi monitorado diariamente utilizando um microscópio invertido, e a troca do meio de cultura era realizada sempre que as células atingiam confluência.

Para a manutenção das células aderentes AGP-01 e HCT-116, o meio de cultura da garrafa era descartado, e as células eram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x (contendo NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4). Em seguida, adicionava-se tripsina-EDTA (0,25% v/v em PBS 1x) e a solução era incubada por 5 minutos na estufa a 37 °C, promovendo a dissociação celular. Após

esse processo, a tripsina era inativada com o meio DMEM suplementado com 10% de SFB. A solução resultante era homogeneizada, e parte dela era descartada antes de adicionar novo meio de cultura, dando continuidade ao cultivo. Já para a linhagem HL60, composta por células em suspensão, a manutenção consistia na remoção de parte do meio de cultura sempre que a confluência era atingida. Em seguida, adicionava-se novo meio, garantindo o crescimento contínuo da cultura.

3.3 Avaliação da Citotoxicidade por Alamar Blue

- **Princípio do teste**

A metodologia Alamar Blue é amplamente utilizada em estudos relacionados à viabilidade e citotoxicidade em diversas áreas da pesquisa biológica. O composto ativo da substância é a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), que é solúvel em água, não tóxica e permeável à membrana plasmática. A resazurina de coloração azul é um composto fluorescente prontamente convertido para a forma reduzida de coloração rosa altamente fluorescente (resofurina). O composto sofre reações de oxidorredução por enzimas mitocondriais e citosólicas de células viáveis, enquanto células danificadas são incapazes de tal ação. Portanto, a conversão de resazurina em resofurina reflete a viabilidade celular e pode ser quantificada pela leitura da fluorescência em um comprimento de onda de excitação/emissão de 465/540 nm (NAKAYAMA *et al.*, 1997).

- **Procedimento experimental**

As linhagens de células cancerígenas AGP-01 (fluido ascítico de adenocarcinoma gástrico), HCT-116 (carcinoma colorretal) e a linhagem leucêmica HL60 (leucemia promielocítica aguda), todas de origem humana, foram utilizadas.

Foi realizado um ensaio de concentração única ou triagem. Para esse propósito, as linhagens de células AGP-01 e HCT-116 foram semeadas em DMEM e a linhagem de células HL60 em RPMI a uma concentração de 3×10^3 e 7×10^3 células por poço, respectivamente. Após 24 horas, as células foram tratadas com 10 μ M das substâncias de teste e com o controle positivo doxorrubicina a 1 μ M por 72 horas. Após esse tempo, foi adicionada a solução de Alamar Blue HS (0,2 mg/mL) e, então,

as placas foram armazenadas por 3 horas em uma incubadora de CO₂ a 37 °C. Por fim, a fluorescência dos poços foi medida em um espectrofotômetro (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880), com espectros de excitação e emissão de 560 e 590 nm, respectivamente.

As substâncias com melhor porcentagem de inibição do crescimento na concentração única de 10 µM e a linhagem mais sensível a moléculas foram triadas para serem avaliadas em uma curva concentração-resposta (0,312 µM - 20 µM). A Concentração de Inibição de 50% do crescimento celular (CI50) foi determinada por leitura em um espectrofotômetro, com espectros de excitação e emissão de 560 e 590 nm, respectivamente. Portanto, com base nos resultados, as moléculas LC04 e LC14, que demonstraram maior percentual de inibição na linhagem mais sensível, HL60, foram escolhidas para a continuidade do estudo.

3.4 Avaliação da Integridade de membrana

- **Princípio do teste**

Essa metodologia é amplamente utilizada para avaliar a viabilidade e a integridade da membrana celular, identificando a porcentagem de células que apresentam danos na membrana após a exposição a moléculas testadas. Nesse teste, utiliza-se o reagente fluorescente Iodeto de Propídeo (IP), que penetra nas células com membranas comprometidas. Nas células viáveis, cuja membrana permanece íntegra, o IP não é capaz de penetrar. O sinal de fluorescência emitido pelo IP nas células não viáveis é detectado por um citômetro de fluxo, permitindo a quantificação de células viáveis e não viáveis. Dessa forma, é possível estabelecer um parâmetro para avaliar a morte celular ou a citotoxicidade (CROWLEY *et al.*, 2016).

- **Procedimento experimental**

A linhagem celular HL60 foi cultivada em uma placa de 24 poços, na densidade de 5 x 10⁴ células por poço, e mantida por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as células foram expostas às moléculas LC04 e LC14, na concentração de 1 µM. Os controles positivos foram tratados com doxorrubicina nas concentrações de 0,1 µM e 0,5 µM, enquanto o

controle negativo foi incubado com Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,004%. Após 24 horas de exposição, as células foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e lavadas uma vez com PBS. Em seguida, foram incubadas no escuro, na estufa, em 200 µl de IP a uma concentração de 50 µg/ml, durante 30 minutos.

Posteriormente, as células foram centrifugadas novamente a 2500 rpm por 10 minutos. Após a incubação e centrifugação, as células foram ressuspensas em 300 µl de PBS e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSVerse™. Aproximadamente dez mil eventos foram avaliados.

3.5 Avaliação do Ciclo celular

- **Princípio do teste**

O ciclo celular de uma célula saudável é dividido em cinco fases principais: G1, S, G2, M e G0. Na fase G0, as células estão em um estado de quiescência, ou repouso. Na fase G1, as células começam a se preparar para a divisão celular, organizando o DNA para a fase de síntese, conhecida como fase S, onde ocorre a etapa mais ativa de duplicação do DNA. Em seguida, a fase G2 é iniciada, durante a qual são produzidos os materiais necessários para a mitose. Após a mitose, ocorre a divisão celular, que resulta na formação de duas células filhas, que então retornam ao estado de repouso na fase G0. Em células neoplásicas, no entanto, essa sequência é alterada: sempre que a fase M termina, uma nova fase G1 é imediatamente iniciada, impedindo as células de retornarem ao estado de repouso na fase G0 (WENZEL; SINGH, 2018).

Um dos testes utilizados para avaliar o ciclo celular é a citometria de fluxo. Com a adição de IP na amostra, torna-se possível identificar a concentração de DNA, permitindo a distinção das diferentes fases do ciclo celular. Isso ocorre porque o citômetro de fluxo consegue detectar parâmetros cinéticos da população celular, revelando índices de DNA, aploidia e a fração de células em proliferação, o que possibilita a identificação das células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo (CROWLEY; CHOJNOWSKI; WATERHOUSE, 2016).

- **Procedimento experimental**

A linhagem celular HL60 foi cultivada em uma placa de 24 poços com densidade inicial de 5×10^4 células por poço, sendo mantida em estufa a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período de incubação, as células foram tratadas com as moléculas LC04 e LC14, ambas na concentração de 1 µM. Como controle positivo, utilizou-se a doxorrubicina nas concentrações de 0,1 µM e 0,5 µM, enquanto o controle negativo foi tratado com DMSO a 0,004%. Após o tempo de tratamento, as células foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos, lavadas uma vez com PBS e fixadas em álcool 80% a 4°C em microtubos de 1,5 mL por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos, marcadas com IP a uma concentração de 50 µg/mL por mais 30 minutos, centrifugadas novamente a 2500 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 300 µL de PBS. Por fim, as células foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSVerse™ após a incubação e centrifugação, com cerca de dez mil eventos avaliados.

Os dados foram analisados a partir da média $\pm$ desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados da porcentagem de células em Sub-G1 foram analisados separadamente das células em G0/G1, S e G2/M, sendo comparados por 1way e 2way ANOVA, respectivamente.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

- **Princípio do teste**

Esta técnica baseia-se na interação de um feixe de elétrons com a superfície de uma amostra, produzindo sinais que permitem a formação de imagens altamente detalhadas. Esses sinais são gerados quando o feixe de elétrons incide sobre a amostra e provoca a emissão de elétrons secundários, elétrons retroespalhados e, em alguns casos, raios X característicos. Os elétrons secundários, então são captados por detectores especializados e convertidos em um sinal elétrico, que é transformado em uma imagem detalhada no monitor (FABER; MCCONVILLE; LAMPRECHT, 2024; RUTHERFORD *et al.*, 2024).

- **Procedimento experimental**

As células foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de 50×10^4 células/poço e mantidas na estufa a uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Após esse período as células foram tratadas com as moléculas LC04 e LC14 por mais 24 horas. Após o período de exposição as células foram coletadas e transferidas para um microtubo para centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, em seguida as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e fixadas com glutaraldeído a 1% (v/v) e em tampão fosfato de sódio 0,15M a pH 7,2 durante 16 horas.

Em seguida as células passaram por um processo de desidratação em etanol nas concentrações de 30%, 50%, 70%, 100% e 100% (v/v) por 10 minutos cada entre uma concentração e outra era centrifugado a 1500 por 5 minutos e o sobrenadante descartado e colocado a concentração adjacente, para finalizar a desidratação foi utilizado hexametildissilano 50% (v/v) (HDMS, Sigma, St. Louis, MI, EUA) por 10 minutos, diluído em etanol por 10 min, centrifugado e por fim desidratado com HDMS 100%. Em seguida, as células foram colocadas em um suporte e cobertas com uma nuvem de ouro utilizando o equipamento de revestimento (Emitech-Q150TES, Quorum Technologies, Lewes, Inglaterra) e uma tomografia por emissão de pósitrons (PET), por fim realizada a análise em um microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG, FEI, Waltham, MA) com uma ampliação inicial de 20.000x.

3.7 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

- **Princípio do teste**

O composto conhecido como 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), pode ser oxidado intracelularmente por vários agentes oxidantes, tais como, peróxido de hidrogênio, ânion radical superóxido, hidroperóxidos lipídicos, entre outros; o que o torna um importante marcador para a determinação de EROs (BILSKI; BELANGER; CHIGNELL, 2002; KIM; XUE, 2020). O reagente DCFH-DA difunde-se passivamente pela membrana plasmática e no interior da célula é hidrolisado por uma enzima esterase, provocando a liberação de 2'-7'-diclorofluorescina (DCFH), a qual tem afinidade por espécies reativas de oxigênio. Desta forma, a DCFH liberada reage com as EROs liberando uma grande quantidade de substância fluorescente conhecida como 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), a qual é impermeável à membrana plasmática ficando aprisionada no meio intracelular, dessa forma é possível estimar os níveis de EROs intracelular (DCFH-DA+) de acordo com a intensidade de fluorescência produzida (YU *et al.*, 2021).

- **Procedimento experimental**

A linhagem celular HL60 foi cultivada em uma placa de 24 poços com densidade inicial de 5×10^4 células por poço, sendo mantida em estufa a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período de incubação, as células foram tratadas com as moléculas LC04 e LC14, ambas na concentração de 1 µM. Após o período de 3 e 6 horas, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O pellet composto por células foi ressuspenso em um local protegido da luz em uma solução contendo DCFH-DA a uma concentração de 10 µM por 30 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas em PBS (1x) e em seguida levadas para a análise.

A análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD FACSVerserTM, cerca de 10 mil eventos foram analisados por amostra e os dados dos resultados foram extraídos através do software FlowJo[®].

