



**UNIVERSIDADE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

JÚLIA VIANA LAFETÁ MACHADO

**EFEITO DO PEPTÍDEO SALAMANDRINA-I SOBRE A VIABILIDADE E
PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA HL-60**

**BRASÍLIA
2023**

JÚLIA VIANA LAFETÁ MACHADO

**EFEITO DO PEPTÍDEO SALAMANDRINA-I SOBRE A VIABILIDADE E
PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA HL-60**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Farmácia da Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de
Araújo

Coorientadora: Dra. Amandda Évelin
Silva de Carvalho

BRASÍLIA

2023

JÚLIA VIANA LAFETÁ MACHADO

**EFEITO DO PEPTÍDEO SALAMANDRINA-I SOBRE A VIABILIDADE E
PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA HL-60**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

BANCA EXAMINADORA:

Presidente – Dra. Amandda Évelin Silva de Carvalho
Universidade de Brasília

Avaliador - Dra. Cínthia Gabriel Meireles
Harvard Medical School

Avaliador - Ma. Teresa Raquel Tavares Serejo
Universidade Católica de Brasília

BRASÍLIA

2023

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a leucemia promielocítica aguda (LPA) é classificada como um subtipo de LMA e, embora represente menos de 10% de todas as formas de LMA, é uma doença de caráter agressivo e de rápida progressão. Medicamentos como ATRA (Ácido Trans Retinóico), ATO (trióxido de arsênio) e quimioterápicos (antraciclinas) são utilizados no tratamento padrão ouro da LPA. No entanto, potenciais efeitos adversos causados pelo ATRA e o desenvolvimento de resistência contra os quimioterápicos são obstáculos encontrados na prática médica. Recentemente, diversos estudos com peptídeos antioxidantes estão sendo realizados, e potenciais efeitos anticâncer tem sido identificados. Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar se a Salamandrina-I, um peptídeo antioxidante recém identificado, tem ação sobre a viabilidade e proliferação de células HL-60. Inicialmente, realizamos o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade das células e, posteriormente, validamos a apoptose e proliferação celular por citometria de fluxo. Utilizamos ainda a técnica de PCR em tempo real para avaliar o perfil transcricional das células HL-60 mediante a presença de Salamandrina-I. Em suma, observamos que Salamandrina-I é capaz de induzir apoptose de maneira dose dependente (IC25; $p=0,0417$) e IC50; $p<0,0001$), além de promover disfunção mitocondrial (IC25 e IC50 $p<0,0001$) na linhagem HL-60. Identificamos ainda que este peptídeo foi capaz de diminuir a proliferação das células HL-60 (IC25; $p= 0,0012$ e IC50; $p <0,0001$) e promover um aumento na expressão de vários genes envolvidos no inflamassoma como *CASP1* (IC25 $p=0,0303$; IC50 $p=0,0003$), *NLRP1* (IC25 $p= 0,0002$; IC50 $p<0,0001$), *NLRP3* (IC25 $p= 0,0501$; IC50 $p= 0,0056$) e *IL-1 β* (IC25 $p<0,0001$; IC50 $p<0,0001$). Essa é a primeira demonstração do potencial anticâncer da Salamandrina-I e esses resultados oferecem informações importantes que podem permitir o design de futuras moléculas bioativas usando a Salamandrina-I como modelo.

PALAVRAS-CHAVE: peptídeo antioxidante; Salamandrina-I; LMA.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, acute promyelocytic leukemia (APL) is classified as a subtype of AML and, although it represents less than 10% of all forms of AML, it is an aggressive disease with rapid progression. Medicines such as ATRA (Trans Retinoic Acid), ATO (arsenic trioxide), and chemotherapeutics (anthracyclines) are used as gold standard treatment of APL. However, potential adverse effects caused by ATRA and the development of resistance against chemotherapy are obstacles encountered in medical practice. Recently, several studies with antioxidant peptides are being carried out, and potential anticancer effects have been identified. In this line, this study aims to evaluate whether Salamandrin-I, a recently identified antioxidant peptide, can affect the viability and proliferation of HL-60 cells. Initially, we performed the MTT assay to assess cell viability, and subsequently, we validated cell apoptosis and proliferation by flow cytometry. We also used the real-time qPCR to evaluate the transcriptional profile of HL-60 cells in the presence of Salamandrin-I. In summary, we observed that Salamandrin-I is capable of inducing apoptosis in a dose-dependent manner (IC₂₅; p=0.0417) and IC₅₀; p<0.0001), in addition to promoting mitochondrial dysfunction (IC₂₅ and IC₅₀ p<0.0001) in the HL-60 cells. We also identified that this peptide was able to decrease the proliferation (IC₂₅; p= 0.0012 and IC₅₀; p <0.0001) and promote an increase in the expression of several genes involved in the inflammasome such as *CASP1* (IC₂₅ p =0.0303; IC₅₀ p=0.0003), *NLRP1* (IC₂₅ p= 0.0002; IC₅₀ p<0.0001), *NLRP3* (IC₂₅ p= 0.0501; IC₅₀ p= 0.0056) and *IL-1β* (IC₂₅ p<0.0001; IC₅₀ p<0.0001). This is the first demonstration of the anticancer potential of Salamandrin-I and these results offer important information that may allow the design of future bioactive molecules using Salamandrin-I as a template.

KEYWORDS: antioxidant peptide; Salamandrina-I; AML

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Promielócitos.....	18
Figura 2. Estrutura do peptídeo Salamandrina-I.....	22
Figura 3. Redução da viabilidade da linhagem HL-60 estabelecida por meio do ensaio MTT.....	33
Figura 4. A presença do peptídeo Salamandrina-I induz a apoptose na linhagem de HL-60.....	34
Figura 5. Salamandrina-I gera dano mitocondrial na linhagem de HL-60.....	35
Figura 6. Salamandrina-I induz o aumento da liberação de LDH na linhagem de células HL60.....	36
Figura 7. Salamandrina-I aumenta a atividade de <i>CASP1</i>	37
Figura 8. Salamandrina-I reduz a proliferação da linhagem HL-60.....	37
Figura 9. Salamandrina-I interfere no ciclo celular da linhagem HL-60.....	39
Figura 10. Influência da Salamandrina-I na expressão de genes relacionados a apoptose, proliferação e inflamação.....	40-41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da FAB da LMA.....	15
Tabela 2. Classificação da OMS para Leucemia Aguda.....	16
Tabela 3. Primers utilizados não ensaios de PCR em tempo real.....	31

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS:

μL - Microlitro

μM - Micromolar

ATO – trióxido de arsênio

ATRA- ácido trans retinóico

BAK - proteína pró-apoptótica homóloga ao BCL-2

BAX - do inglês "*BCL-2 associated protein X*"

BCL-2 - do inglês "*B-cell lymphoma 2*"

CASP 1 – Caspase 1

CASP 3 – Caspase 3

CASP 8 – Caspase 8

CASP 9 – Caspase 9

CDK1- do inglês "*Cyclin-dependent kinase 1*"

CDK2 – do inglês "*Cyclin-dependent kinase 2*"

CDKs - Quinases dependentes de ciclinas

CFSE – do inglês "

CID – Coagulação Intravascular Disseminda

DAMPs - do inglês "*danger-associated molecular patterns*"

DMSO - Dimetil Sulfóxido

FISH - hibridização por sondas de fluorescência in situ

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSDM D – Gasdermina D

IC - Concentração Inibitória

IL-1 β - Interleucina 1 β

INT- Iodonitrovioleta de tetrazólio

inv – inversão

Ki-67 - gene de proliferação de células cancerígenas

LAs – Leucemias Agudas

LLA – Leucemia Linfoide Aguda

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LPA – Leucemia Promielocítica Aguda

MIF- Mediana da intensidade de fluorescência.

MPO - mieloperoxidase

MTT - do inglês “*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*”

NF-κB – fator nuclear

NLRP1 - do inglês “*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 1*”

NLRP3 - do inglês “*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*”

NLRs - do inglês “*NOD-like receptor family*”

P53 - Gene supressor de tumor

PAMPs - do inglês “*pathogen-associated molecular patterns*”

PBS – do inglês “phosphate buffered saline”

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR - reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa

PI- Iodeto de Propídeo

ROD 123 – Rodamina 123

ROS - do inglês “*reactive oxygen species*”

RPMI-1640 - do inglês “*Roswell Park Memorial Institute*”

SAR- Síndrome do Ácido Retinóico

SFB - Soro Fetal Bovino

TP73 – proteína tumoral p73

$\Delta\Delta C_t$ – método comparativo CT

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	14
1.1. Fisiopatologia das leucemias agudas	14
1.2. Leucemia promielocítica: aspectos epidemiológicos e fisiopatologia	17
1.2.1. Classificação e diagnóstico	17
1.2.2. Tratamento	19
1.3. Peptídeos antioxidantes:	20
2. OBJETIVOS:	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. METODOLOGIA	24
3.1. Cultivo celular	24
3.2. Ensaio de viabilidade/ proliferação celular por MTT	24
3.3. Ensaio de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI)	25
3.5. Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH)	27
3.6. Inflamassoma	28
3.8. Ensaio do ciclo celular	29
3.9. Extração de RNA e transcrição reversa	30
3.10. PCR em tempo real	30
3.11. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	33

4.1. Salamandrina-I reduz a viabilidade da linhagem HL-60	33
4.2. Salamandrina-I induz apoptose na linhagem de HL-60	33
4.3. Salamandrina-I induz dano mitocondrial na linhagem HL-60	34
4.4. Salamandrina-I aumenta a liberação de LDH	35
4.5. Salamandrina -I aumenta a atividade de CASP 1 em células HL-60	36
4.6. Salamandrina-I reduz a proliferação celular na HL-60	37
4.7. Salamandrina-I interfere no ciclo celular das células HL-60	38
4.8. Modulação da expressão gênica pela Salamandrina-I	39
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Fisiopatologia das leucemias agudas

As leucemias agudas são formadas por um grupo heterogêneo de desordens neoplásicas. Geralmente essas alterações acontecem em células-tronco hematopoiéticas ou em progenitores primitivos e devido a isso, há um desbalanço em relação a produção e morte dessas células, causando um acúmulo de células jovens, denominadas blastos, na medula óssea. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leucemia é classificada como aguda mediante a presença de 20% ou mais dessas células imaturas a nível de sangue periférico e/ou medula óssea (BORTOLHEIRO, 2006). Dependendo dos precursores afetados, as leucemias agudas podem ser divididas em leucemia linfóide ou mieloide.

