



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

NAKALY NATIELY DE OLIVEIRA

**EFEITO DO PEPTÍDEO SALAMANDRINA-I SOBRE A VIABILIDADE DA
LINHAGEM CELULAR DE ERITROLEUCEMIA HEL**

BRASÍLIA

2023

NAKALY NATIELY DE OLIVEIRA

**EFEITO DO PEPTÍDEO SALAMANDRINA-I SOBRE A VIABILIDADE DA
LINHAGEM CELULAR DE ERITROLEUCEMIA HEL**

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

NAKALY NATIELY DE OLIVEIRA

**EFEITO DO PEPTÍDEO SALAMANDRINA-I SOBRE A VIABILIDADE DA
LINHAGEM CELULAR DE ERITROLEUCEMIA HEL**

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. Amanda Évelin Silva de Carvalho

Profa. Dra. Andreeanne Gomes Vasconcelos

Me. Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga

BRASÍLIA

2023

RESUMO

A eritroleucemia (EL) foi classificada como um subtipo de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016 e se apresenta como uma doença hematológica rara e agressiva. Até o momento, não existe um tratamento específico disponível para a EL, o que contribui para baixa sobrevida dos pacientes. Mais recentemente, diversos estudos têm sido conduzidos sob a perspectiva de se identificar peptídeos com potencial anticâncer, que poderiam ser utilizados para tratamento de neoplasias. No presente trabalho, avaliamos se a Salamandrina-I, um peptídeo antioxidante recém identificado e isolado, possui propriedades anticâncer na linhagem celular de eritroleucemia HEL. Inicialmente, utilizamos o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular e validamos os processos de morte celular e proliferação por Citometria de Fluxo. Utilizamos ainda a técnica de PCR em tempo real para identificar genes que poderiam ser modulados pela Salamandrina-I. Nossos resultados mostram que a Salamandrina-I é capaz de induzir apoptose nas células HEL de maneira dose-dependente ($p < 0.0001$), além de reduzir a taxa de proliferação celular ($p < 0.05$). Interessantemente, esses achados foram acompanhados de um aumento na liberação de LDH ($p = 0.0007$) e da expressão de *CASP1* ($p = 0.0093$) e *NLRP3* ($p = 0.0015$), sugerindo o envolvimento do mecanismo de piroptose. Embora estudos adicionais sejam necessários para caracterizar as alterações moleculares e celulares que podem ser causadas pela Salamandrina-I, nossos resultados preliminares mostram que o peptídeo Salamandrina-I é capaz de controlar o crescimento e induzir a apoptose da linhagem de eritroleucemia HEL.

Palavras-chave: Eritroleucemia; Leucemia Mielóide Aguda, Salamandrina-I, Efeito Anticâncer.

ABSTRACT

Erythroleukemia (EL) was classified as an Acute myeloid leukemia (AML) subtype by the World Health Organization (WHO) in 2016 and presents as a rare and aggressive hematological disease. So far, there is no specific treatment available for EL, which contributes to low patient survival. Recently, several studies have been conducted from the perspective of identifying peptides with anticancer potential, which could be used for neoplasm treatments. In this study, we evaluated whether Salamandrin-I, a recently identified and isolated antioxidant peptide, has anticancer properties in the erythroleukemia cell line HEL. Initially, we used the MTT assay to assess cell viability, and the processes of cell death and proliferation were validated by Flow Cytometry. We also used real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to identify genes that could be modulated by Salamandrin-I. Our results show that Salamandrin-I is capable of inducing apoptosis in HEL cells in a dose-dependent manner ($p < 0.0001$), in addition to reducing the cell proliferation rate ($p < 0.05$). Interestingly, these findings were accompanied by an increase of LDH ($p = 0.0007$) release, and *CASP1* ($p = 0.0093$) and *NLRP3* ($p = 0.0015$) expression, suggesting the involvement of the pyroptosis mechanism. Although further studies are needed to characterize the molecular and cellular changes that may be caused by Salamandrin-I, our preliminary results show that the Salamandrin-I peptide can control cell growth and induce apoptosis of the HEL erythroleukemia cell line.