3.8 Isolamento de mRNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR

- **Princípio do teste**

A PCR em tempo real (RT-qPCR) é um método fluorimétrico que possibilita a visualização da amplificação do transcrito em tempo real, permitindo estimar a quantidade de mRNA presente na amostra de acordo com a quantidade de ciclos necessários para atingir determinado ponto (threshold cycle ou CT). A quantidade de ciclos necessários para a amplificação do transcrito é diretamente proporcional ao CT e inversamente proporcional a quantidade de mRNA. Para mensurar a amplificação, são utilizados compostos fluorescentes como o SYBR® Green, este, possui a capacidade de se ligar a dupla fita gerada da reação de amplificação do cDNA (DNA complementar), a quantidade de cDNA é proporcional a concentração de mRNA da amostra. Ao se ligar, o composto emite fluorescência sendo esta medida pelo equipamento, e assim, mensurando a concentração relativa do transcrito na amostra (HEID *et al.*, 1996; WANG; ZHU; LEVY, 2006).

- **Procedimento experimental**

As células foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de 50×10^4 células/poço e mantidas na estufa a uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Após esse período as células foram tratadas com as moléculas LC04 e LC14. Após o período de 24 horas^[EL1] de exposição às moléculas o RNA das células foi extraído utilizando o método TRIzol® (Life Technologies), em seguida foi realizada a transcrição reversa e obtenção do DNA complementar, que foi obtido utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Life Technologies), a conversão foi realizada utilizando o termociclador Verity® (Thermo Scientific). A concentração e a qualidade do RNA foram determinadas através do equipamento espectrofotômetro NanoDrop (Kisker, Germany).

Os genes selecionados para a avaliação da expressão gênica foram aqueles relacionados a morte celular e danos ao DNA como *BCL-2* (NM_000633.3), *BAX* (NM_138764.5), *H2AFX* (NM_002105.3), *PARP1* (NM_001618.3) e *TP53* (NM_205264.1). A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System-Time (Applied Biosystems, EUA) e o

sistema de detecção Fast SybrGreen (Applied Biosystems, EUA). Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados de acordo com os protocolos descritos pelo Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments- MIQE Guidelines (BUSTIN *et al.*, 2009). O nível de expressão foi calculado utilizando o método $\Delta\Delta C_t$, normalizando as amostras em relação ao gene de referência *GAPDH* (NM_002046.6) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

3.9 Análise estatística

Os dados apresentados neste estudo foram expressos como média $\pm$ SEM ou como valores de concentração inibitória de 50% (CI50), acompanhados de seus respectivos intervalos de confiança de 95%, obtidos por regressão não linear. As análises quantitativas dos experimentos *in vitro*, tanto celulares quanto moleculares, foram baseadas na média e no desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística entre os diferentes grupos e condições experimentais foi determinada por análise de variância (ANOVA), seguida dos pós-testes de Comparação Múltipla de Bonferroni ou Tukey, adotando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no software Prism 5.0 (GraphPad Software).

4. RESULTADOS

4.1 As moléculas derivadas de naftoquinonas demonstraram maior atividade citotóxica na linhagem de leucemia mieloide aguda HL60

Inicialmente, as 30 substâncias foram avaliadas nas três linhagens celulares. Dentre essas moléculas, 4 apresentaram atividade inibitória acima de 10% a 10 μ M na linhagem celular AGP-01. As moléculas LC-04, LC-09, TTRZ01 e TTRZ02 apresentaram uma leve inibição (Tabela 1 e Figura 4C). LC-04 apresentou a maior atividade inibitória contra AGP-01, apresentando uma porcentagem de inibição de 17,67% (Tabela 1). Na linhagem celular HCT-116, 7 apresentaram atividade inibitória acima de 10% a 10 μ M. A melhor atividade inibitória foi TTRZ04, apresentando uma porcentagem de inibição de 25,8% (Tabela 1 e Figura 4A). A linhagem celular leucêmica HL60 foi a mais sensível às moléculas testadas com quatro delas exibindo uma inibição do crescimento celular superior a 90%, enquanto a molécula TTRZ03

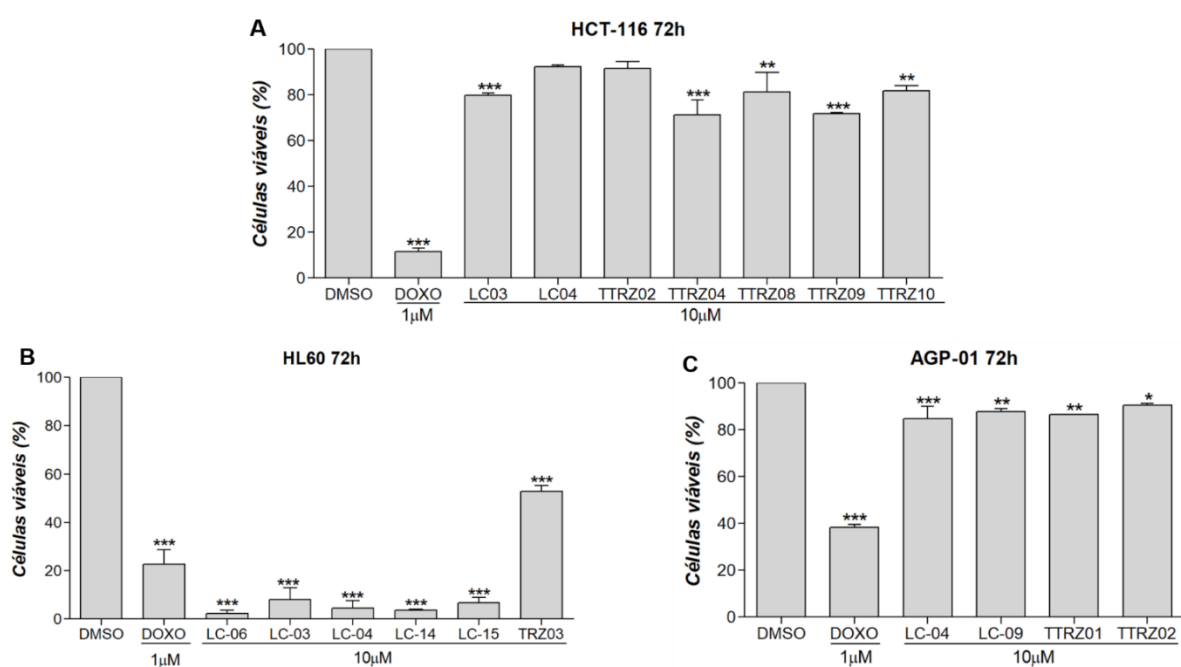
alcançou uma inibição de 47%. (Tabela 1). As moléculas LC-04 e LC-14 induziram a inibição com valores de 95,43% e 96,39%, respectivamente (Tabela 1 e Figura 4B), em relação à HL60.

Tabela 1 - Atividade inibitória de 30 substâncias testadas na concentração de 10 μ M após 72 horas de tratamento nas linhagens celulares AGP-01, HCT-116 e HL60. Os valores percentuais inibitórios obtidos através do ensaio Alamar Blue estão indicados e os resultados da análise de variância (ANOVA) realizada no programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad Software), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Os valores com maior porcentagem de inibição estão destacados em negrito.

Substâncias	Percentual de Inibição (%)		
	AGP-01	HCT-116	HL60
<i>Doxorrubicina</i>	58,52	88,40	77,36
<i>LC-01</i>	2,34	-4,83	-20,05
<i>LC-02</i>	2,17	-6,42	12,50
<i>LC-03</i>	9,11	16,79	91,97
<i>LC-04</i>	17,67	11,85	95,43
<i>LC-05</i>	4,77	-2,31	10,69
<i>LC-07</i>	3,08	-1,09	-0,02
<i>LC-08</i>	5,29	4,69	-0,93
<i>LC-09</i>	12,12	4,46	-13,56
<i>LC-10</i>	7,50	-15,60	-57,29
<i>LC-11</i>	-1,44	-12,46	-66,76
<i>LC-12</i>	-1,71	-3,30	17,71
<i>LC-13</i>	10,78	9,18	-89,50
<i>LC-14</i>	10,65	9,98	96,39
<i>LC-15</i>	9,88	5,82	93,23
<i>LC-16</i>	0,25	-3,17	-6,97
<i>LC-17</i>	-0,08	-13,28	-86,38
<i>LC-18</i>	6,98	-16,08	-68,96
<i>LC-19</i>	0,92	-8,88	34,12
<i>LC-20</i>	6,28	-6,10	-90,32
<i>TTRZ01</i>	15,23	2,31	-66,15
<i>TTRZ02</i>	11,38	15,05	-58,99
<i>TTRZ03</i>	7,47	5,64	47,29
<i>TTRZ04</i>	6,66	25,80	19,08
<i>TTRZ05</i>	4,46	8,78	-38,79
<i>TTRZ06</i>	8,36	-1,01	-52,03
<i>TTRZ07</i>	-1,17	2,28	-32,57
<i>TTRZ08</i>	4,03	14,52	-18,17
<i>TTRZ09</i>	7,76	17,79	-15,03
<i>TTRZ10</i>	8,60	15,36	-19,19

A Figura 3, mostra a representação da viabilidade celular e atividade inibitória das moléculas com melhores resultados de inibição sob as três linhagens celulares avaliadas, AGP-01, HCT-116 e HL60.

Figura 4 – Análise de concentração única nas linhagens de leucemia promielocítica aguda HL60 e tumores sólidos AGP-01 e HCT-116. (A) Atividade inibitória das moléculas LC03, LC04, TTRZ02, TTRZ04, TTRZ08, TTRZ09 e TTRZ10 na concentração única de 10 μ M após 72 horas de tratamento na linhagem celular HCT-116. **(B)** Atividade inibitória das moléculas LC03, LC04, LC14, LC15 e TTRZ03 em concentração única de 10 μ M após 72 horas de tratamento na linhagem celular HL60. **(C)** Atividade inibitória das moléculas LC04, LC09, TTRZ01 e TTRZ02 na concentração única de 10 μ M após 72 horas de tratamento na linhagem celular AGP-01.



Posteriormente, foi realizado um ensaio para determinar os valores de CI50 (Tabela 2), utilizando exclusivamente a linhagem celular HL60. Esse estudo teve como base os resultados do experimento de concentração única, no qual foram selecionadas moléculas com taxa de inibição do crescimento celular superior a 50%, além da linhagem celular que se mostrou mais sensível a essas moléculas. Entre as moléculas selecionadas, destacaram-se LC03, LC04, LC14 e LC15, que foram escolhidas para a avaliação do CI50. Os resultados obtidos foram: LC03 com CI50 de 1,28 μM , LC14 com 1,08 μM , LC15 com 1,7 μM e LC04, que apresentou o menor valor de CI50, 0,74 μM .

Tabela 2 – Análise da citotoxicidade na linhagem de leucemia promielocítica aguda HL60. Valores de CI50 dos compostos mais potentes contra a linhagem de células cancerígenas HL60. CI50: Concentração de Inibição de 50% do crescimento celular.