Em contrapartida, a leucemia linfóide aguda (LLA) é uma doença maligna, comum em crianças, e é caracterizada pelo acúmulo de linfoblastos na medula óssea. Essa doença está associada a mutações e rearranjos gênicos. As alterações mais comuns são a translocação de $t(12;21)(p13;q22)$ (*ETV6-RUNX1*), $t(1;19)$ (*TCF3-PBX1*) e $t(9;22)(q34;q11)$ (*BCR-ABL*) (BLUNCK, 2014; TERWILLIGE *et al.*, 2017).

Em contrapartida, a leucemia mieloide aguda (LMA) também é uma doença maligna, com maior incidência em adultos com idade igual ou superior a 60 anos, originada a partir de anomalias genéticas, as quais resultam em produção exacerbada de clones neoplásicos de células mielóides. As causas das alterações, anormalidades e mutações genéticas não são bem estabelecidas, porém, sabe-se que o contato anterior com quimioterápicos ou certas substâncias podem levar a um quadro de LMA (HOFFBRAND *et al.*, 2011; SHORT *et al.*, 2018). As anormalidades mais recorrentes são a translocação $t(8;21)(q22;q22)$, a inversão do cromossomo 16 ($inv(16)(p13q22)$) e a translocação de

t(15;17)(q22;q12) que gera a oncoproteína de fusão PML-RAR α (RUEDA *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2009; EGHTEGAR *et al.*, 2012; AYATOLLAHI *et al.*, 2020).

Devido a grande heterogeneidade de alterações genéticas apresentadas pela LMA, o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) decidiu organizar uma tabela de classificação das doenças mielodisplásicas baseado principalmente nos aspectos morfológicos e citoquímicos das células (tabela 1). Apesar da vantagem de uniformizar e tentar padronizar as diferentes apresentações da LMA, alguns casos não se encaixavam nas classificações disponíveis e, portanto, surgiu a necessidade de um novo sistema de classificação. Nesse sentido, morfoloistas integrantes da OMS, iniciaram uma nova classificação baseada em imunofenotipagem e genética associadas a parâmetros clínicos (tabela 2) (KUFÉ *et al.* 2003; BORTOLHEIRO, 2006, ARBER *et al.*, 2016).

Tabela 1. Classificação da FAB da LMA.

M0	MPO* por método imunológico ou ultra estrutural CD13* ou CD33* ou CD11b*
M1	MPO* >3% >90% blastos das células nucleadas da M.O.
M2	% blastos M.O. >30%* e <90% células nucleadas da M.O. componente monocítico <20%
M3	Predomínio de células M3 (Promielócitos) Similar a M2
M4	Componente monocítico da M.O. entre 20% e 80% e/ou >5.000 monócitos/mm ³ no SP
M5	Componente monocítico >80% das células não-eritróides. M5A: indiferenciada (monoblástica) / M5B: diferenciada (monocítica)
M6	Eritroblastos >50% das células nucleadas da M.O.
M7	Megacarioblastos >30% das células nucleadas da M.O.

(*) 30% na classificação FAB inicial reavaliada para 20% pela classificação da OMS - 1999.

(Obtido de Martins *et al.*, 2000)

Tabela 2. Classificação da OMS para Leucemia Aguda

Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Neoplasias Relacionadas

LMA com anormalidades genéticas recorrentes

- LMA c/ t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
- LMA c/ inv(16)(p13.1q22) ou
- t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
- LPA c/ PML-RARA
- LMA c/ t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
- LMA c/ t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
- LMA c/ inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,
- MECOM
- LMA (megacarioblástica) c/
- t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
- LMA c/ BCR-ABL1
- LMA c/ NPM1 mutado
- LMA c/ Mutações bialélicas de CEBPA
- LMA c/ RUNX1 mutado
- LMA com alterações mielodisplásicas relacionadas
- Neoplasias mieloides relacionadas à terapia
- LMA, NOS
- LMA c/ diferenciação mínima
- LMA s/ maturação
- LMA c/ maturação
- Leucemia mielomonocítica aguda
- Leucemia monoblástica/monocítica aguda
- Leucemia eritróide pura
- Leucemia megacariocítica aguda
- Leucemia basofilia aguda
- Panmielose com mielofibrose aguda
- Sarcoma Mieloide
- Proliferação mioelide relatada em Síndrome de Down
- Mielopoiese anormal transitória (TAM)
- Leucemia mioelide associada à Síndrome de Down

(Adaptado de ARBER *et al.*, 2016)

1.2. Leucemia promielocítica: aspectos epidemiológicos e fisiopatologia

Leucemia promielocítica aguda (LPA) é um tipo raro de LMA que representa menos de <10% das LMA. A LPA possui maior incidência em adultos com idades entre 20 a 59 anos, sem predomínio de sexo (ARAÚJO, 2022); e é caracterizada por uma distinta morfologia e uma translocação específica t(15;17), em que o gene promielocítico no cromossomo 15 (PML) se funde ao receptor de ácido retinóico alfa (RAR α) no cromossomo 17 (LAVAU *et al.*, 1994; THOMAS, 2019), gerando o gene híbrido PML-RAR α , que é responsável por suprimir a transcrição de diversos genes relacionados a diferenciação mieloide (SANZ *et al.*, 2021). Essa é uma doença de caráter agressivo e de rápida progressão que antigamente era fatal. No entanto, com os avanços no tratamento, o prognóstico atual é bom, classificando-a como uma das leucemias com alto índice de remissão (ARAÚJO *et al.*, 2022). A LPA pode apresentar duas morfologias distintas: a hipergranular e microgranular, sendo que a primeira é a mais comum (SAINTY *et al.*, 2000). Quanto aos aspectos clínicos da doença, os pacientes normalmente apresentam pancitopenia, palidez, fadiga, dispneia; podem apresentar febre devido as infecções recorrentes; e geralmente há presença de infiltrações em órgãos e tecidos. Além disso, a LPA está relacionada a coagulopatias que geram severas hemorragias causadas por coagulação intravascular disseminada (CIVD), sendo a principal causa de altas mortalidades se o diagnóstico não for precoce e exato (JÁCOMO *et al.*, 2008; RYAN *et al.*, 2018).

1.2.1. Classificação e diagnóstico

De acordo com os critérios da FAB, os promielócitos podem receber duas classificações: M3 (hipergranular) e M3 (hipogranular). A forma clássica, hipergranular,

apresenta um núcleo excêntrico, citoplasma com abundante granulação e numerosos bastonetes de Auer (“faggot cells”). Já na forma variante, hipogranular, os blastos apresentam o núcleo bilobado e escassa granulação. (BENNETT *et al.*, 1976; MCKENNA *et al.*, 1982; JÁCOMO *et al.*, 2008)

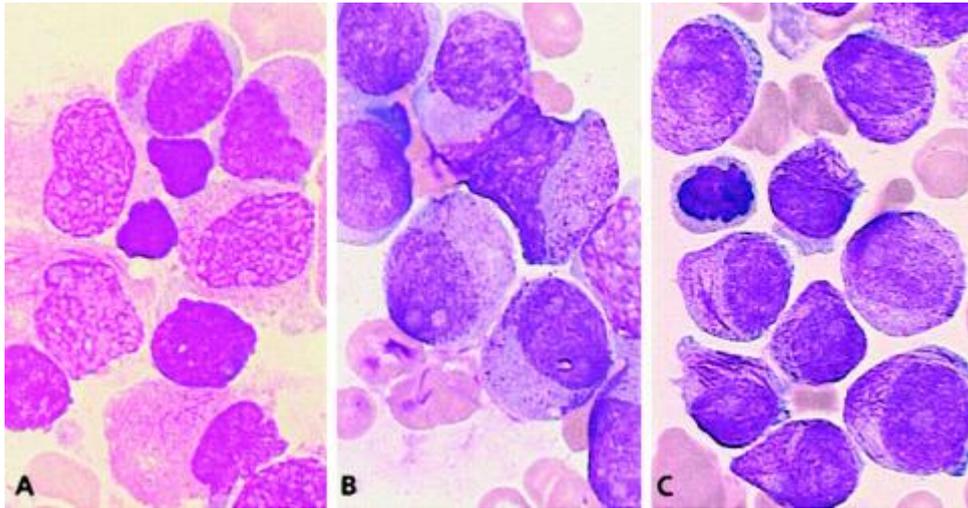


Figura 1. Promielócitos. Figura A apresenta em sua maioria blastos com núcleo irregular, citoplasma hipergranular e bastonetes de Auer. B apresenta blastos com núcleo regular e citoplasma hipergranular. C mostra blastos com núcleos similares e apresentação de muitos bastonetes de Auer (Modificado de SAINTY *et al.*, 2000).

A porta de entrada para definir alterações em células hematológicas é a realização do hemograma onde a pancitopenia é identificada e, posteriormente, na lâmina de esfregaço sanguíneo, por meio da observação de promielócitos e esquizócitos no sangue periférico. O mielograma também pode evidenciar os promielócitos neoplásicos, os quais se coram fortemente com mieloperoxidase e Sudan Black (JÁCOMO *et al.*, 2008).

Os promielócitos também podem ser identificados por meio de imunofenotipagem, método que ajuda na identificação de marcadores de LPA, possibilitando um diagnóstico precoce. Normalmente os marcadores são: CD34 (marcador de células precursoras

hematopoiéticas) negativo, CD13 e CD33 (marcadores mieloides) positivo e CD117 (marcador mielóide) apresentando baixa intensidade de fluorescência. (RYAN *et al.*, 2018).

O diagnóstico de LPA é confirmado através de técnicas citogenéticas ou biologia molecular como FISH e PCR, pois são capazes de detectar mutações, como a t(15;17), presente na leucemia promielocítica aguda (RYAN *et al.*, 2018).

1.2.2. Tratamento

A evolução da LPA é rápida e bastante agressiva, portanto, a partir da suspeita morfológica, deve-se iniciar imediatamente o tratamento com ácido trans retinóico (ATRA), uma vez que reduz significativamente o risco da coagulopatia e hemorragia severa. Se a suspeita não for confirmada, o ATRA pode ser descontinuado sem problemas de toxicidade (YILMAZ *et al.*, 2021).

O regime de tratamento consolidado para LPA é composto por ATRA e ATO, caso não houver ATO disponível, a quimioterapia com antraciclina é usado como substituto. O regime que combina ATRA e ATO é preferencial pois, além das substâncias apresentarem sinergismo entre si, reduz risco de mielosupressão, toxicidade cardíaca, efeitos adversos de antraciclina e o risco de desenvolvimento de outras leucemias (LALLEMAND-BREITENBACH *et al.*, 2013).