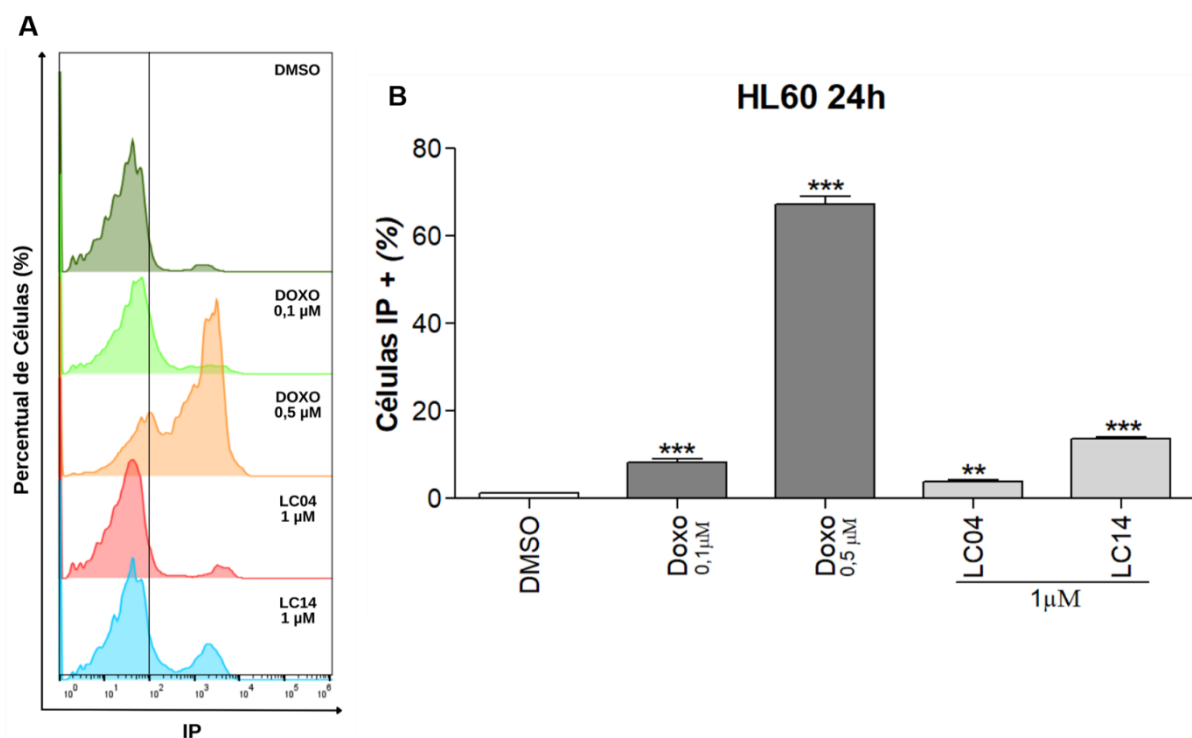
<i>Moléculas</i>	CI50 (μM) <i>95% Intervalo de Confiança</i>
LC03	1,28 (1,071 – 1,542) R^2 : 0,9363
LC04	0,74 (0,6804 – 0,8072) R^2 : 0,9816
LC14	1,08 (0,7988 – 1,475) R^2 : 0,9306
LC15	1,78 (1,599 – 1,983) R^2 : 0,9743

4.2 As moléculas LC04 e LC14 induz alteração na integridade de membrana na linhagem HL60

De acordo com as análises de dose única e CI50, as moléculas LC04 e LC14 tiveram maior potencial antitumoral na linhagem HL60 e por isso seguiram para os demais testes para verificar seu mecanismo de ação. Assim, em seguida foi realizado o ensaio de avaliação da integridade de membrana para verificar se as moléculas testadas estão causando danos à membrana plasmática das células, um

indicador de citotoxicidade direta ou mecanismo de morte celular. A integridade da membrana citoplasmática foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o IP como agente fluorescente para marcação nuclear, permitindo a análise posterior por citometria de fluxo. A Figura 5 apresenta a porcentagem de células não viáveis da linhagem HL60 após incubação com as moléculas LC04 e LC14, ambas na concentração de 1 μM . Observa-se que o grupo tratado com LC04 não apresentou aumento significativo na porcentagem de células não viáveis em comparação ao controle, registrando um valor de 4,14%. Em contrapartida, o tratamento com LC14 resultou em um aumento significativo na proporção de células não viáveis ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo, atingindo 13,9% de células positivas para IP.

Figura 5 – Análise da alteração da integridade da membrana da linhagem celular HL60 após exposição às moléculas LC04 e L14 por 24 horas, avaliando a incorporação significativa de iodo de propídeo (IP) pelas células não viáveis. **(A)** Histograma representativo proveniente do programa de análise FlowJo, demonstrando o percentual de células não viáveis. **(B)** Gráfico de barras proveniente do programa GraphPrism 5.1, demonstrando o percentual de células não viáveis e as diferenças estatísticas entre elas indicado pelo símbolo (*).



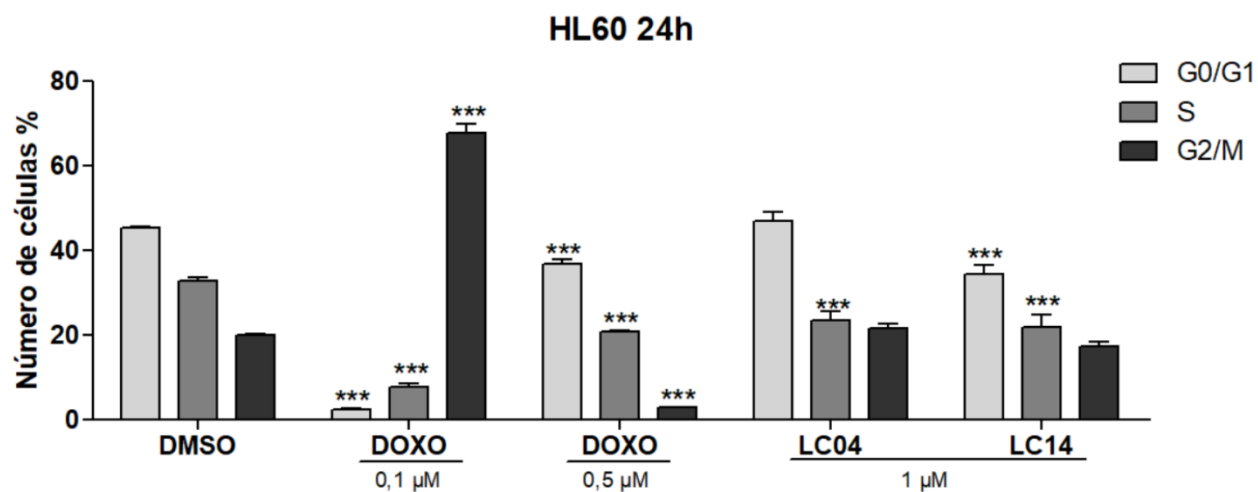
4.3 As moléculas LC04 e LC14 induzem fragmentação no DNA e bloqueio no ciclo celular nas na linhagem HL60

Em sequência, avaliou-se o impacto das moléculas LC04 e LC14 sobre o ciclo celular e a fragmentação do DNA na linhagem HL60, por meio da quantificação do DNA utilizando o IP como marcador do conteúdo de DNA, por citometria de fluxo. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 6A, onde o controle negativo apresentou 45,15% das células na fase G0/G1, 32,75% na fase S e 19,85% na fase G2/M. Após a exposição das células às moléculas LC04 e LC14, em uma concentração de 1 μ M durante 24 horas, observou-se alterações na distribuição celular, com uma diminuição de 10% na fase G0/G1 nas células tratadas com LC14 (34,40%) e uma redução de 10,45% na fase S nas células tratadas com LC04 (22,30%), quando comparadas ao controle negativo.

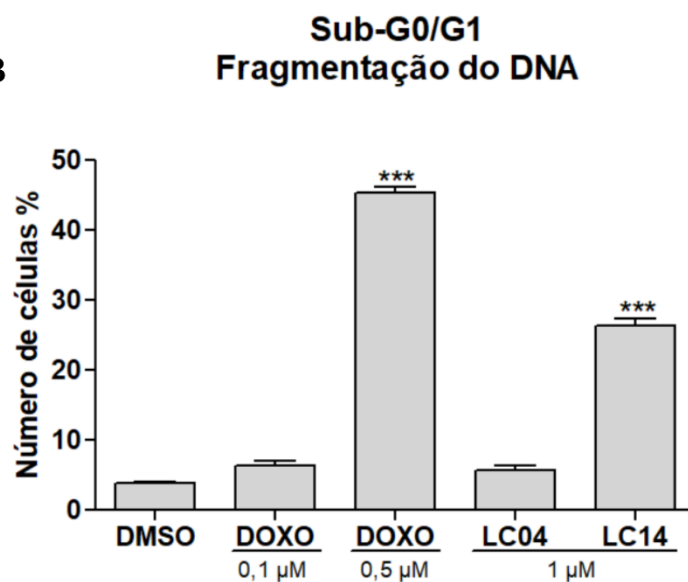
Além disso, o teste permitiu identificar uma população celular com fragmentação de DNA, evidenciando que a molécula LC14 promoveu um aumento na quantidade de células na fase Sub-G1. Essa condição sugere que as células perderam parte do material genético, uma característica associada à fragmentação nuclear. Na Figura 6B, observa-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com Doxo 0,5 μ M e LC14 1 μ M, com 45,23% de células apresentando fragmentação no grupo tratado com Doxo 0,5 μ M e 13,60% no grupo tratado com LC14 1 μ M.

Figura 6 - As moléculas LC04 e LC14 induzem fragmentação no DNA e bloqueio no ciclo celular na linhagem HL60. Análise do efeito do tratamento com as moléculas LC04 e LC14 na linhagem celular HL60 após 24 horas, focando na fragmentação do DNA e no bloqueio do ciclo celular. **(A)** É possível visualizar um gráfico de barras contendo a porcentagem do número de células em cada fase do ciclo celular. **(B)** É possível visualizar a porcentagem de células com fragmentação do DNA.

A



B

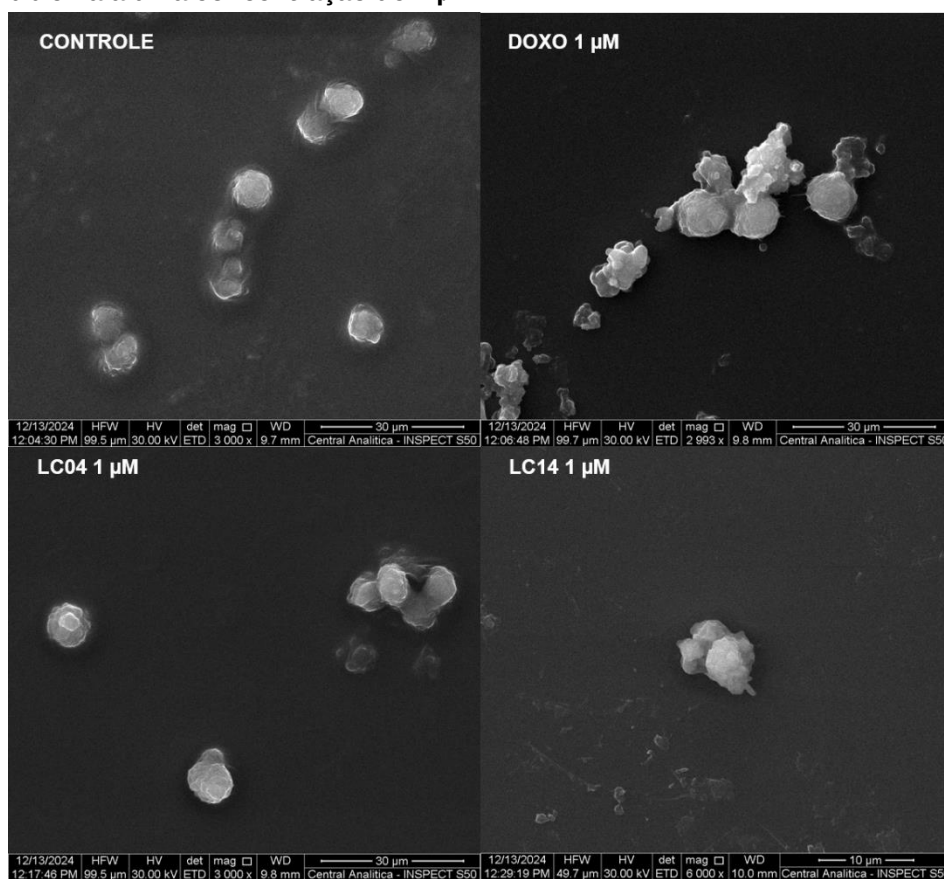


4.4 LC04 e LC14 induzem alterações morfológicas e danos na membrana da célula HL60

Em seguida, foi investigado a capacidade de alterar a morfologia celular pelas naftoquinonas estudadas. As análises demonstraram que as células do grupo controle, tratadas com DMSO (Fig. 7 – Painel Controle), mantiveram sua morfologia normal, apresentando formato esférico, volume preservado e superfície lisa, sem sinais de danos estruturais. As células tratadas com doxorrubicina a 1 μM (Fig. 7 – Painel DOXO 1 μM) exibiram alterações significativas, como contornos irregulares, presença de fragmentos celulares, redução do volume celular e textura superficial alterada.

As células tratadas com o composto LC04 a 1 μM (Fig. 7 – Painel LC04 1 μM) também apresentaram danos consideráveis à morfologia, incluindo alterações no formato celular, superfície irregular, redução no tamanho das células, formação de aglomerados e fragmentação celular. De forma semelhante, as células expostas ao composto LC14 a 1 μM (Fig. 7 – Painel LC14 1 μM) demonstraram aumento da rugosidade na superfície, deformações na estrutura celular, redução do volume e diminuição no número total de células. Além disso, foi possível observar a presença de restos celulares, indicando morte celular.

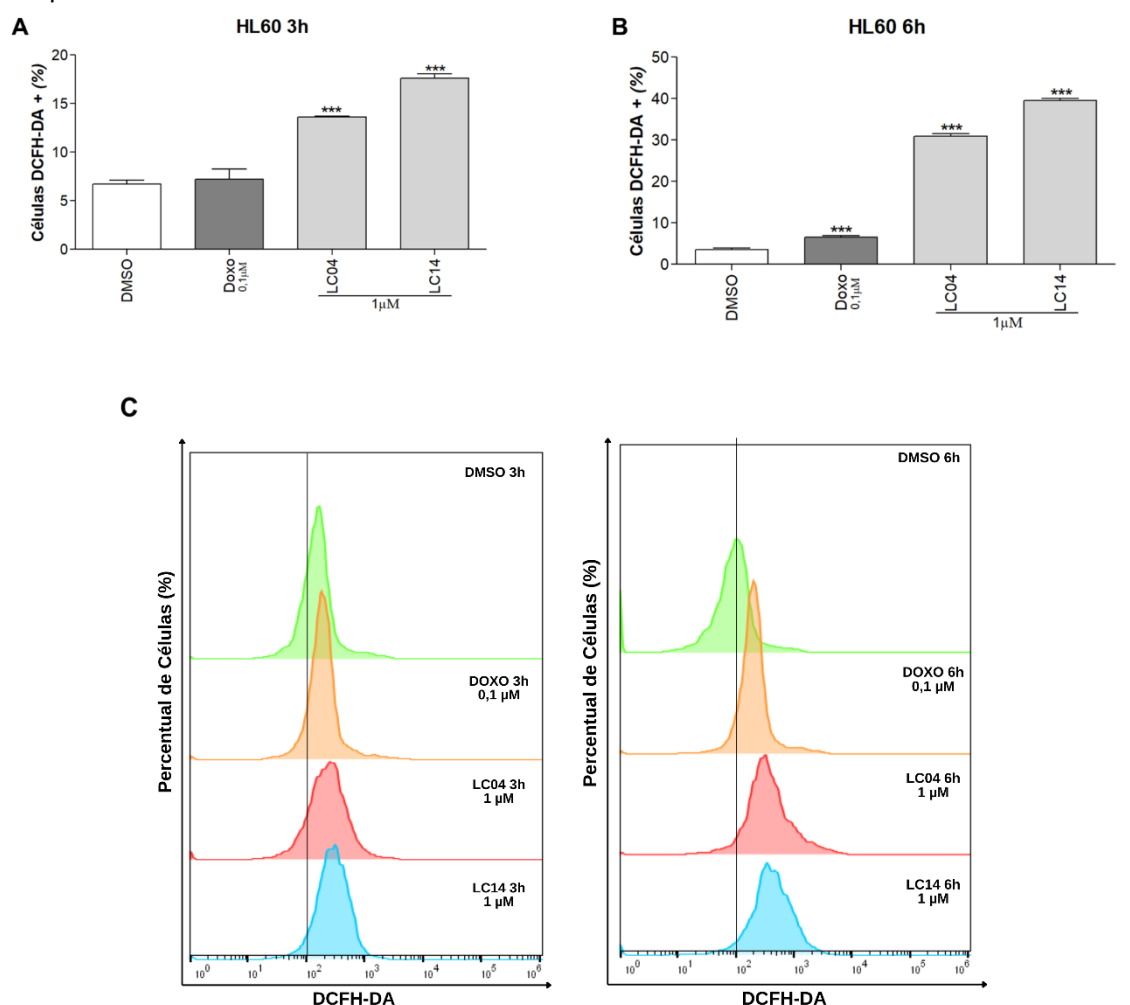
Figura 7 – Análise de MEV das células HL60 após exposição às moléculas LC04 e LC14 e Doxorrubicina a uma concentração de 1 μM .



4.5 As moléculas LC04 e LC14 promoveram a produção de EROs

Com o objetivo de avaliar a produção de EROs na linhagem celular HL60 foram estabelecidos os tempos de 3 e 6 horas, através da utilização do composto fluorescente DCFH-DA. Conforme apresentado na Figura 8, o tratamento com os compostos LC04 e LC14 (1 μM) resultou em um aumento significativo na porcentagem de células DCFH-DA+ em ambos os tempos analisados, comparado ao controle negativo (DMSO). Após 3 horas de tratamento, o composto LC04 elevou a produção de EROs para aproximadamente 12% ($p < 0,001$), enquanto LC14 atingiu valores próximos de 15% ($p < 0,001$). Após 6 horas, esses valores aumentaram para cerca de 35% (LC04) e 45% (LC14), respectivamente ($p < 0,001$).

Figura 8 – A exposição aos compostos LC04 e LC14 leva ao aumento na produção de EROs na linhagem leucêmica HL60 após o tempo de 3 e 6 horas. (A) Representação gráfica da população de células marcadas com DCFH-DA (DCFH-DA+) indicando aumento na produção de EROs no tempo de 3h e em **(B)** a representação do tempo de 6 horas. **(C)** Histograma representativo proveniente do programa de análise FlowJo, demonstrando o percentual de células DCFH-DA+ em seus respectivos tempos.

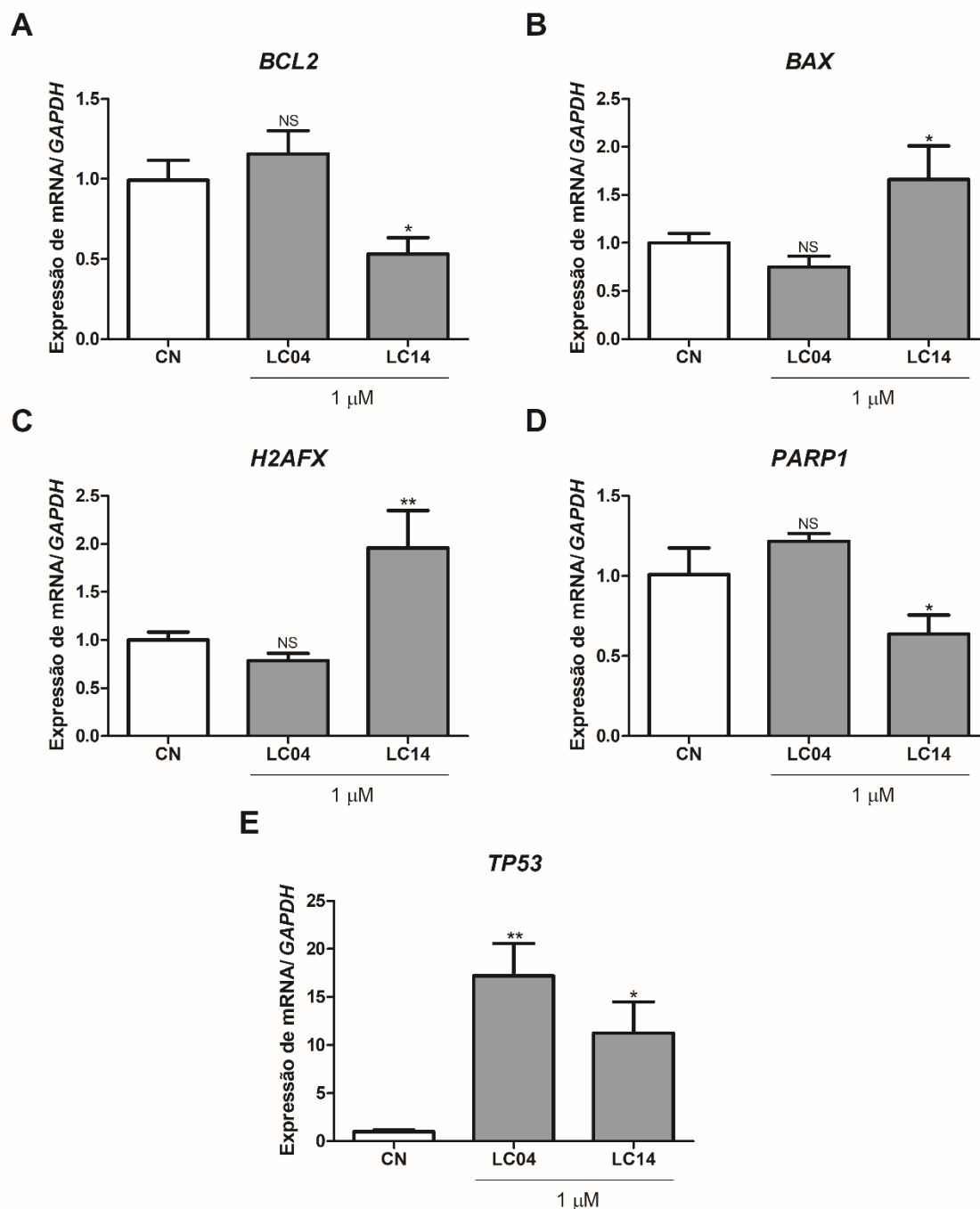


4.6 Análise de expressão de mRNA

Para explorar os efeitos das naftoquinonas sintéticas LC04 e LC14 na modulação da expressão gênica na linhagem HL60, foi avaliada a regulação de cinco genes relacionados à apoptose e ao reparo do DNA: *BCL2*, *BAX*, *H2AFX*, *PARP1* e *TP53* (Figura 9). Os resultados demonstraram que a LC14 (1 μ M) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a expressão do gene antiapoptótico *BCL2*, enquanto a LC04 não causou alteração significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo (CN) (Figura 9A). Por outro lado, o gene pró-apoptótico *BAX* foi significativamente hiper-regulado ($p < 0,05$) pelo tratamento com LC14, mas não pela LC04 ($p > 0,05$) (Figura 9B).