O ATRA é derivado da vitamina A e é capaz de induzir diferenciação dos promielócitos e morte celular, porém, ainda não se sabe exatamente o mecanismo de ação desse medicamento (DRUGBANK; YILMAZ *et al.*, 2021). ATO também é capaz de induzir diferenciação através da degradação de PML-RAR α e ativação de caspases que levam a apoptose celular (LI *et al.*, 2014). Apesar de causar morte celular, ATRA não é capaz de erradicar os clones neoplásicos e, por esse motivo, o regime terapêutico deve

incluir ATO ou quimioterapia, que, além de aumentar o tempo de vida, reduz o índice de recidiva (LEAL *et al.*, 2009).

Apesar do tratamento com ATRA apresentar bons resultados, esse fármaco pode desenvolver a Síndrome do Ácido Retinóico (SAR) em 6 % a 27% dos pacientes. Os aspectos clínicos apresentados são caracterizados por febre, ganho de peso, edema generalizado, insuficiência respiratória, insuficiência renal, hipotensão arterial, derrame pleural e/ou do pericárdio. Esses sintomas são relacionados geralmente ao aumento súbito de leucócitos no sangue periférico (SANTOS *et al.*, 2004).

Tendo essas informações como base, mesmo com alto índice de aproveitamento da terapia convencional, há carência de tratamentos alternativos principalmente em situações de desenvolvimento de resistência ao tratamento de quimioterápicos ou da Síndrome de Ácido Retinóico. Portanto, a busca por novos compostos com ação anticâncer tem sido alvo de estudos (ZHANG *et al.*, 2023).

1.3. Peptídeos antioxidantes

No tratamento padrão ouro atual, utiliza-se ATRA, ATO e quimioterapias. Porém, problemas como o desenvolvimento de SAR, multirresistência a drogas quimioterápicas e não remissão ao tratamento podem vir a acontecer. Apesar do agente ATO apresentar bons resultados, somente a utilização dele não é suficiente para induzir a remissão da LPA. Por isso, com o objetivo de buscar novas alternativas, a opção de peptídeos bioativos pode ser considerada para utilização como coadjuvantes aos tratamentos convencionais. Tratamentos com peptídeos bioativos são focados em oferecer baixa toxicidade ao paciente e alta seletividade para as células cancerígenas (TORNESELLO *et al.*, 2020; YILMAZ *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023).

Já foi demonstrado que os blastos mieloides apresentam níveis elevados de ROS, o que promove um ambiente propício para modificações genéticas, crescimento descontrolado de células, favorece o escape imunológico e propicia um efeito anti-apoptótico (ZHOU *et al.*, 2013). Sendo assim, terapias com agentes antioxidantes se tornam interessantes pois podem atuar como mediadores do estresse oxidativo. Com isso, diversas pesquisas focadas na ação antioxidante de peptídeos estão sendo desenvolvidas. (GALLO *et al.*, 1994; GIULIANI *et al.*, 2007; LAU *et al.*, 2018; CHIANGJONG *et al.*, 2020). Nessa linha, já foi demonstrado que o uso do ácido azelaico, o qual é um ácido dicarboxílico natural e foi reconhecido primeiramente como um metabólito secundário em infecções fúngicas por *Malassezia*, possui atividade antioxidante e que é capaz de reduzir ROS e a proliferação, aumentar as taxas de apoptose e, por fim, aumentar a capacidade antioxidante das células cancerígenas (ZHANG *et al.*, 2020).

Tendo essas informações como base, recentemente, pesquisadores (PLÁCIDO *et al.*, 2020) isolaram o peptídeo Salamandrina-I da pele do anfíbio Salamandra-de-Fogo (*Salamandra Salamandra*) (Linnaeus, 1758). No processo de purificação, as secreções foram liofilizadas e fracionadas usando C18 RP-HPLC, rendendo aproximadamente 20 frações. Posteriormente, dentre os peptídeos identificados, a Salamandrina-I ([M + H]⁺ = 1406.6 Da) foi selecionada e em seu espectro permitiu a identificação da sequência ácida de aminoácidos (FAVWGCADYRGY-NH₂), apresentando um modificação no terminal C (carboxiamida). Com isso, o peptídeo foi comparado com outras moléculas em bases de pesquisas apropriadas e constatou-se que esse é um peptídeo sem precedentes e com propriedades biológicas desconhecidas (PLÁCIDO *et al.*, 2020)

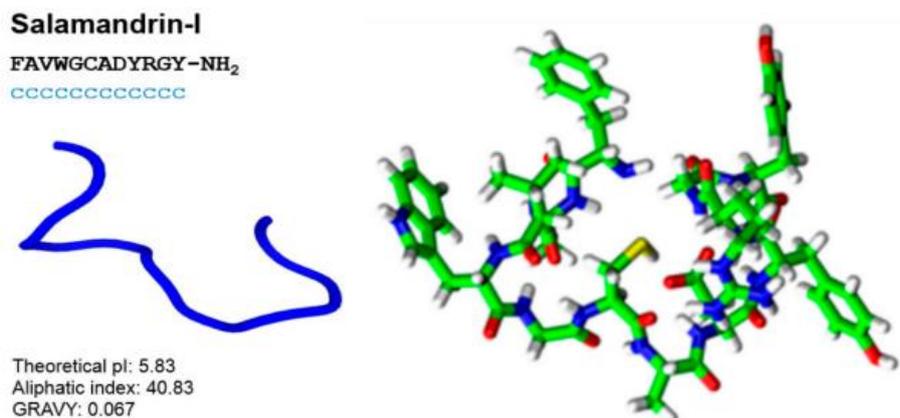


Figura 2. Estrutura do peptídeo Salamandrina-I. Colorações do átomo: carbono (verde), oxigênio (vermelho), enxofre (amarelo), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco). Obtido e adaptado de Plácido *et al.*, 2020.

As secreções de anfíbios são utilizadas há bastante tempo pela Ásia e nas Américas para o tratamento de diversas doenças, como alergias, inflamações e infecções. Esses peptídeos desempenham diversas funções fisiológicas como defesa contra predadores e microrganismos. Nessa linha, diversos estudos estão sendo desenvolvidos para explorar suas ações farmacológicas (LAU *et al.*, 2018; PLÁCIDO *et al.*, 2020).

Atividades antioxidantes foram identificadas no peptídeo Salamandrina-I, porém suas ações ainda não são conhecidas em relação ao câncer e, portanto, considerando seu efeito antioxidante e o microambiente abundante de ROS das células cancerígenas e blastos de pacientes com LMA, este estudo tem como objetivo investigar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre a viabilidade e proliferação das células HL-60.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre a viabilidade e proliferação das células HL-60.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do peptídeo Salamandrina-I sobre o cultivo de células HL-60;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre a apoptose das células HL-60;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre o potencial de membrana mitocondrial das células HL-60;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I na liberação de LDH das células HL-60;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre a atividade de *CASP 1* das células HL-60 por ensaio de Inflamassoma;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre a proliferação celular das células HL-60;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre o ciclo celular das células HL-60;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre a expressão gênica das células HL-60.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultivo celular

Neste estudo, utilizamos linhagem de leucemia mieloide aguda, HL-60 (ATCC CCL-240). Essas células são promieloblastos isolados de sangue periférico de uma mulher de 36 anos com leucemia promielocítica aguda (ATCC, acesso em 21/07/2023).

As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100µg/mL de penicilina e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A troca de meio era realizada a cada 48h, seguida de contagem celular na câmara de Neubauer, com o objetivo de manter a densidade celular entre 1x10⁵ e 1x10⁶ células/mL.

3.2. Ensaio de viabilidade/ proliferação celular por MTT

Este é um ensaio colorimétrico muito utilizado para avaliar danos causados por agentes citotóxicos, tendo como finalidade avaliar a atividade metabólica das células para analisar a proliferação e/ou viabilidade após o contato com o agente. A avaliação é possível por meio da quantificação do MTT reduzido em formazan, que são sais de coloração roxa. Após a formação desses cristais, eles são dissolvidos e a solução final é quantificada através de espectrofotometria (500-600 nm), de forma que a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas (PLUMB *et al.*, 2004).

Para esse estudo, utilizamos o peptídeo Salamandrina-I, cedido pelo professor José Roberto Leite. Para o ensaio de MTT, 5x10⁴ células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com concentrações crescentes do peptídeo (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM), paralelamente a um grupo controle que não recebeu tratamento.

Após o tratamento, incubamos a placa em estufa 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ por 48h e, em seguida, adicionamos MTT (5mg/mL). A placa foi levada à incubadora novamente por 4 horas e, ao findar desse tempo, foi centrifugada a 400xg por 10 minutos. O sobrenadante foi delicadamente removido e 100µL de DMSO (Sigma-Aldrich) foram adicionados com o objetivo de dissolver os cristais. Após 10 minutos em bandeja agitadora, a leitura de absorbância foi realizada na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) a 570 nm.

Para análise dos dados e execução dos cálculos, utilizamos o software Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para calcularmos as concentrações do peptídeo que foram capazes de gerar morte em 25% (IC25) e 50% (IC50) das células, respectivamente.

3.3. Ensaio de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI)

Este é um ensaio que avalia a viabilidade celular através da integridade e permeabilidade da membrana celular. Quando as células entram em processo apoptótico, acontecem mudanças na membrana que vão translocar a fosfatidilserina, ou seja, a última será transferida do ambiente citosólico para o ambiente externo, e esse evento viabiliza a ligação da anexina V, que possui alta afinidade a este fosfolipídio na presença de Ca²⁺, indicando apoptose inicial. Já o iodeto de propídeo, que é um agente intercalante fluorescente, após o comprometimento da membrana, consegue chegar ao núcleo celular e ligar-se a ácidos nucleicos de fita dupla, indicando a apoptose tardia (VERMES *et al.*, 1995; SCHUTTE *et al.*, 1998; RIEGER *et al.*, 2011).

Para a execução deste ensaio, utilizamos as concentrações do IC25 (23,52µM) e IC50 (27,01µM), encontradas no MTT e tratamos 2x10⁵ células com o peptídeo em placa

de 48 poços. Após o plaqueamento e o tratamento, incubamos em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48h. Findado o período de incubação, as células foram recolhidas das placas, transferidas para o tubo de citometria e centrifugadas. O sobrenadante foi recolhido e mantido a -80°C para ensaios posteriores. As células foram recolhidas e lavadas 3 vezes com PBS gelado e, posteriormente, ressuspendidas em tampão de Ca²⁺ (25mM) para possibilitar a marcação com Anexina V FITC (BD Biosciences, USA). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram mantidas em gelo. Apenas no momento de aquisição de cada tubo, o PI (Invitrogen) foi adicionado. As amostras foram processadas no citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD Bioscience, USA), mediante aquisição de 10.000 eventos e a análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo 10.5.3 (LLC, USA).