No caso do gene *H2AFX*, envolvido na resposta ao dano no DNA, ambas as naftoquinonas demonstraram efeitos distintos. A LC14 aumentou significativamente ($p < 0,01$) a expressão deste gene em comparação com o CN, enquanto a LC04 não apresentou alteração relevante ($p > 0,05$) (Figura 9C). Para o gene *PARP1*, que está associado ao reparo do DNA, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) na expressão em resposta à LC14, mas não à LC04 ($p > 0,05$) (Figura 9D). Por fim, o gene *TP53*, conhecido por seu papel central na regulação do ciclo celular e apoptose, foi altamente expresso após o tratamento com ambas as naftoquinonas. No entanto, a LC04 induziu uma expressão mais significativa ($p < 0,01$) em comparação à LC14 ($p < 0,05$), ambas significativamente superior ao CN (Figura 9E).

Figura 9 - Expressão relativa de mRNA de genes associados à apoptose e ao reparo do DNA em células da linhagem HL60 após tratamento com as naftoquinonas sintéticas LC04 e LC14 (1 μ M) por 24 horas^[EL3]. (A) *BCL2*: gene antiapoptótico; (B) *BAX*: gene pró-apoptótico; (C) *H2AFX*: envolvido na resposta ao dano no DNA; (D) *PARP1*: relacionado ao reparo do DNA; (E) *TP53*: regulador do ciclo celular e apoptose. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; NS: não significativo em comparação ao controle negativo (CN).^[EL4]



5. DISCUSSÃO

Estudos recentes apontam que os derivados de naftoquinonas vêm sendo amplamente investigados na química medicinal devido à sua capacidade de induzir citotoxicidade significativa em diversas células tumorais, tornando-se alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer (NAVARRO-TOVAR *et al.*, 2023; RAHMAN *et al.*, 2022; RAVICHANDIRAN *et al.*, 2024).

O presente estudo foi inicialmente conduzido para avaliar o potencial citotóxico de moléculas sintéticas derivadas de naftoquinonas, utilizando uma triagem com 30 substâncias em concentração única de 10 μ M (Tabela 1). Para isso, foram empregadas três linhagens celulares: AGP01, HCT116 e HL60. Durante o experimento, observou-se que as moléculas apresentaram maior efeito citotóxico na linhagem leucêmica HL60.

Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores (GUIMARÃES *et al.*, 2021; RAVICHANDIRAN *et al.*, 2024; SAYAHI *et al.*, 2024) que apontaram para o efeito citotóxico mais acentuado das naftoquinonas em células leucêmicas, em comparação com outros tipos celulares. Um exemplo relevante é o estudo realizado com as linhagens HL60 e HL60R (esta última com características de resistência múltipla a fármacos), que investigou o efeito anticâncer do óleo essencial (OE) derivado de *Glandora rosmarinifolia*. Esse óleo, rico em um isômero hidroximetil-naftoquinona, demonstrou atividade citotóxica dependente da concentração em linhagens leucêmicas, com baixa toxicidade para células epiteliais normais (hTERT RPE-1) (LABBOZZETTA *et al.*, 2022).

No presente trabalho, os dados obtidos revelaram que quatro moléculas testadas (LC03, LC04, LC14 e LC15) apresentaram inibição da atividade de crescimento celular superior a 90%, evidenciando a alta eficácia dessas moléculas contra a linhagem leucêmica HL60. Esses resultados reforçam o potencial dessas substâncias e justificam a continuidade de estudos para investigar seus mecanismos de ação.

Ao determinar a CI50 das moléculas selecionadas, observou-se que LC04 e LC14 apresentaram os melhores desempenhos conforme observado na Tabela 2, indicando que essas moléculas possuem maior citotoxicidade, sendo, portanto,

escolhidas para análises mais aprofundadas. A investigação focou-se na identificação dos mecanismos que conferem a essas moléculas suas atividades diferenciadas.

Uma característica importante das moléculas LC04 e LC14 é que ambas são derivadas de naftoquinonas, compostos conhecidos por suas propriedades anticâncer. Esse dado corrobora com inúmeros estudos que exploram derivados de naftoquinonas sintéticas, cujas modificações pontuais na estrutura química influenciam significativamente sua atividade biológica. No estudo realizado por Pérez-Sacau *et al.*, 2007, demonstraram que pequenas alterações estruturais podem impactar diretamente a eficácia citotóxica dessas moléculas. Além disso, o trabalho realizado por Lee *et al.*, 2019, aprofundaram a compreensão dos mecanismos de ação das naftoquinonas, destacando que esses compostos atuam, em grande parte, induzindo estresse oxidativo e modulando vias apoptóticas, fatores críticos no combate a células leucêmicas.

Portanto, nosso estudo realizou análises de integridade da membrana celular e o ciclo celular, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de ação das moléculas LC04 e LC14. Conforme mostrado na Figura 5, a exposição às moléculas por 24 horas revelou alterações significativas na permeabilidade da membrana das células HL60 ($p < 0,001$). Notavelmente, enquanto LC04 não apresentou uma alteração significativa na integridade da membrana, sugerindo que sua ação citotóxica segue outra via, LC14 demonstrou uma ruptura pronunciada na membrana celular em comparação com o controle.

Os resultados obtidos foram corroborados por imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) presentes na Figura 7. As células tratadas com LC04 apresentaram danos moderados à superfície celular, sugerindo um estado apoptótico. Por outro lado, as células tratadas com LC14 mostraram danos mais severos, com células isoladas e deformadas, além de restos celulares espalhados, confirmando os resultados observados no ensaio de permeabilidade com IP. Esses achados estão alinhados com a literatura, como descrito por Montenegro e colaboradores, 2010, que relatou que a 1,4-naftoquinona induziu ruptura da membrana celular na linhagem leucêmica HL60, derivada de leucemia mieloide aguda.

Além das análises de integridade da membrana, também avaliamos as alterações no ciclo celular das células tratadas com LC04 e LC14 Figura 6. Nas

células expostas à molécula LC04, observou-se uma diminuição na quantidade de células na fase S do ciclo celular, sugerindo uma possível interferência na síntese de DNA e uma possível parada em G1. Esse efeito pode estar relacionado à interação com alvos específicos relevantes para essa etapa. Por sua vez, as células tratadas com LC14 apresentaram diminuições nas fases G0/G1 e S, acompanhadas por um aumento significativo de células na fase Sub-G0/G1, [ELS]indicando intensa fragmentação de DNA, o que impede a progressão para as fases subsequentes do ciclo celular.

Estudos anteriores, como o Labbozzetta e colaboradores, 2022 também relataram alterações no ciclo celular associadas à exposição a naftoquinonas. O mecanismo identificado nesses estudos sugere que tais compostos podem inibir a enzima topoisomerase II em seu sítio catalítico, resultando no bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1. Esses achados destacam a importância das moléculas LC04 e LC14 como potenciais agentes terapêuticos no tratamento de leucemias.

Além dos mecanismos descritos na literatura de efeitos das naftoquinonas como efeito citotóxico (QIN *et al.*, 2022), alteração na membrana (DURÁN *et al.*, 2023) e parada no ciclo celular (TRIPATHI; PANDA; BISWAL, 2019), as naftoquinonas também podem apresentar mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio.

Vukic *et al.*, 2020, avaliaram os efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos das naftoquinonas α -metilbutirilshikonina, acetilshikonina e β -hidroxiiisovalerilshikonina, referidas no estudo como compostos 1, 2 e 3, respectivamente. O estudo utilizou duas linhagens celulares: HCT-116, de câncer de cólon, e MDA-MB-231, de câncer de mama. Observou-se que as três moléculas aumentaram os níveis de EROs e óxido nítrico nas células tratadas em comparação com as não tratadas, com o efeito mais forte registrado nas primeiras 24 horas de tratamento. Esse aumento gerou estresse oxidativo em ambas as linhagens celulares, contribuindo para os efeitos antiproliferativo e pró-apoptótico dos compostos. Além disso, foi identificada uma interação entre os compostos e o DNA na região AT do sulco menor, uma área comumente associada à ação de fármacos anticâncer, sugerindo uma atividade antitumoral.

Os nossos resultados demonstraram que os compostos LC04 e LC14, ambos na concentração de 1 μ M, induziram um aumento significativo na porcentagem de células positivas para DCFH-DA (células DCFH-DA+), quando comparados ao controle negativo (DMSO).

Esses achados evidenciados na Figura 8, indicam que os compostos LC04 e LC14 possuem propriedades pró-oxidantes significativas, capazes de induzir a produção de EROs na linhagem HL60 de forma tempo-dependente. Além disso, o maior impacto observado com o composto LC14, em ambos os períodos analisados, sugere que esse composto é mais efetivo na promoção de estresse oxidativo celular. Tais resultados são relevantes para compreender os mecanismos pelos quais esses compostos podem influenciar processos celulares relacionados ao estresse oxidativo, possivelmente contribuindo para a citotoxicidade em células leucêmicas.

Estudos realizados por nosso grupo evidenciaram a ação anticâncer de duas moléculas da classe das naftoquinonas. No estudo conduzido por Da Silva *et al.*, 2022, foi identificada a naftoquinona denominada 8-hydroxy-2-((4-nitrophenyl)thio)naphthalene-1,4-dione (CNN16), que apresentou resultados significativos em modelo experimental de câncer de cólon (HCT-116), com efeitos citotóxicos a uma CI50 de 5,32 μ M. Quando testada em células não cancerígenas, como MRC-5 e MNP-01, CNN16 demonstrou menor citotoxicidade, com CI50 de 9,36 e 10,77 μ M, respectivamente. Além disso, a CNN16 apresentou atividade anticlonogênica, inibindo a formação de colônias na linhagem HCT-116, causando danos ao DNA e induzindo apoptose em concentrações mais altas. A molécula também aumentou a permeabilidade da membrana plasmática e induziu a condensação da cromatina sem sinais de morte por necrose. O composto CNN16 aumentou significativamente os níveis de ROS nas células tratadas após 3h de exposição em comparação com as células não tratadas, sugerindo que o mecanismo principal de ação da CNN16 possui relação com danos ao DNA através da produção de ROS, regulação da expressão gênica pró e antiapoptótica e desencadeamento da polarização mitocondrial levando a ativação da via de apoptose intrínseca.

O outro estudo realizado por nosso grupo de Sousa Portilho *et al.*, 2022, avaliou o potencial anticâncer da 1,4-naftoquinona (CNN1) como possível agente seletivo em um modelo experimental com a linhagem de leucemia mieloide crônica

(LMC) K-562 e sua variante resistente à quimioterapia, FEPS. Os resultados mostraram que a molécula CNN1 induziu apoptose por meio da expressão de genes associados ao dano no DNA, como o gene *H2AFX*, e causou despolarização do potencial de membrana mitocondrial, indicando morte celular programada. Após análises morfológicas, esse mecanismo foi confirmado, com observação de dano ao DNA e externalização de fosfatidilserina, um importante marcador de apoptose. De forma semelhante ao estudo anterior conduzido pelo nosso grupo (DE SOUSA PORTILHO *et al.*, 2022), os resultados também apontaram a modulação da expressão do gene *H2AFX* nas células tratadas com o derivado de naftoquinona LC14, sugerindo uma possível ativação do processo apoptótico nas células HL60. No entanto, os efeitos observados nas células tratadas com LC04 foram menos expressivos, indicando uma diferença na eficácia entre os dois compostos.

No estudo conduzido por Wang *et al.*, 2023, foi demonstrado que uma naftoquinona (IP-DNQ) induz a geração de EROs resultando em danos extensivos ao DNA e hiperativação da enzima *PARP1*, culminando na morte celular por apoptose e necrose programada. Comparando esses achados com os resultados do presente estudo, as naftoquinonas LC04 e LC14 também elevaram significativamente os níveis de ROS, mas demonstraram efeitos distintos sobre a expressão dos genes relacionados à resposta ao dano no DNA.

A LC14 apresentou a redução significativa da expressão do gene *PARP1*, enquanto a LC04 não alterou este gene de maneira significativa. Esses resultados são particularmente interessantes, pois diferem do observado por Wang *et al.*, 2023, onde a hiperativação de *PARP1* em resposta ao dano no DNA mediado por ROS foi um fator determinante para a morte celular. No presente estudo, a redução de *PARP1* em resposta à LC14 pode refletir uma estratégia adaptativa das células tumorais para evitar a hiperativação metabólica de *PARP1*, que poderia levar à depleção de NAD^+ e ATP. Esse mecanismo alternativo pode favorecer uma forma de apoptose mais controlada, mantendo o equilíbrio energético enquanto promove a morte celular programada. A ausência de alterações na expressão de *PARP1* após o tratamento com LC04 reforça a ideia de que essa molécula possui menor impacto no reparo do DNA, o que pode estar relacionado à menor magnitude de danos genotóxicos ou ao envolvimento de outras vias celulares.

Assim, enquanto Wang *et al.*, 2023 destacam o papel crítico da hiperativação de PARP1 na indução da morte celular em resposta a ROS, nossos resultados sugerem que a LC14 induz um tipo de dano ao DNA suficiente para ativar genes de resposta ao estresse, como *H2AFX*, mas suprime a expressão de *PARP1*, potencialmente regulando a extensão dos processos de reparo do DNA. Essa modulação diferencial pode conferir um equilíbrio entre promover a morte celular e preservar os recursos energéticos, o que pode ser vantajoso em um contexto terapêutico.

Em um estudo realizado por De Almeida *et al.*, 2021, foi investigado o papel antitumoral de uma naftoquinona denominada CNFD em linhagens de câncer de mama MCF-7. Os resultados demonstraram que essa molécula induziu a morte celular programada por meio do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da ativação das vias de sinalização JNK e p38. Essas vias, relacionadas ao gene *BCL-2*, promoveram a modulação da transcrição desse gene e a fosforilação de proteínas associadas, resultando em sua inativação. Consequentemente, o estudo revelou que a CNFD reduziu significativamente a expressão de *BCL-2*, favorecendo a apoptose em células cancerígenas. De forma semelhante, em nosso estudo, foi observada uma redução na expressão de *BCL-2* nas células tratadas com LC14 e um efeito não significativo nas células tratadas com LC04.

Zhang *et al.*, 2024 investigaram compostos híbridos de 1,4-naftoquinona-cromeno como potenciais agentes antitumorais, com foco nas linhagens celulares K562 (leucemia) e A549 (câncer de pulmão). Dentre os compostos avaliados, o 4ac destacou-se por sua significativa atividade citotóxica, sendo sugerido que ele pode regular a via p53-MDM2, alterar a razão *Bax/Bcl-2* e promover a liberação de citocromo c, ativando, assim, a via apoptótica mitocondrial. Esses achados indicam que o composto 4ac modula a expressão do gene *BAX*, aumentando sua expressão relativa em relação ao gene *BCL2*, o que favorece a apoptose em células cancerígenas. Em nossos estudos, foi identificado um aumento na expressão do gene *BAX* em células tratadas com LC14. Contudo, esse efeito não foi observado nas células tratadas com LC04. Além disso, a baixa expressão de *BCL2* nas células

tratadas com LC14 reforça a hipótese de um possível efeito pró-apoptótico específico desse composto.

Com relação a modulação da expressão gênica do gene *TP53*, o artigo publicado por Meireles da Costa e colaboradores, 2021, relata que a perda ou a disfunção do p53 nas células cancerígenas compromete a capacidade do organismo de impedir a divisão celular descontrolada, uma das principais características do câncer. A pesquisa sugere que restaurar a função do p53, talvez através de terapias que modulam sua interação com outras proteínas reguladoras como o HMGA, pode ser uma abordagem promissora para o tratamento do câncer, ajudando a restabelecer o controle do ciclo celular e a indução de apoptose em células tumorais.

Os achados deste estudo demonstram que o gene *TP53*, amplamente reconhecido por sua função na regulação do ciclo celular e indução de apoptose, foi significativamente modulado pelo tratamento com as naftoquinonas LC04 e LC14, sendo a LC04 mais efetiva ($p < 0,01$). No artigo publicado por Meireles da Costa e colaboradores, 2021, destaca o impacto da disfunção do p53 no desenvolvimento do câncer e sugere que a restauração de sua atividade pode ser uma estratégia terapêutica promissora. A maior indução de *TP53* observada no tratamento com LC04 pode indicar que essa molécula favorece a ativação de vias regulatórias críticas, promovendo o controle do ciclo celular e a apoptose, aspectos essenciais para a supressão tumoral.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que as moléculas LC14 e LC04 apresentaram desempenhos distintos, porém relevantes, nos experimentos conduzidos, destacando-se como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de leucemia. A LC14 demonstrou uma citotoxicidade levemente inferior à LC04, com CI50 de 1,08 μ M, no entanto obteve um impacto mais acentuado nos mecanismos relacionados à integridade da membrana celular, fragmentação de DNA e aumento na produção EROs. Além disso, os dados apontam que a LC14 induziu intensas alterações no ciclo celular, com uma notável acumulação de células em Sub-G0/G1, indicando fragmentação celular e possíveis danos irreversíveis à estrutura celular. No contexto molecular, a LC14 também mostrou maior capacidade de modular genes associados à apoptose, como *BAX*, *BCL2* e *H2AFX*, além de reduzir a expressão de *PARP1*, sugerindo um mecanismo equilibrado entre danos ao DNA e controle energético celular. Por outro lado, a LC04 apresentou um perfil diferenciado, destacando-se pela menor indução de danos à membrana e fragmentação de DNA, mas com uma modulação mais efetiva do gene *TP53*. Essa molécula parece exercer sua ação principalmente através da interferência na síntese de DNA, promovendo parada do ciclo celular na fase G1 e induzindo menor, porém significativo, aumento na produção de EROs em comparação à LC14. Esses achados sugerem que a LC04 pode ativar mecanismos regulatórios críticos no controle do ciclo celular e de apoptose, sem provocar rupturas acentuadas na membrana celular.

Portanto, enquanto a LC14 demonstrou maior eficácia na promoção de estresse oxidativo e danos estruturais irreversíveis, a LC04 mostrou-se promissora no estímulo a vias regulatórias fundamentais, como a modulação de *TP53*. Em conjunto, esses compostos destacam-se como alvos de interesse para futuras investigações e desenvolvimento de terapias personalizadas no combate a leucemias.

7. REFERENCIAS

ABLA, O. et al. Predictors of thrombohemorrhagic early death in children and adolescents with t(15;17)-positive acute promyelocytic leukemia treated with ATRA and chemotherapy. **Annals of Hematology**, v. 96, n. 9, p. 1449–1456, 8 set. 2017.

ADAMS, J.; NASSIRI, M. Acute Promyelocytic Leukemia: A Review and Discussion of Variant Translocations. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 139, n. 10, p. 1308–1313, 1 out. 2015.

AHMADI, E. S. et al. Naphthoquinone Derivatives Isolated from Plants: Recent Advances in Biological Activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 2019–2035, 28 dez. 2020.

ALEIXO, G. H. et al. Leucemias: Um Panorama Geral das Manifestações Clínicas, Abordagens Diagnósticas e Estratégias de Tratamento. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 8, p. 3715–3725, 22 ago. 2024.

ALEX, A. A. et al. Arsenic Trioxide Resistance: More to It Than Mutations in PML-RAR α . **Blood**, v. 124, n. 21, p. 3605–3605, 6 dez. 2014.

AMININ, D.; POLONIK, S. 1,4-Naphthoquinones: Some Biological Properties and Application. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 68, n. 1, p. 46–57, 1 jan. 2020.

ANGULO-ELIZARI, E. et al. Unlocking the potential of 1,4-naphthoquinones: A comprehensive review of their anticancer properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 268, p. 116249, mar. 2024.

ANILKUMAR, K. K.; MANOJ, V. J.; SAGI, T. M. A review on computer aided detection and classification of leukemia. **Multimedia Tools and Applications**, v. 83, n. 6, p. 17961–17981, 17 jul. 2023.

ARBER, D. A. et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. **Blood**, v. 140, n. 11, p. 1200–1228, 15 set. 2022.

AVVISATI, G. et al. AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. **Blood**, v. 88, n. 4, p. 1390–1398, 15 ago. 1996.

BALASUNDARAM, N. et al. Metabolic Rewiring Drives Resistance to Arsenic Trioxide in Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 3956–3956, 2 dez. 2016.

BECKER, A. J. et al. The Effect of Differing Demands for Blood Cell Production on DNA Synthesis by Hemopoietic Colony-Forming Cells of Mice. **Blood**, v. 26, n. 3, p. 296–308, 1 set. 1965.

BENNETT, J. E. et al. NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. **The Lancet**, v. 392, n. 10152, p. 1072–1088, set. 2018.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias F

rench -A merican -B ritish (FAB) C o-operative G roup. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, 12 ago. 1976.

BERCIER, P.; DE THÉ, H. History of Developing Acute Promyelocytic Leukemia Treatment and Role of Promyelocytic Leukemia Bodies. **Cancers**, v. 16, n. 7, p. 1351, 29 mar. 2024.

BERNARD, J. et al. Acute Promyelocytic Leukemia: Results of Treatment by Daunorubicin. **Blood**, v. 41, n. 4, p. 489–496, 1 abr. 1973.

BILSKI, P.; BELANGER, A. G.; CHIGNELL, C. F. Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 7, p. 938–946, out. 2002.

BLACKBURN, L. M.; BENDER, S.; BROWN, S. Acute Leukemia: Diagnosis and Treatment. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 6, p. 150950, dez. 2019.

BRUNNING, R. D. Classification of acute leukemias. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 20, n. 3, p. 142–153, ago. 2003.

BURKE, V. P.; STARTZELL, J. M. The Leukemias. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, n. 4, p. 597–608, nov. 2008.

CHAMOUN, K. et al. Unrecognized fluid overload during induction therapy increases morbidity in patients with acute promyelocytic leukemia. **Cancer**, v. 125, n. 18, p. 3219–3224, 15 set. 2019.

CHEN, K. Z. et al. Germline mutations: many roles in leukemogenesis. **Current Opinion in Hematology**, v. 27, n. 4, p. 288–293, jul. 2020.

CROWLEY, L. C. et al. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. pdb.prot087163, 1 jul. 2016.

CROWLEY, L. C.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 10, p. pdb.prot087247, 3 out. 2016.

CUNNINGHAM, I. et al. Acute promyelocytic leukemia: treatment results during a decade at Memorial Hospital. **Blood**, v. 73, n. 5, p. 1116–1122, 1 abr. 1989.

DA ROCHA, D. R. et al. Synthesis of new 9-hydroxy- α - and 7-hydroxy- β -pyran naphthoquinones and cytotoxicity against cancer cell lines. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 4315, 2011.