3.4. Ensaio de avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) - Rodamina 123

As alterações eletroquímicas na membrana mitocondrial podem ser bastante prejudiciais a uma célula, considerando que essa organela gera energia. Este ensaio tem como objetivo avaliar a integridade da membrana mitocondrial a partir do potencial de membrana, e, para isso utiliza-se Rodamina 123 (Rh123), uma sonda catiônica fluorescente, que é capaz de penetrar a membrana mitocondrial e agregar-se a matriz interna se a organela estiver viável, emitindo fluorescência verde. Porém, quando sofre alteração na membrana e uma consequente despolarização, a Rodamina 123 passa a diminuir a intensidade de fluorescência pois não está mais ligada à membrana (TOESCU *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2018).

Para este ensaio, plaqueamos 2×10^5 células em placa de 48 poços e tratamos com as doses de IC25 e IC50 do peptídeo. Em seguida, incubamos por 48 h em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as células foram recolhidas, centrifugadas e lavadas 3 vezes com PBS. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 300µL de meio RPMI sem SFB e, então, incubadas com Rodamina (5µg/mL) por 20 minutos ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas, por fim, em 250µL de PBS 1X. A análise foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCalibur BD Bioscience, USA), com aquisição de 10.000 eventos. A análise dos resultados foi realizada no software FlowJo 10.5.3 (LLC, USA).

3.5. Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima encontrada no citoplasma estável de todas as células. Quando a célula entra em processo de morte, seja por apoptose, necrose ou algum outro dano, essa enzima é externada e, portanto, pode ser quantificada (KABAKOV *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018).

Para este ensaio, utilizamos o sobrenadante das células tratadas com o IC25 e IC50 da Salamandrina-I por 48hs. A análise da liberação de LDH foi realizada utilizando o kit Cytotox 96 (Promega, USA). Em suma, em uma placa de 96 poços foram pipetados 100µL do sobrenadante e adicionado 50µL de Cytotox 96. A placa foi envolta em papel alumínio por 30 minutos, em temperatura ambiente. Findado o período, adicionou-se 50µL de *Stop Solution* e os poços foram homogeneizados. A leitura foi realizada em leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter, CA, USA) em comprimento de onda 490 nm.

3.6. Inflamassoma

Este ensaio foi utilizado para analisar a atividade da CASP 1 após o tratamento das células HL-60 com a Salamandrina-I utilizando o kit Caspase-Glo® 1 Inflammasome (Promega), conforme recomendações do fabricante. O kit utilizado fornece um reagente (Caspase-Glo® 1 Reagent) que quando associado a aminoluciferina, mediante a presença de enzimas como caspases, geram uma luminescência. Portanto, quando há emissão de bioluminescência, há presença de caspases. Além desse reagente, utilizamos um inibidor específico de caspase 1 (CASP 1) (Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagent) para avaliarmos se há atividade da última. Nesse sentido, numa placa de 96 poços contendo 5×10^4 células, utilizamos apenas a concentração mais efetiva (IC50) e incubamos por 48h. Ao findar desse período, adicionamos em uma metade Caspase-Glo® 1 Reagent e na outra metade, Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagent (inibidor seletivo de CASP 1). O conteúdo dos poços foi homogeneizado e a placa incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Findado esse período, a leitura da luminescência foi realizada na leitora de placas Multimode plate reader (PerkinElmer).

3.7. Ensaio de avaliação de proliferação celular (CFSE)

O *carboxyfluorescein sccinimidyl ester* (CFSE) é um corante que se liga irreversivelmente a proteínas intracelulares de células viáveis. Dessa forma, à medida que as células se dividem, as células filhas retêm esse corante e a fluorescência emitida é a metade quando comparado com a célula mãe. A quantidade de divisões celulares pode ser monitorada através de citometria de fluxo (JEDEMA *et al.*, 2004).

Para a realização deste teste, 1×10^7 células foram marcadas com 7,5uM de CFSE por 7,5 minutos a 37°C. Após esse período, a marcação foi interrompida com adição de

5 volumes de RPMI gelado suplementado com 10% de SFB. Os tubos foram então mantidos em gelo por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. Após realização do processo de contagem, 2×10^5 células foram plaqueadas e submetidas ao tratamento com IC25 e IC50 do peptídeo por 48h em atmosfera de 5% CO₂ e temperatura de 37°C. Concluindo o período de incubação, as células foram transferidas a um tubo de citometria e lavadas 3 vezes com PBS 1X gelado e ressuspensas em 300µL de PBS 1X. A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Facs Calibur, BD Bioscience, USA), com aquisição de 10.000 eventos.

3.8. Ensaio do ciclo celular

Para a realização deste teste, 8×10^5 células em placa de 24 poços foram tratadas com Salamandrina-I com as doses de IC25 e IC50 por 48h. Após esse período, as células foram recolhidas e lavadas 2 vezes com PBS. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 5 mL de metanol gelado gota a gota durante um fluxo contínuo do vórtex. As células foram mantidas por 1 hora no gelo (4°C) para fixação. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS. As células foram ainda tratadas com solução de RNase I (100µg/mL) e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Findado o período de incubação, as células foram marcadas com Iodeto de Propídeo (PI) (50µg/mL) e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz. As amostras foram então transferidas para tubos de citometria, onde completamos o volume da suspensão celular com PBS. A análise foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCalibur BD Bioscience, USA), com aquisição de 100.000 eventos.

3.9. Extração de RNA e transcrição reversa

Para a realização da extração, 8×10^5 foram cultivadas em placa de 24 poços, contendo meio RPMI 10% SFB. Essas células foram submetidas ao tratamento com o peptídeo Salamandrina-I nas doses de IC25 e IC50 por 48h. O RNA foi extraído utilizando-se o TRIreagent (Sigma-Aldrich, USA) conforme as recomendações do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA obtido foi verificada através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher, USA). O total de 1 ug de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA, por uso do kit High Capacity cDNA Transcription Kit (Thermo Fisher, USA), seguindo as orientações do fabricante.

3.10. PCR em tempo real

Para avaliar o impacto da Salamandrina-I sobre o perfil transcricional da linhagem HL-60, utilizamos a metodologia SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher, USA). As reações foram realizadas em duplicatas e a análise feita a partir da metodologia de $\Delta\Delta C_t$ (PFAFFL *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2016) tendo como gene calibrador o GAPDH. A sequência dos primers utilizados estão listadas na tabela 3.

Tabela 3. Primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.

Gene	Sequência Forward/Reverse (5'-3')
CASP 1	AAGACCCGAGCTTTGATTGACTC AAATCTCTGCCGACTTTTGTTC
CASP 3	CTAGCGGATGGGTGCTATTG GATACACAGCCACAGGTATGAG
CASP 8	GGATGGCCACTGTGAATAACTG TCGAGGACATCGCTCTCTCA
IL-1 β	AGAAGTACCTGAGCTCGCCA TGTTTAGGGCCATCAGCTTCA
NLRP1	AAGGGGCAGGCCACTCTCCCTC TGAGGCAGAGATTTCTCTCCAG
NLRP3	TCCTCGGTACTCAGCACTAATCAG GGTCGCCAGGTCATTGTTG
NF-kB	TCTCTATGACCTGGATGACTC GTTTCATGTCTCCTTGTGCT
GSDM D	ATGAGGTGCCTCCACAACCTCC CCAGTTCCTTGGAGATGGTCTC
p53	AGAAAACCTACCAGGGCAGC ACATCTTGTGAGGGCAGGG
TP73	CACCTCAGCTCTCCATCTTATTG GCATGGGTCTTAGCCTTCT
BCL-2	CAAAGCTGCAGGCTGTTTAAG GTCTGTCTGTGTGTGATGT
BAK	GTTTTCCGCAGCTACGTTTTT GCAGAGGTAAGGTGACCATCTC
BAX	CAGACCGTGACCATCTTTGT GCCTCAGCCCATCTTCTC
CDK1	CTTGGCTTCAAAGCTGGCTC GGGTATGGTAGATCCCGGCT
CDK2	CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA TTCATCCAGGGGAGGTACAAC
Ki-67	TAAACACCATCAGCAGGGAAAG CTGCACTGGAGTCCCATAAA
GAPDH	TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCT GGTGGTCCAGGGGTCTTAC

3.11. Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas e comparados com grupos controles e entre si usando ANOVA acompanhado de teste de comparação múltipla de

Tukey. As análises estatísticas dos resultados foram feitas no software Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), adotando limiar de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Salamandrina-I reduz a viabilidade da linhagem HL-60

Para investigar o impacto da Salamandrina-I sobre a viabilidade das células HL-60, realizamos o ensaio de MTT. Após 48 horas de tratamento, observamos que houve diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente (Figura 3A). A partir desses resultados, estabelecemos os valores de IC₂₅ e IC₅₀ os quais possuem concentração igual a 23,52 μ M e 27,01 μ M (Figura2B), respectivamente.

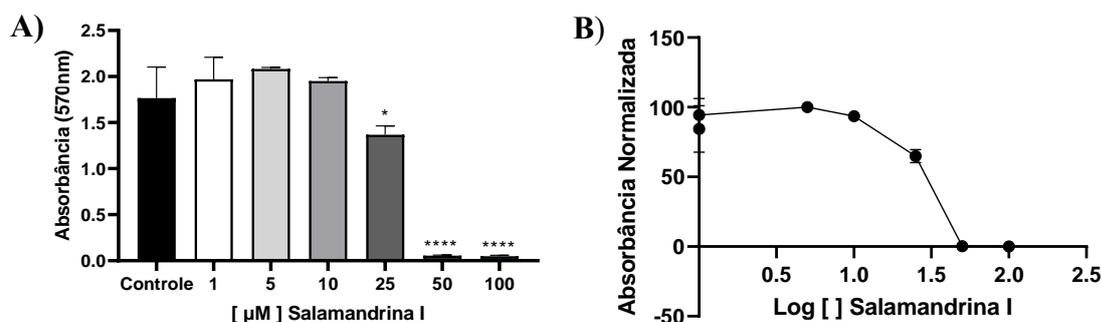


Figura 3. Redução da viabilidade da linhagem HL60 estabelecida por meio do ensaio MTT. A) Após o tratamento das células por 48h com as concentrações crescentes (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) observou-se a diminuição da viabilidade de maneira dose-dependente. B) Após avaliação dos resultados, foram estabelecidos os valores de IC₂₅ (23,52 μ M) e IC₅₀ (27,01 μ M). Os resultados foram expressos utilizando média +/- desvio padrão. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.

4.2. Salamandrina-I induz apoptose na linhagem de HL-60

Para verificar o impacto da Salamandrina-I na taxa de apoptose celular, utilizamos o ensaio de Anexina V/PI, no qual utilizamos as concentrações de IC₂₅ e IC₅₀ do peptídeo e incubamos as células por um período de 48h.

Após o tratamento das células, observamos que não houve diferença na apoptose inicial (Figura 4A) (IC25 $p=0,5112$; IC50 $p=0,9588$). Já em relação a apoptose tardia (Figura 4B), houve aumento significativo (IC25 $p=0,0028$; IC50 $p=0,0003$). Desta forma, a apoptose tardia influenciou ainda no aumento da apoptose total (Figura 4C) (IC25 $p=0,0023$; IC50 $p=0,0005$).

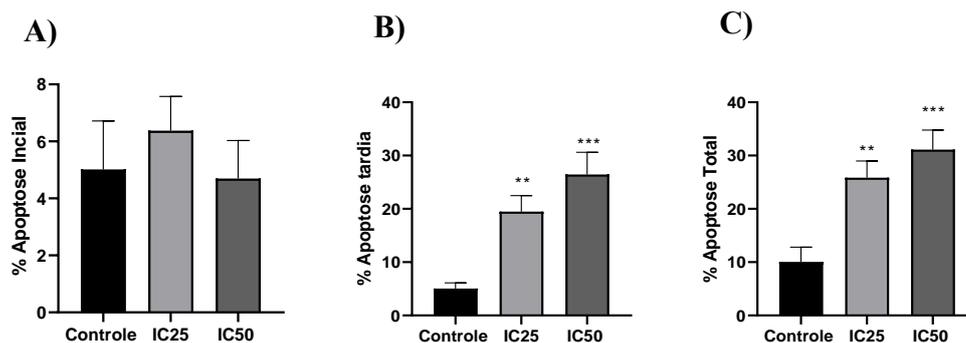


Figura 4. A presença do peptídeo Salamandrina-I induz apoptose na linhagem de HL-60. Após o tratamento de 48h com as concentrações de IC25 e IC50 de Salamandrina-I, observa-se que não houve diferença no apoptose inicial (A) (An+/PI-), porém houve um aumento significativo nas taxas de apoptose tardia (B) (An+/PI+) e total (C) (An+). Os resultados são expressos utilizando média +/- desvio padrão. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$.

4.3. Salamandrina-I induz dano mitocondrial na linhagem HL-60

Para avaliar as condições da membrana mitocondrial das células HL-60 mediante a presença do peptídeo, realizamos o ensaio Rodamina 123, no qual utilizamos as concentrações de IC25 e IC50 do peptídeo e incubamos as células por um período de 48h.

Observamos que houve uma redução significativa do potencial de membrana mitocondrial após o tratamento com IC25 ($p < 0,0001$) e IC50 ($p < 0,0001$) de maneira dose-dependente (Figura 5A).

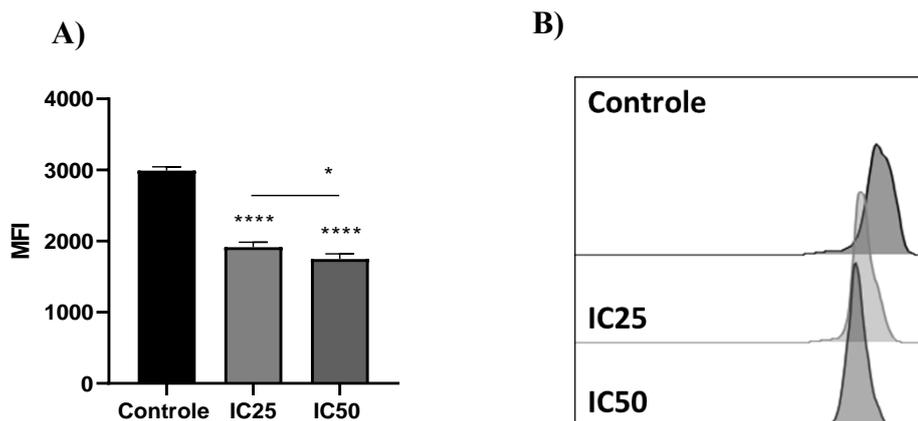


Figura 5. Salamandrina-I gera dano mitocondrial na linhagem de HL-60. A) Após o tratamento das células por 48h com as concentrações de IC25 e IC50 de Salamandrina-I, observou-se uma diminuição da intensidade da fluorescência (MFI), indicando dano à membrana mitocondrial. B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência da sonda rodamina 123 nas células HL-60 tratadas com Salamandrina-I. Os resultados são expressos utilizando média +/- desvio padrão. *significa $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.

4.4. Salamandrina-I aumenta a liberação de LDH

A enzima Lactato Desidrogenase (LDH) é um indicativo da viabilidade celular, isto é, quanto maior o valor de LDH, maior é a quantidade de células não viáveis. Nesse ensaio utilizamos as concentrações de IC25 e IC50 do peptídeo e incubamos as células por um período de 48h. Constatou-se que, de forma dose-dependente, o peptídeo induz a liberação de LDH (Figura 6).

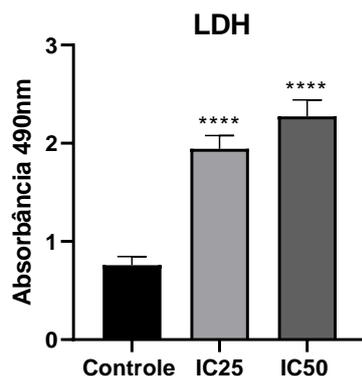


Figura 6. Salamandrina-I induz o aumento da liberação de LDH na linhagem de células HL-60. Após o tratamento das células por 48h com as concentrações de IC25 e IC50 de Salamandrina-I, constatou-se um aumento significativo na liberação de LDH, indicativo de morte celular. Os resultados são expressos utilizando média +/- desvio padrão. ****p <0,0001.

4.5. Salamandrina -I aumenta a atividade de CASP 1 em células HL-60

Com o objetivo de verificar por meio de qual via a Salamandrina-I vai induzir a morte celular, realizamos o ensaio de atividade de CASP1, no qual utilizamos somente a concentração mais efetiva do peptídeo (IC50) e incubamos as células por um período de 48h.

Após o tratamento, observamos que há um aumento significativo da atividade de CASP 1 (sem inibidor p=0,0065; com inibidor p=0,0477). Interessantemente, ao adicionarmos o inibidor específico da CASP1, Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagent, observamos uma diminuição apenas parcial da atividade da CASP1, mostrando que outras caspases também podem estar envolvidas nesse processo (Figura 7).

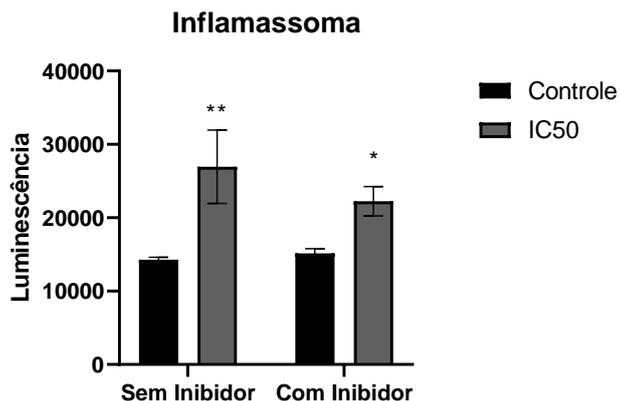


Figura 7. Salamandrina-I aumenta a atividade de CASP1. Após o tratamento das células por 48h com a concentração de IC50 de Salamandrina-I, observamos por meio da presença e ausência do inibidor de CASP1 YVAD-CHO que, além da atividade de algumas caspases, há presença de atividade significativa da CASP 1. E esse é um indicativo de morte celular por via do inflamassoma. Os resultados são expressos utilizando média +/- desvio padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.6. Salamandrina-I reduz a proliferação celular na HL-60

Após a realização do ensaio de CFSE, no qual utilizamos as concentrações de IC25 e IC50 do peptídeo e incubamos as células por um período de 48h, pudemos observar que nas concentrações de IC25 ($p = 0,0012$) e IC50 ($p < 0,0001$), houve diminuição da proliferação das células HL-60 (Figura 8).

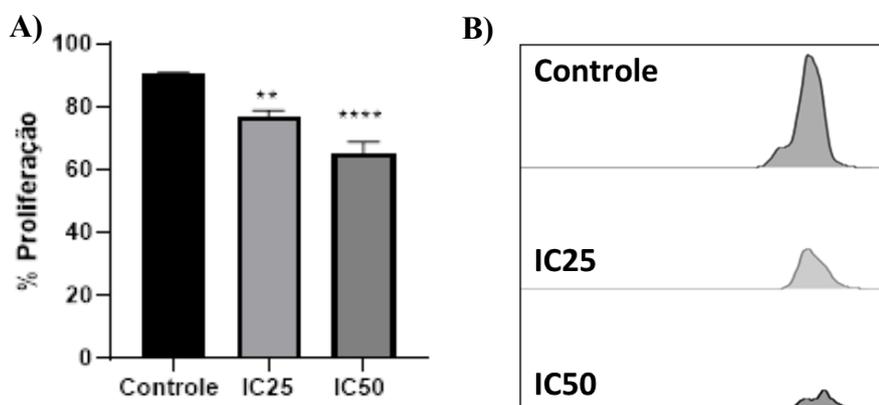


Figura 8. Salamandrina-I reduz a proliferação da linhagem HL-60. A) Após o tratamento das células por 48h com as concentrações de IC25 e IC50 de Salamandrina-I, constatou-se que houve diminuição de proliferação da linhagem HL-60 de forma dose-dependente. B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência das células marcadas com CFSE. Os resultados são expressos utilizando média +/- desvio padrão. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

4.7. Salamandrina-I interfere no ciclo celular das células HL-60

Em células cancerígenas, o ciclo celular sofre alterações devido ao desbalanço de fatores de crescimento, acarretando numa proliferação exacerbada dessas células. Através do ensaio de ciclo celular, no qual utilizamos as concentrações de IC25 e IC50 do peptídeo e incubamos as células por um período de 48h, conseguimos observar que a quantidade de células na fase G1 aumentou significativamente (IC25 $p=0,0012$; IC50 $p=0,0004$), acompanhada de uma diminuição de células na fase S (IC25 $p<0,0001$; IC50 $p<0,0001$) e diminuição na fase G2/M (IC25 $p=0,0050$; IC50 $p=0,0009$ (MALUMBRES *et al.*, 2001) (Figura 9). Isso significa que uma grande quantidade de células fica estacionada na fase de repouso e conseqüentemente, há diminuição de duplicação de material genético e divisão celular, mostrando assim, que a Salamandrina-I exerce um efeito anti-proliferativo nessas células.