DA SILVA, E. L. et al. Antitumoral effect of novel synthetic 8-hydroxy-2-((4-nitrophenyl)thio)naphthalene-1,4-dione (CNN16) via ROS-mediated DNA damage, apoptosis and anti-migratory effect in colon cancer cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 456, p. 116256, dez. 2022.

DE ALMEIDA, P. D. O. et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-

mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 343, p. 109444, jul. 2021.

DE BOTTON, S. et al. Incidence, Clinical Features, and Outcome of AllTrans-Retinoic Acid Syndrome in 413 Cases of Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood**, v. 92, n. 8, p. 2712–2718, 15 out. 1998.

DE FIGUEIREDO-PONTES, L. L. et al. Diagnosis and management of acute promyelocytic leukemia: Brazilian consensus guidelines 2024 on behalf of the Brazilian Association of Hematology, Hemotherapy and Cellular Therapy. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 46, n. 4, p. 553–569, out. 2024.

DE SOUSA PORTILHO, A. J. et al. 1,4-Naphthoquinone (CNN1) Induces Apoptosis through DNA Damage and Promotes Upregulation of H2AFX in Leukemia Multidrug Resistant Cell Line. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8105, 23 jul. 2022.

DE THÉ, H.; LE BRAS, M.; LALLEMAND-BREITENBACH, V. Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 1, p. 11–21, 9 jul. 2012.

DEY, I. et al. STAT5B::RAR α -positive acute promyelocytic leukemia: Role of next generation sequencing in detection of a rare malignancy. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, nov. 2024.

DONG, Y. et al. B(C 6 F 5) 3 -Catalyzed C–C Coupling of 1,4-Naphthoquinones with the C-3 Position of Indole Derivatives in Water. **ACS Omega**, v. 4, n. 25, p. 21567–21577, 17 dez. 2019.

DURÁN, A. G. et al. Biological Activity of Naphthoquinones Derivatives in the Search of Anticancer Lead Compounds. **Toxins**, v. 15, n. 5, p. 348, 20 maio 2023.

EGHBALIFERIZ, S. et al. Cytotoxic diterpene quinones from *Salvia tebesana* Bunge. **Fitoterapia**, v. 128, p. 97–101, jul. 2018.

ESNAULT, C. et al. FLT3-ITD impedes retinoic acid, but not arsenic, responses in murine acute promyelocytic leukemias. **Blood**, v. 133, n. 13, p. 1495–1506, 28 mar. 2019.

ESTEY, E. et al. Use of all-trans retinoic acid plus arsenic trioxide as an alternative to chemotherapy in untreated acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3469–3473, 1 maio 2006.

FABER, T.; MCCONVILLE, J. T.; LAMPRECHT, A. Focused ion beam-scanning electron microscopy provides novel insights of drug delivery phenomena. **Journal of Controlled Release**, v. 366, p. 312–327, fev. 2024.

FALANGA, A. et al. Cancer Procoagulant and Tissue Factor Are Differently Modulated by All-trans-Retinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia Cells. **Blood**, v. 92, n. 1, p. 143–151, 1 jul. 1998.

FENAUX, P. et al. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group. **Blood**, v. 82, n. 11, p. 3241–3249, 1 dez. 1993.

FENAUX, P. et al. A Randomized Comparison of All Transretinoic Acid (ATRA) Followed by Chemotherapy and ATRA Plus Chemotherapy and the Role of Maintenance Therapy in Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood**, v. 94, n. 4, p. 1192–1200, 15 ago. 1999.

FENAUX, P.; DEGOS, L. Treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid. **Leukemia Research**, v. 15, n. 8, p. 655–657, jan. 1991.

FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017. **JAMA Oncology**, v. 5, n. 12, p. 1749, 1 dez. 2019.

FLACH, J. et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 512, n. 7513, p. 198–202, 30 ago. 2014.

FRANKEL, S. R. et al. The “Retinoic Acid Syndrome” in Acute Promyelocytic Leukemia. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, n. 4, p. 292–296, 15 ago. 1992.

FRÖBEL, J. et al. The Hematopoietic Bone Marrow Niche Ecosystem. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 22 jul. 2021.

FUTURO, D. O. et al. The Antifungal Activity of Naphthoquinones: An Integrative Review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1 suppl 2, p. 1187–1214, 2018.

GALLAGHER, R. E. Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RARalpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2521–2528, 1 abr. 2003.

GHAVAMZADEH, A. et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide without ATRA and/or chemotherapy. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 1, p. 131–134, jan. 2006.

GIANSANTI, M. et al. Combination Treatment of Resistant Acute Promyelocytic Leukemia Cells with Arsenic Trioxide and Anti-Apoptotic Gene Inhibitors. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 11, p. 1529, 14 nov. 2024.

GRIGNANI, F. et al. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. **Cell**, v. 74, n. 3, p. 423–431, ago. 1993.

GRIGNANI, F. et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 10–25, 1 jan. 1994.

GUIDEZ, F. et al. RAR α -PLZF overcomes PLZF-mediated repression of CRABPI , contributing to retinoid resistance in t(11;17) acute promyelocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 47, p. 18694–18699, 20 nov. 2007.

GUIMARÃES, D. G. et al. Naphthoquinone-based Hydrazone Hybrids: Synthesis and Potent Activity Against Cancer Cell Lines. **Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 945–955, nov. 2021.

HAJISHENGALLIS, G.; LI, X.; CHAVAKIS, T. Immunometabolic control of

hematopoiesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 77, p. 100923, fev. 2021.

HAMBLEY, B. C.; TOMULEASA, C.; GHIAUR, G. Coagulopathy in Acute Promyelocytic Leukemia: Can We Go Beyond Supportive Care? **Frontiers in Medicine**, v. 8, 17 ago. 2021.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, out. 1996.

HERMSEN, J.; HAMBLEY, B. The Coagulopathy of Acute Promyelocytic Leukemia: An Updated Review of Pathophysiology, Risk Stratification, and Clinical Management. **Cancers**, v. 15, n. 13, p. 3477, 3 jul. 2023.

HILLESTAD, L. K. Acute Promyelocytic Leukemia. **Acta Medica Scandinavica**, v. 159, n. 3, p. 189–194, 12 jan. 1957.

HISADA, Y. Dysregulated hemostasis in acute promyelocytic leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 119, n. 5, p. 526–531, 11 maio 2024.

HOFFBRAND A. VICTOR, M. P. A. . **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7. ed. [s.l.] Artmed, 2018.

HORNA, P. et al. Diagnostic Immunophenotype of Acute Promyelocytic Leukemia Before and Early During Therapy With All-trans Retinoic Acid. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 142, n. 4, p. 546–552, 1 out. 2014.

HUANG, M. et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 72, n. 2, p. 567–572, 1 ago. 1988.

IACCARINO, L. et al. Mutational landscape of patients with acute promyelocytic leukemia at diagnosis and relapse. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 10, p. 1091–1097, 23 out. 2019.

ILAND, H. J. et al. Use of arsenic trioxide in remission induction and consolidation therapy for acute promyelocytic leukaemia in the Australasian Leukaemia and Lymphoma Group (ALLG) APML4 study: a non-randomised phase 2 trial. **The Lancet Haematology**, v. 2, n. 9, p. e357–e366, set. 2015.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia#:~:text=Sinais e sintomas,dor de cabeça%2C entre outros](https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia#:~:text=Sinais%20e%20sintomas,dor%20de%20cabeça%20entre%20outros)>. Acesso em: 10 set. 2024.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/por-neoplasia-taxas-ajustadas/leucemias>>. Acesso em: 10 set. 2024.

JAFFREDO, T. et al. The EHA Research Roadmap: Normal Hematopoiesis. **HemaSphere**, v. 5, n. 12, p. e669, dez. 2021.

JURCIC, J. G.; SOIGNET, S. L.; MASLAK, P. G. Diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia. **Current Oncology Reports**, v. 9, n. 5, p. 337–344, 19 set. 2007.

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

KARUNARATHNA, I. et al. Leukemia: Classification, Risk Factors, and Diagnostic Challenges. n. June 2024, 2001.

KASHI, M. E. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Naphthoquinones from Microbial Origin: An Updated Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 844–862, maio 2024.

KAYSER, S.; CONNEELY, S. E. Management of Acute Promyelocytic Leukemia at Extremes of Age. **Cancers**, v. 15, n. 14, p. 3637, 15 jul. 2023.

KAYYAL-TARABEIA, I. et al. Beyond lung cancer: air pollution and bladder, breast and prostate cancer incidence. **International Journal of Epidemiology**, v. 53, n. 4, 12 jun. 2024.

KIM, H.; XUE, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. **Journal of Visualized Experiments**, n. 160, 23 jun. 2020.

KUMAGAI, Y. et al. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 221–247, 10 fev. 2012.

KWAAN, H. The Unique Hemostatic Dysfunction in Acute Promyelocytic Leukemia. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 40, n. 03, p. 332–336, 3 mar. 2014.

KWAAN, H. C.; CULL, E. H. The coagulopathy in acute promyelocytic leukaemia – What have we learned in the past twenty years. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 27, n. 1, p. 11–18, mar. 2014.

LABBOZZETTA, M. et al. Antitumor Effect of Glandora rosmarinifolia (Boraginaceae) Essential Oil through Inhibition of the Activity of the Topo II Enzyme in Acute Myeloid Leukemia. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4203, 29 jun. 2022.

LANCET, J. E. et al. ATRA, Arsenic Trioxide (ATO), and Gemtuzumab Ozogamicin (GO) Is Safe and Highly Effective in Patients with Previously Untreated High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia (APL): Final Results of the SWOG/Alliance/ECOG S0535 Trial. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 896–896, 2 dez. 2016.

LEE, M. H. et al. Analysis of the Mechanisms of Action of Naphthoquinone-Based Anti-Acute Myeloid Leukemia Chemotherapeutics. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3121, 28 ago. 2019.

LEHMANN-CHE, J. et al. Dual origin of relapses in retinoic-acid resistant acute promyelocytic leukemia. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2047, 24 maio 2018.

LIGGETT, L. A.; SANKARAN, V. G. Unraveling Hematopoiesis through the Lens of

Genomics. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1384–1400, set. 2020.

LIQUORI, A. et al. Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. **Cancers**, v. 12, n. 3, p. 624, 8 mar. 2020.

LIU, Y. et al. The expression of annexin II and its role in the fibrinolytic activity in acute promyelocytic leukemia. **Leukemia Research**, v. 35, n. 7, p. 879–884, jul. 2011.

LÓPEZ-LÓPEZ, L. I. et al. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Amino Acid Naphthoquinone Derivatives as Potential Antibacterial Agents. **Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 102–109, 2022.

LÓPEZ LÓPEZ, L. I. et al. Naphthoquinones: biological properties and synthesis of lawsone and derivatives - a structured review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 3 dez. 2014.

MANTHA, S. et al. Predictive factors of fatal bleeding in acute promyelocytic leukemia. **Thrombosis Research**, v. 164, p. S98–S102, abr. 2018.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1483–1489, 25 set. 2015.

MEIRELES DA COSTA, N. et al. Interplay between HMGA and TP53 in cell cycle control along tumor progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 3, p. 817–831, 12 fev. 2021.

MENELL, J. S. et al. Annexin II and Bleeding in Acute Promyelocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 13, p. 994–1004, abr. 1999.

MISTRY, A. R. et al. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. **Blood Reviews**, v. 17, n. 2, p. 71–97, jun. 2003.