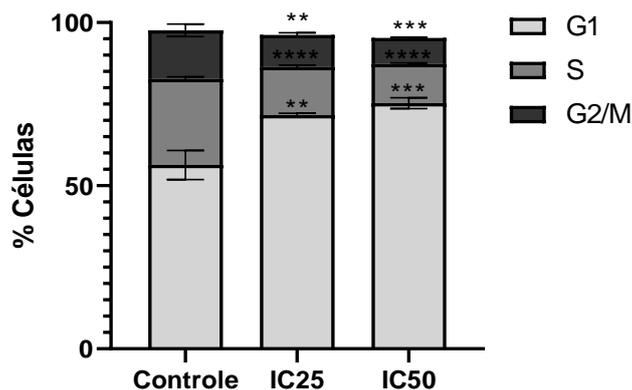
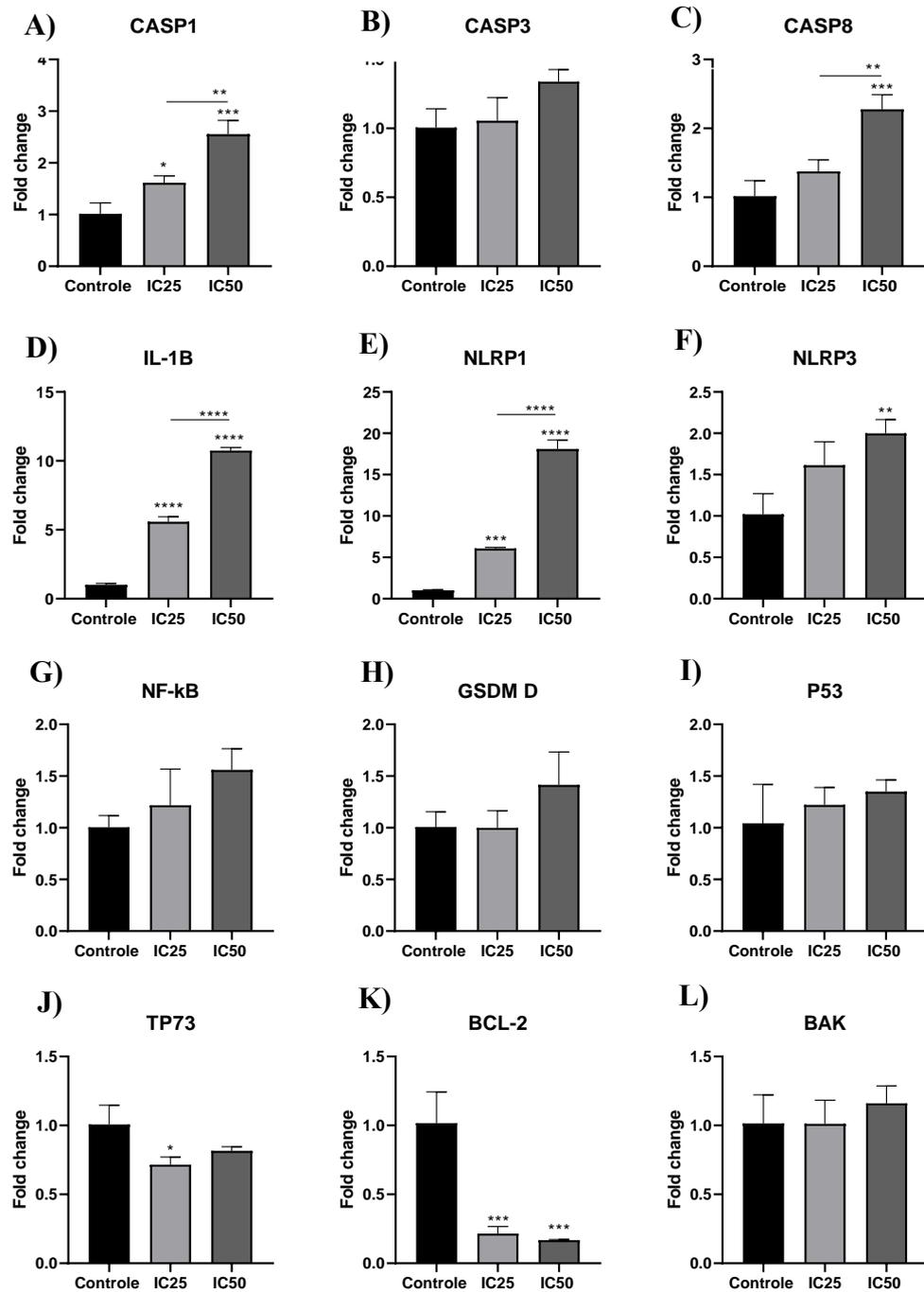


Figura 9. Salamandrina-I interfere no ciclo celular da linhagem HL60. O gráfico mostra o percentual de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento por 48h com as concentrações de IC25 e IC50 de Salamandrina-I, demonstrando a interferência do peptídeo principalmente sobre a fase G1, apresentando acúmulo de células nessas fases. E, quanto às fases S e G2, apresenta diminuição de células. Os resultados são expressos utilizando média +/- desvio padrão. **p < 0,01 e ***p < 0,001.

4.8. Modulação da expressão gênica pela Salamandrina-I

Com o objetivo de entender melhor o mecanismo pelo qual a Salamandrina-I induz a morte celular, realizamos PCR em tempo real de alguns genes relacionados a morte, proliferação e inflamação. Após tratamento com a Salamandrina-I nas concentrações de IC25 e IC50, observamos diminuição na expressão dos genes: *TP73* (IC25 p= 0,0164) (Figura 10J), *BCL-2* (IC25 p= 0,0008; IC50 p= 0,0006) (Figura 10K), *CDK1* (IC25 p < 0,0001; IC50 p < 0,0001) (Figura 10N) e *CDK2* (IC25 p= 0,0049; IC50 p= 0,0041) (Figura 10O). Observamos ainda aumento dos seguintes genes: *CASP 1* (IC25 p=0,0303; IC50 p=0,0003) (Figura 10A), *CASP 8* (IC50 p= 0,0007) (Figura 10C), *IL-1β* (IC25 p<0,0001; IC50 p<0,0001) (Figura 10D), *NLRP1* (IC25 p= 0,0002; IC50 p<0,0001) (Figura 10E) e *NLRP3* (IC50 p= 0,0056) (Figura 10F). Quanto aos genes *CASP3* (Figura

10B), NF-Kb (Figura 10G), *GSDM D* (Figura 10H), p53 (Figura 10I), *BAX* (Figura 10M), *BAK* (Figura 10L) e *Ki-67* (Figura 10P), não observamos diferenças significativas.



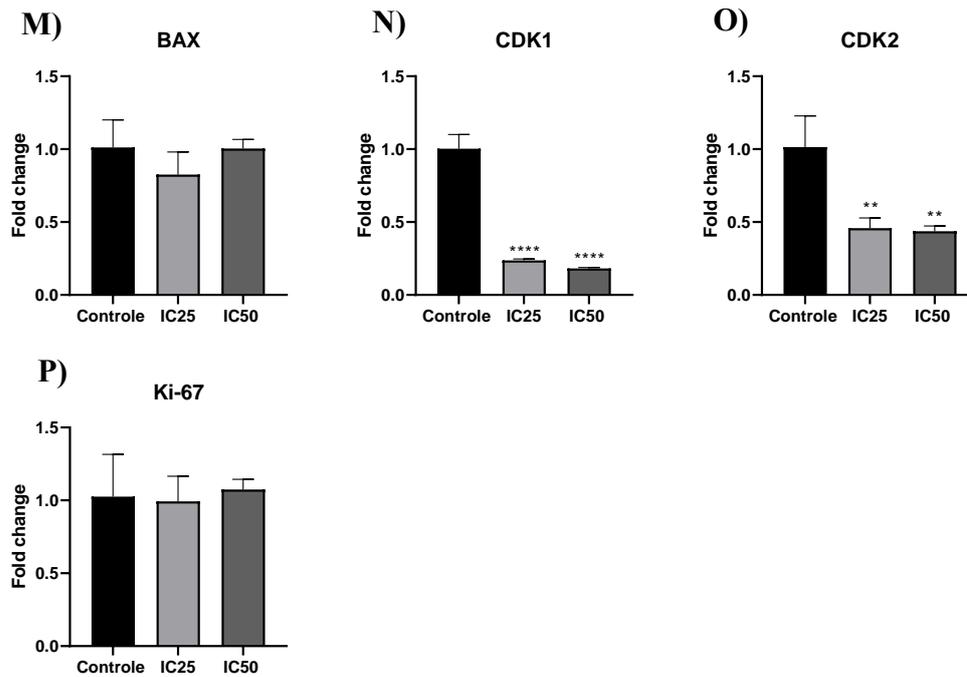


Figura 10. Influência da Salamandrina-I na expressão de genes relacionados a apoptose, proliferação e inflamação. Análise por PCR em tempo real da expressão dos genes *CAPS 1* (A), *CASP 3* (B), *CASP 8* (C), *IL-1 β* (D), *NLRP1* (E), *NLRP3* (F), *NF-kB* (G), *GSDM D* (H), *p53* (I), *TP73* (J), *BCL-2* (K), *BAK* (L), *BAX* (M), *CDK1* (N), *CDK2* (O) e *Ki-67* (P) nas células HL-60 tratadas e não tratadas com Salamandrina-I. O DDCT foi normalizado para cada alvo a partir do grupo HL-60 sem tratamento. Os resultados são expressos utilizando média +/- desvio padrão.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

A urgência de novas alternativas aos tratamentos convencionais para o câncer vem crescendo devido à ocorrência de efeitos adversos as células normais e, principalmente, ao grande obstáculo da resistência desenvolvida por células cancerígenas às drogas utilizadas por mecanismos distintos, fator que contribui para o aumento de mortalidade (SABNIS *et al.*, 2019; ASSARAF *et al.*, 2020) Além disso, no caso da LPA, existe a incidência de SAR. Neste contexto, peptídeos podem atuar como coadjuvantes no tratamento, pois possuem propriedades favoráveis como seletividade por células cancerígenas, baixa toxicidade e imunogenicidade (MIN *et al.*, 2018; TORNESELLO *et al.*, 2020; DING *et al.*, 2022). No presente estudo investigamos se a Salamandrina-I, um peptídeo antioxidante descoberto recentemente, possui alguma atividade anticâncer utilizando um modelo celular de leucemia mieloide aguda.

Inicialmente, realizamos o ensaio MTT (PLUMB, 2004) para analisar a viabilidade das células na presença do peptídeo Salamandrina-I e constatamos que houve redução expressiva nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Sabe-se que moléculas de ROS são abundantes em blastos de LMA, induzindo alterações gênicas e favorecendo o crescimento, escape imunológico, proliferação e efeito anti-apoptótico das células cancerígenas (ZHOU *et al.*, 2013, DONG *et al.*, 2021). Estudos como o de Dilworth *et al.* (2020) demonstram que os danos causados por estresse oxidativo podem ser contornados ao introduzir substâncias antioxidantes. Esse dado sugere que a ação antioxidante do peptídeo Salamandrina-I poderia neutralizar as ROS e induzir a apoptose nessas células.

Quando as células entram em processo de apoptose, acontece a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípídeo que em estado normal das células encontra-se na parte

interna da membrana celular (VERMES *et al.*, 1995; SCHUTTE *et al.*, 1998; RIEGER *et al.*, 2011). Utilizando as doses do IC25 e IC50, observamos um aumento na taxa de apoptose tardia e apoptose total nas células HL-60. O processo de apoptose pode acontecer por duas vias: a extrínseca, iniciado por danos causados à membrana celular que ativam os receptores sinalizando que a apoptose deve acontecer; e a intrínseca, relacionada a integridade da membrana mitocondrial. (MIN *et al.*, 2018). Tendo essa informação como base e os resultados de apoptose causada pela Salamandrina-I, prosseguimos o estudo com o objetivo de identificar qual via apoptótica o peptídeo induz a morte das células de linhagem HL-60.

Primeiramente, para verificar se houve dano à membrana mitocondrial, realizamos o ensaio Rodamina 123. Após 48 horas de tratamento, observamos que houve uma redução significativa do potencial de membrana mitocondrial, demonstrando que a Salamandrina-I era capaz de causar danos à mitocôndria. Resultados semelhantes foram observados por Cruciani *et al.* (1991) onde eles demonstraram que o peptídeo Magainin 2, extraído de um sapo africano (*Xenopus laevis*), também era capaz de causar danos a membrana mitocondrial, inibindo a respiração celular.

O processo de apoptose por via intrínseca é governado por um fino balanço de genes anti e pró-apoptóticos. A família de proteínas *BCL-2* está intimamente ligada a essa via. O gene *BCL-2* é caracterizado como anti-apoptótico (DIN-SHAMAS *et al.*, 2013; BANJARA *et al.*, 2020), tendo como uma das funções a proteção da permeabilização da membrana mitocondrial. Existem estudos confirmando a exacerbada expressão de *BCL-2* em células de LMA, gerando um obstáculo ao tratamento com quimioterápicos, mas também um alvo de tratamento (CAMPOS *et al.*, 1993; MIN *et al.*, 2018; HAFEZI, 2021). Além do gene *BCL-2*, *BAX* e *BAK* possuem íntima relação com a via intrínseca e são pró-

apoptóticos. A ativação desses genes resulta em formação de poros na membrana mitocondrial, ocasionando a liberação da proteína efetora de morte celular, citocromo C, do citoplasma mitocondrial para o celular, a ativação da *CASP 9* e posteriormente das *CASP 3* e *7* (MORRIS *et al.*, 2019; BOICE, *et al.*, 2020). Corroborando com nossos achados de MTT e Anexina/PI, observamos uma diminuição na expressão de BCL-2, um gene anti-apoptótico. No entanto, nas expressões de BAX e BAK não observamos diferenças significativas, sugerindo que apesar de haver dano à membrana mitocondrial, talvez a via de morte envolvida não seja a intrínseca. Quanto a *CASP 3*, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas.

Ainda tentando entender os mecanismos de morte envolvidos, prosseguimos com o ensaio que envolve a enzima Lactato Desidrogenase (LDH), ligada ao processo de apoptose e dano a membrana celular (KABAKOV *et al.*, 2018; KUMAR, *et al.*, 2018). Observamos então que na presença do peptídeo, houve aumento significativo de LDH, sugerindo dano na membrana celular e corroborando com os resultados de morte anteriores. Existe um complexo que induz sinais de morte no espaço transmembrana das células, que quando estimulado, gera uma cadeia de sinais que ativa a *CASP 8* (RAMIREZ *et al.*, 2018). Essa caspase é uma enzima proteolítica iniciadora do processo de apoptose que faz parte da via extrínseca (TRINIDAD-CALDERÓN *et al.*, 2021, IVANISENKO *et al.* 2019). Nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de *CASP 8*, fomentando as evidências que a apoptose poderia estar sendo gerada por via extrínseca.

A *CASP 1* é uma enzima proteolítica e está relacionada a via extrínseca e a morte por formação de inflamassoma ou piroptose. O inflamassoma é um complexo multimérico que quando entra em contato com os Padrões Moleculares Associados ao

Dano (PAMPs) ou sofre dano celular, responde através da liberação de citocinas pró-inflamatórias. A *CASP 1* é uma das responsáveis por converter as citocinas pró-inflamatórias *IL-1 β* e *IL-18* em suas formas ativas. A família de receptores do tipo NOD (NLRs) são sensores que quando estimulados com Padrões Moleculares Associados a Patógenos (DAMPs), PAMPs ou distúrbios celulares, desencadeiam a cascata do inflamassoma, podendo resultar em morte celular por processo inflamatório ou piroptose. (MARTINON *et al.*, 2002; RATHINAM *et al.*, 2012; VANAJA *et al.*, 2015).

A piroptose compartilha a via de ativação com o inflamassoma, no entanto, a diferença consiste em continuar a sinalização de liberação de *IL-1 β* e *IL-18* ou ativar GSDM D. A GSDM D é conhecida por formar poros na membrana celular e ocasionar a lise celular (FANG *et al.*, 2019; OPDENBOSCH *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2022). Por meio dos resultados obtidos por PCR em tempo real, observamos um aumento significativo da expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *CASP1* e *IL-1 β* , forte indicativo de morte por inflamassoma desencadeada pela Salamandrina-I. De forma a descartar a possibilidade de envolvimento de morte por piroptose, seguimos com a avaliação da expressão gênica de *GSDM D*, cujo resultado apresentou uma discreta tendência de aumento, porém sem diferença estatística. Além disso, detectamos ainda um aumento na atividade de *CASP1*, corroborando com os dados de expressão gênica e fortalecendo a hipótese de envolvimento do inflamassoma. No que diz respeito ao *NF- κ B*, fator transcricional relacionado a expressão de vários genes pró-inflamatórios (LIU *et al.*, 2017), apesar da tendência de aumento, não houve diferença significativa. Em relação a *P53* e *TP73*, genes supressores de tumor, também não observamos diferenças significativas.

Além do descontrole do processo de morte celular, as células cancerígenas também sofrem alterações no ciclo celular, desencadeando uma taxa de proliferação celular exacerbada (GAGLIA et al., 2022). No ciclo celular existem basicamente 4 etapas: crescimento celular (G0/G1), síntese de material genético (S), preparação para divisão (G2) e, por fim, a mitose (M). Utilizando agentes intercalantes fluorescentes que se ligam aos ácidos nucleicos, é possível acompanhar o progresso das fases do ciclo celular (COBB et al., 2013). Para verificar se a Salamandrina-I possui efeito anti-proliferativo, dois ensaios foram feitos: CFSE e Ciclo Celular. Observou-se que no teste de CFSE houve diminuição de proliferação e no ciclo celular, houve aumento de células na fase G1 (crescimento celular), acompanhado de uma redução das células na fase S (duplicação do material genético) e na fase (G2). Resultados semelhantes foram observados por Libério *et al* (2011) com o peptídeo pentadactilina que também interfere no ciclo celular de células cancerígenas.

A família de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são responsáveis por orquestrar os eventos que ocorrem na divisão celular e garantir que se houver alterações, essas não sejam expressas. Tanto a *CDK1* quanto a *CDK2* estão envolvidas nas fases iniciais da divisão celular e geralmente são expressas de forma descontrolada em células cancerígenas (DIEHL *et al.*, 2002; THU *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2021; KNUDSEN *et al.*, 2022). Por meio da PCR em tempo real, observamos que houve significativa diminuição na expressão gênica de *CDK1* e *CDK2*, confirmando os resultados apresentados nos ensaios de CFSE e Ciclo Celular. A proteína nuclear *Ki-67* também é um marcador de proliferação (MACCALLUM *et al.*, 2000; WATT *et al.*, 2016), no entanto, não observamos diferenças significativas na expressão desse gene após tratamento com a Salamandrina-I. Esses resultados mostram que, além de induzir apoptose, a Salamandrina-I também interfere na proliferação da linhagem HL-60. Interessantemente,

Zhang *et al* (2020) também observaram um atraso no ciclo celular com acúmulo de células na fase G1 após tratamento de linhagens de LMA com ácido azelaico. Além da redução da proliferação, também foi reportado um aumento nas taxas de apoptose, acompanhado por uma redução dos níveis de ROS e aumento da capacidade antioxidante dessas células.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo, ainda que preliminares, demonstram que o peptídeo antioxidante Salamandrina-I, possui impacto sobre as células da linhagem HL-60, promovendo apoptose, dano à integridade da membrana mitocondrial e interferindo na proliferação. Constatou-se ainda que a sua ação sobre as células HL-60 é dose-dependente.

A partir das análises dos resultados, observamos que o processo de apoptose era acompanhado por um aumento na expressão de *CASP 8* e diminuição de *BCL-2*. Além disso, nossos dados mostram que a Salamandrina-I é capaz de causar injúria à membrana mitocondrial e à membrana celular e que a morte celular parece ocorrer por meio da ativação inflamassoma, suportado pelo aumento de expressão da *CASP 1*, *NLRP1*, *NLRP3* e *IL-1B*. Por fim, esse peptídeo ainda exerce efeito anti-proliferativo nas células HL-60, causando diminuição na expressão de *CDK1* e *CDK2*, as quais interferem nas fases iniciais da proliferação (G1 e S), como demonstrado no ensaio de ciclo celular.