MONTENEGRO, R. C. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 3, p. 439–448, mar. 2010.

MÜLLER-SIEBURG, C. E. et al. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1302–1309, 15 ago. 2002.

NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, maio 1997.

NAVARRO-TOVAR, G. et al. The Relevance and Insights on 1,4-Naphthoquinones as Antimicrobial and Antitumoral Molecules: A Systematic Review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 4, p. 496, 27 mar. 2023.

NAYMAGON, L.; MASCARENHAS, J. Hemorrhage in acute promyelocytic leukemia: Can it be predicted and prevented? **Leukemia Research**, v. 94, p. 106356, jul. 2020.

NIU, C. et al. Studies on Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia With Arsenic Trioxide: Remission Induction, Follow-Up, and Molecular Monitoring in 11 Newly Diagnosed and 47 Relapsed Acute Promyelocytic Leukemia Patients. **Blood**, v. 94, n. 10, p. 3315–3324, 15 nov. 1999.

OELSCHLAEGEL, U. et al. HLA-DR neg patients without acute promyelocytic leukemia show distinct immunophenotypic, genetic, molecular, and cytomorphic characteristics compared to acute promyelocytic leukemia. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 76B, n. 5, p. 321–327, 16 set. 2009.

OLYAEI, A.; SADEGHPOUR, M.; KHALAJ, M. Mannich bases derived from lawsone and their metal complexes: synthetic strategies and biological properties. **RSC Advances**, v. 10, n. 51, p. 30265–30281, 2020.

OSMAN, A. E. G. et al. Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia in Adults. **Journal of Oncology Practice**, v. 14, n. 11, p. 649–657, nov. 2018.

PAIETTA, E. et al. A surrogate marker profile for PML/RAR α expressing acute promyelocytic leukemia and the association of immunophenotypic markers with morphologic and molecular subtypes. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 59B, n. 1, p. 1–9, 7 maio 2004.

PEREYRA, C. E. et al. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 207, 2 dez. 2019.

PÉREZ-SACAU, E. et al. Synthesis and Pharmacophore Modeling of Naphthoquinone Derivatives with Cytotoxic Activity in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cell Line. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 696–706, 1 fev. 2007.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 272–276, 1 out. 2018.

POLAMPALLI, S. et al. Role of RT-PCR and FISH in diagnosis and monitoring of acute promyelocytic leukemia. **Indian Journal of Cancer**, v. 48, n. 1, p. 60, 2011.

QIN, P. et al. Integrated decoding hematopoiesis and leukemogenesis using single-cell sequencing and its medical implication. **Cell Discovery**, v. 7, n. 1, p. 2, 5 jan. 2021.

QIN, T. et al. Design, synthesis, cytotoxicity evaluation and molecular docking studies of 1,4-naphthoquinone derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1263, p. 133067, set. 2022.

RAHMAN, M. M. et al. Naphthoquinones and derivatives as potential anticancer agents: An updated review. **Chemico-Biological Interactions**, v. 368, p. 110198, dez. 2022.

RAMAMOORTHY, T. et al. Assessing the Global Impact of Ambient Air Pollution on Cancer Incidence and Mortality: A Comprehensive Meta-Analysis. **JCO Global Oncology**, n. 10, mar. 2024.

RAVANDI, F. et al. Effective Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia With All-Trans -Retinoic Acid, Arsenic Trioxide, and Gemtuzumab Ozogamicin. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 4, p. 504–510, 1 fev. 2009.

RAVANDI, F. et al. Phase II Study of All-Trans Retinoic Acid (ATRA), Arsenic Trioxide (ATO), with or without Gemtuzumab Ozogamicin (GO) for the Frontline Therapy of Patients with Acute Promyelocytic Leukemia (APL). **Blood**, v. 116, n. 21, p. 1080–1080, 19 nov. 2010.

RAVICHANDIRAN, P. et al. In Vitro and In Vivo Biological Evaluation of Novel 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Potential Anticancer Agents. **ChemMedChem**, v. 19, n. 24, 16 dez. 2024.

RAWAT, J. et al. FAB classification of acute leukemia using an ensemble of neural networks. **Evolutionary Intelligence**, v. 15, n. 1, p. 99–117, 22 mar. 2022.

REN, F. et al. The $\text{CD}^+ \text{CD}^{11b} \text{HLA}^- \text{DR}^-$ immunophenotype can be used to diagnose acute promyelocytic leukemia. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 41, n. 2, p. 168–175, 13 abr. 2019.

RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 12, 1 dez. 2012.

RUTHERFORD, D. et al. Correlative atomic force microscopy and scanning electron microscopy of bacteria-diamond-metal nanocomposites. **Ultramicroscopy**, v. 258, p. 113909, abr. 2024.

SABLJIC, N. et al. Hemorrhage in acute promyelocytic leukemia—fibrinolysis in focus. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 5, p. 102499, jul. 2024.

SANZ, M. A. et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 1875–1891, 26 fev. 2009.

SANZ, M. A. et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 133, n. 15, p. 1630–1643, 11 abr. 2019.

SAYAH, M. H. et al. Design, synthesis, and cytotoxic activity of 2-amino-1,4-naphthoquinone-benzamide derivatives as apoptosis inducers. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 27302, 8 nov. 2024.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.

SHAO, W. et al. A Retinoid-Resistant Acute Promyelocytic Leukemia Subclone Expresses a Dominant Negative PML-RAR α Mutation. **Blood**, v. 89, n. 12, p. 4282–4289, 15 jun. 1997.

SHARMA, N.; LIESVELD, J. L. NPM 1 Mutations in AML—The Landscape in 2023. **Cancers**, v. 15, n. 4, p. 1177, 12 fev. 2023.

SHIMONY, S.; STAHL, M.; STONE, R. M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 3, p. 502–526, 13 mar. 2023.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 1, p. 7–33, 12 jan. 2022.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2025. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 75, n. 1, p. 10–45, 16 jan. 2025.

SINGH, C. et al. Factors associated with thrombo-hemorrhagic deaths in patients with Acute Promyelocytic leukemia treated with Arsenic Trioxide and all-trans retinoic acid. **Leukemia Research**, v. 134, p. 107392, nov. 2023.

SOIGNET, S. L. et al. Complete Remission after Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia with Arsenic Trioxide. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 19, p. 1341–1348, 5 nov. 1998.

SOIGNET, S. L. et al. United States Multicenter Study of Arsenic Trioxide in Relapsed Acute Promyelocytic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 18, p. 3852–3860, 15 set. 2001.

SPINELLI, O. et al. Simple, rapid and accurate molecular diagnosis of acute promyelocytic leukemia by loop mediated amplification technology. **Oncoscience**, v. 2, n. 1, p. 50–58, 27 dez. 2014.

STAHL, M.; TALLMAN, M. S. Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 187, n. 2, p. 157–162, 13 out. 2019.

STÅHLBERG, A. et al. Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 11, p. e105–e105, 20 jun. 2016.

STERGIOU, I. E.; KAPSOGEOURGOU, E. K. Autophagy and Metabolism in Normal and Malignant Hematopoiesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8540, 9 ago. 2021.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

TAMAMYAN, G. et al. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 110, p. 20–34, fev. 2017.

TESTA, U.; PELOSI, E. Function of PML-RARA in Acute Promyelocytic Leukemia. In: [s.l.: s.n.]. p. 321–339.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A.; SIMINOVITCH, L. A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 51, n. 1, p. 29–36, jan. 1964.

TOMITA, A.; KIYOI, H.; NAOE, T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 97, n. 6, p. 717–725, 14 jun. 2013.

TRAN, V. T. et al. The diagnostic power of CD117, CD13, CD56, CD64, and MPO in rapid screening acute promyelocytic leukemia. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 394, 26 dez. 2020.

TRIPATHI, S. K.; PANDA, M.; BISWAL, B. K. Emerging role of plumbagin: Cytotoxic potential and pharmaceutical relevance towards cancer therapy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 566–582, mar. 2019.

VAID, T. et al. Clinical Profile, Complications and Outcomes of Patients with Acute Promyelocytic Leukemia: Indian Perspective. **Blood**, v. 138, n. Supplement 1, p. 4385–4385, 5 nov. 2021.

VAN DELFT, F. W. et al. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 23, p. 6247–6254, 9 jun. 2011.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937–951, 30 jul. 2009.

VENCI, A. et al. Acute promyelocytic leukemia with a cryptic insertion of RARA into PML on chromosome 15 due to uniparental isodisomy: A case report. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4180–4184, jun. 2017.

VUKIC, M. D. et al. Redox status, DNA and HSA binding study of naturally occurring naphthoquinone derivatives. **EXCLI journal**, v. 19, p. 48–70, 2020.

WANG, J. et al. Augmented Concentration of Isopentyl-Deoxynyboquinone in Tumors Selectively Kills NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1-Positive Cancer Cells through Programmed Necrotic and Apoptotic Mechanisms. **Cancers**, v. 15, n. 24, p. 5844, 14 dez. 2023.

WANG, Y.; ZHU, W.; LEVY, D. E. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. **Methods**, v. 39, n. 4, p. 356–362, ago. 2006.

WARRELL, R. P. et al. Acute Promyelocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 3, p. 177–189, 15 jul. 1993.

WATTS, J. M.; TALLMAN, M. S. Acute promyelocytic leukemia: What is the new standard of care? **Blood Reviews**, v. 28, n. 5, p. 205–212, set. 2014.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 32, n. 1, p. 1–5, 2 jan. 2018.

WILSON, A. et al. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. **Cell**, v. 135, n. 6, p. 1118–1129, dez. 2008.

WU, Q. et al. Improved prevention and treatment strategies for differentiation syndrome contribute to reducing early mortality in patients with acute promyelocytic leukemia. **Blood Cancer Journal**, v. 14, n. 1, p. 113, 15 jul. 2024.

WU, Q.; ZHANG, J.; LUCAS, D. Anatomy of Hematopoiesis and Local Microenvironments in the Bone Marrow. Where to? **Frontiers in Immunology**, v. 12, 11 nov. 2021.

YILMAZ, M.; KANTARJIAN, H.; RAVANDI, F. Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. **Blood Cancer Journal**, v. 11, n. 6, p. 123, 30 jun. 2021.

YOKOYAMA, Y. Risk factors and remaining challenges in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 120, n. 5, p. 548–555, 22 nov. 2024.

YU, D. et al. Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. **Sensors and**

Actuators B: Chemical, v. 339, p. 129878, jul. 2021.

ZHANG, H. et al. The roles of bone remodeling in normal hematopoiesis and age-related hematological malignancies. **Bone Research**, v. 11, n. 1, p. 15, 14 mar. 2023.

ZHANG, S. et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 149, 19 jun. 2024a.

ZHANG, W.-H. et al. Design, synthesis, and evaluation of 1,4-naphthoquinone-chromene hybrids as potential anti-K562 and A549 agents. **New Journal of Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5334–5345, 2024b.

ZHANG, X. et al. Current views on the genetic landscape and management of variant acute promyelocytic leukemia. **Biomarker Research**, v. 9, n. 1, p. 33, 6 dez. 2021.

ZHAO, H. et al. Tissue factor-bearing microparticles are a link between acute promyelocytic leukemia cells and coagulation activation: a human subject study. **Annals of Hematology**, v. 100, n. 6, p. 1473–1483, 24 jun. 2021.

ZHAO, W.-L. et al. Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia with Arsenic Trioxide: Clinical and Basic Studies. **Leukemia and Lymphoma**, v. 42, n. 6, p. 1265–1273, 2001.