Essa é a primeira demonstração do potencial anticâncer da Salamandrina-I. A aplicabilidade desse peptídeo *in vivo* ainda deve ser investigada e validada para garantir sua efetividade, seletividade e a baixa toxicidade em relação as células normais. Nossos dados mostram que a Salamandrina-I pode ser uma ferramenta em potencial para o tratamento de leucemia mieloide aguda e esses resultados oferecem informações importantes que podem permitir o design de futuras moléculas bioativas usando a Salamandrina-I como modelo.

7. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, D.A.E. Leucemia promielocítica aguda: do histórico ao tratamento. Monografia - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2022.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 127 (20):2391-2405, 2016.

ASSARAF, G. Y. et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 46, 2020.

ATCC. HL-60. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-240>. Acesso em: 21/07/2023.

AYATOLLAHI, H. et al. The Survival of Patients with t(15;17)(q22;q12) Positive Acute Promyelocytic Leukemia: A Study in North-East of Iran. **Iran J Pathol**, 15(3):175-181, 2020.

BANJARA, S. et al. The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. **Biomolecules**, 10(1):128, 2020.

BAXTER, A. A. et al. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 74(20):3809-3825, 2017.

BENNETT J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemia. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, 33(4):451-8, 1976.

BLUNCK, B. C. Predição da fusão gênica ETV6-RUNX1 através da expressão celular de CD9 em leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Ministério da Saúde, **Instituto Nacional de Câncer**, 2014.

BOICE, A. et al. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(6), 2020.

BORTOLHEIRO, C. T. Morphologic classifications of myelodysplastic syndromes: from FAB to WHO. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, 28 (3), 2006.

CAMPOS, L. et al. High Expression of bcl-2 Protein in Acute Myeloid Leukemia Cells Is Associated With Poor Response to Chemotherapy. **American Society of Hematology, Blood**, 81(11): 3091-3096, 1993.

CHEN, M. et al. Spotlight on pyroptosis: Role in pathogenesis and therapeutic potential of ocular diseases. **Journal of Neuroinflammation**, 19(1):183, 2022.

CHIANGJONG, W. et al. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). **International Journal of Oncology**, 57(3), 2020.

COBB, Laura et al. The Cell Cycle Analysis. Labome, **The world of laboratories**, 2013.

CRUCIANI, et al. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 88(9):3792-6, 1991.

DIEHL, A. J. et al. Cycling to Cancer with Cyclin D1. **Cancer Biology & Therapy**, 1(3):226-31, 2002.

DILWORTH, L. L. et al. Effects of Moringa oleifera Leaf Extract on Human Promyelocytic Leukemia Cells Subjected to Oxidative Stress. **Journal of Medicinal Food**, 23(7):728-734, 2020.

DING, P. et al. Progress and challenges of multidrug resistance proteins in diseases. **American Journal of Cancer Research**, 12(10), 2022.

DIN-SHAMAS, A. et al. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 5(4), 2013.

DONG, C. et al. Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment. **Chinese Medical Journal**, 134(14), 2021.

DRUGBANK. Tretinoin (Access number -DB00755).

EGHTEDAR, A. et al. Characteristics of translocation (16;16)(p13;q22) Acute myeloid leukaemia. **American Journal of Hematology** 8(3):341-342, 2012.

FANG, Y. et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 121:109595, 2019.

GAGLIA, G. et al. Temporal and spatial topography of cell proliferation in cancer. **Nature Cell Biology**, 24(3):260-270, 2022.

GALLO, R. L. et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 9(11), 1994.

GIULIANI, A. et al. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**, 2(1), 2007.

HAFEZI, S. et al. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. *Cancers (Basel)*, 13(6):1292, 2021.

HOFFBRAND, V et al. *Fundamentos em hematologia de Hoffbrand*. 2011.

IVANISENKO, N. V. et al. Mechanisms of Procaspace-8 Activation in the Extrinsic Programmed Cell Death Pathway. **Mathematical and Structural Immunology**, 3 (1), 2019.

JÁCOMO, H. R. et al. From the molecular model to the impact on prognosis: an overview on acute promyelocytic leucemia. **Rev. Assoc. Med. Bras**, 54(1):82-9, 2008.

JEDEMA, I. et al. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. **IMMUNOBIOLOGY**, 209(2):163-172, 2004.

KABAKOV, A. E., et al. Cell Death and Survival Assays. **Methods Mol Biol**, 1709:107-127, 2018.

KNUDSEN, S. E. et al. CDK/cyclin dependencies define extreme cancer cell-cycle heterogeneity and collateral vulnerabilities. **Cell Reports**, 38 (5):109987, 2022.

KUFE D.W. et al. *Holland-Frei Cancer Medicine*. **BC Decker**, 6th edition, 2003.

KUMAR, P. et al. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. **Cold Spring Harbor Press**, 2018.

LAU, J.L. et al. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorg Med Chem**, 26(10):2700-2707, 2018

LAVAU, C et al. The t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia. **Leukimia**, 8(10):1615-21, 1994.

LEAL, M. A. et al. Genetic characteristics of de novo acute promyelocytic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 31(2): 105-109, 2009.

LI J. et al. Progress in the treatment of acute promyelocytic leukemia: optimization. **Int J Hematol**, 100(1):38-50, 2014.

LIBÉRIO, S. M. et al. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Springer-Verlag, Amino Acids** (2011) 40:51–59, 2011.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Nature**, 9 (11): 670-676, 2017.

LU, J. et al. Detection of Mitochondria Membrane Potential to Study CLIC4 Knockdown-induced HN4 Cell Apoptosis In Vitro. **J. Vis. Exp.**, (137):56317, 2018.

MACCALLUM, E. D. et al. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. **The Journal of Pathology**, 191(3):286-98, 2000.

MALUMBRES, M. et al. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 1(3):222-31, 2001.

MARTINON, F. et al. The inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . **Molecular Cell**, 10(2):417-26, 2002.

MARTINS, S. L. R. et al. A importância da imunofenotipagem na leucemia mieloide aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 46:57-62, 2000.

MCKENNA, W.R. et al. Acute promyelocytic leukaemia: a study of 39 cases with identification of a hyperbasophilic microgranular variant. **Br J Haematol.**, 50(2):201-14, 1982.

MIN, K. A. et al. Pro-apoptotic peptides-based cancer therapies: challenges and strategies to enhance therapeutic efficacy. **Archives of Pharmacal Research**, 41(6):594-616, 2018.

MORRIS, G. et al. Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. **Molecular Neurobiology**, 56 (10), 2019.

OPDENBOSCH, N. V. et al. Caspases in cell death, inflammation, and disease. **Cell**, 167(7):1693-1704, 2019.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29(9):45, 2001.

PLÁCIDO, A. et al. The Antioxidant Peptide Salamandrin-I: First Bioactive Peptide Identified from Skin Secretion of Salamandra Genus (*Salamandra salamandra*). **Biomolecules- MDPI**, 10(4):512, 2020.

PLUMB, J. A. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Cancer Cell Culture. Methods Mol Med.** 28:25-30, 2004.

RAMIREZ, L. M. et al. A primer on caspase mechanisms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 82:57-58, 2018.

RATHINAM, V. A. K. et al. Regulation of inflammasome signaling. **Nature Immunology**, 13(4):333-42, 2012.

RIEGER, A. M. et al. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **J. Vis. Exp.** (50):2597, 2011.

RUEDA, C. L. et al. Translocation t(8;21)(q22;q22) in Acute Myeloid Leukaemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 26(1):58-59, 2004.

RYAN, M. M. et al. Acute Promyelocytic Leukemia: A Summary. **J Adv Pract Oncol.** 9(2), 2018

SABNIS, A. J. et al. Principles of Resistance to Targeted Cancer Therapy: Lessons from Basic and Translational Cancer Biology. **Trends in Molecular Medicine**, 25(3), 2019.

SAINTY, D. et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. **Blood**, 96(4):1287-96, 2000.

SANTOS, S. L. F. et al. Hematological features and expression profile of myeloid antigens of acute promyelocytic leukemia patients: analysis of prognostic factors for development of the retinoic acid syndrome. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 50(3):286-92, 2004.

SANZ, A.M. et al. History of Acute Promyelocytic Leukemia. **Clin Hematol Int. Dec.**, 3(4), 2021.

SCHMIDT, K. A. et al. The p53/p73 - p21CIP1 tumor suppressor axis guards against chromosomal instability by restraining CDK1 in human cancer cells. **Oncogene**, 40(37): 5462-5474, 2021.

SCHUTTE, B. A. et al. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. **Journal of Neuroscience Methods**, 86 (1): 63-69. 1998.

SHORT J et al. Acute myeloid leukaemia. **Lancet**, 392: 593-606, 2018.

SINGH, C. et al. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. **Methods in Molecular Biology**, 1392:161-76, 2016

TERWILLIGE, T et al. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, 7(6):e577, 2017.

THOMAS, X. Acute Promyelocytic Leukemia: A History over 60 Years—From the Most Malignant to the most Curable Form of Acute Leukemia. **Oncol Ther.**, 7(1):33-65, 2019

THU, K. L. et al. Targeting the cell cycle in breast cancer: Towards the next phase. **Cell Cycle**, 17(14):1533-1552, 2018.

TOESCU, E. C. et al. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, 44 (6):941–947, 2000.

TORNESELLO, A. L. et al. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. **Molecules**, 25(11), 2020.

TRINIDAD-CALDERÓN, P. A. et al. Natural Peptides Inducing Cancer Cell Death: Mechanisms and Properties of Specific Candidates for Cancer Therapeutics. **Molecules**, 26(2), 2021.

LALLEMAND-BREITENBACH, V. et al. Retinoic acid plus arsenic trioxide, the ultimate panacea for acute promyelocytic leukemia?, **Blood**, 122(12):2008-10, 2013

VANAJA, S. et al. Mechanisms of inflammasome activation: Recent advances and novel insights. **Trends in Cell Biology**, 25(5):308-315, 2015.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis - Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, 184(1):39-51, 1995.

WATT, M. F. et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. **eLife**, 5:e13722, 2016.

YILMAZ, M et al. Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. **Blood Cancer J**, 2021

ZHANG, D. et al. Azelaic Acid Exerts Antileukemia Effects against Acute Myeloid Leukemia by Regulating the Prdxs/ROS Signaling Pathway. **Oxid Med Cell Longev**. 2020:1295984, 2020

ZHANG, Y. et al. Bioactive peptides for anticancer therapies. **Biomaterials Translational**, 4(1), 2023.

ZHOU, F. et al. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Journal of Leukocyte Biology**, 94 (3), 2013.