Keywords: Erythroleukemia, Acute Mieloid Leukemia, Salamandrin-I, anticancer effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eritroleucemia (LMA-M6).....	16
Figura 2 - Redução da viabilidade celular nas células HEL.....	30
Figura 3 - Estratégia de gate utilizada para análise por citometria de fluxo.....	32
Figura 4 – A presença do peptídeo aumenta a apoptose em células HEL.....	32
Figura 5 - Dano mitocondrial induzido pela Salamandrina-I.....	33
Figura 6 - Indução da liberação de LDH pela Salamandrina-I.....	34
Figura 7 - Capacidade antiproliferativa da Salamandrina-I em modelo de linhagem HEL.....	35
Figura 8 - Impacto da Salamandrina-I sobre o ciclo celular das células HEL.....	36
Figura 9 - Impacto da Salamandrina-I sobre os níveis de expressão gênica.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critério de Diagnóstico da LMA pela FAB.....	13
Tabela 2 - Classificação da OMS para Leucemia Aguda.....	14
Tabela 3 – Sequência dos genes utilizados na PCR em tempo real.....	28

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

μL = Microlitro

μM = Micromolar

BAK = proteína pro-apoptótica homóloga ao BCL-2

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

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

BCR-ABL = Produto da translocação do cromossomo 9 com o 22

CASP2 = Caspase 2

CASP3 = Caspase 3

CASP5 = Caspase 5

CASP8 = Caspase 8

CASP9 = Caspase 9

CD = do inglês "*Cluster of Differentiation*"

CDKs = Quinases dependentes de ciclinas

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

DMSO = Dimetil Sulfóxido

EL = Eritroleucemia

EA = Eritroleucemia Aguda

EP = Eritroleucemia Pura

EGIL – do inglês “*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*”

ETV6–RUNX1 = Produto da translocação do cromossomo 12 com o 21

FAB = Grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico

FDA = do inglês “*Food and Drug Administration*”

GAPDH = Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

IC = Concentração Inibitória

IL1 β = Interleucina 1 β

inv (16) = Inversão do cromossomo 16

IP = Iodeto de Propídeo

Ki-67 =

LLA = Leucemia Linfoide Aguda

LLA-B = Leucemia Linfoide aguda que acomete a linhagem de linfócitos B

LLA-T = Leucemia linfoide aguda que acomete a linhagem de linfócitos T

LDH = Lactato Desidrogenase

LMA = Leucemia Mieloide Aguda

MO = Medula óssea

MTT = do inglês “*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*”

NOD = Receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo

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

OMS = Organização Mundial da Saúde

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

P53 = Gene supressor de tumor

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

PML-RAR α = Proteína codificada pela translocação do cromossomo 15 com o 17

q = Braço longo cromossômico

ROD123 – Rodamina 123

ROS = do inglês “*reactive oxygen species*”

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

SFB = Soro Fetal Bovino

SMD = Síndrome Mielodisplásica

t(1;19) = Translocação do cromossomo 1 com o 19

t(12;21) = Translocação do cromossomo 12 com o 21

t(9;22) = Translocação do cromossomo 9 com o 22

TCF3–PBX1 = Produto da translocação do cromossomo 1 com o 19

t(8;21) = Translocação do cromossomo 8 com 21

t(15;17) = Translocação do cromossomo 15 com o 17

TP73 = do inglês “*Tumor protein 73*”

WHO = do inglês “*World Health Organization*”

x g = Força

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
1.1.Fisiopatologia e Epidemiologia das Leucemia Agudas.....	12
1.2.Eritroleucemia: aspectos epidemiológicos e fisiopatologia.....	15
1.2.1. Classificação e Diagnóstico.....	17
1.2.2. Tratamento.....	18
1.3. Peptídeos Antioxidantes.....	20
2.OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3.METODOLOGIA.....	23
3.1. Cultivo celular da linhagem HEL.....	23
3.2. Ensaio de viabilidade/proliferação celular por MTT.....	23
3.3. Ensaio de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídeo.....	24
3.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	24
3.5. Ensaio de liberação de LDH.....	25
3.6. Ensaio de proliferação celular por <i>carboxyflourescein sccinimidyl ester</i> (CFSE).....	26
3.7. Análise do Ciclo Celular.....	26
3.8. Extração de RNA e transcrição reversa.....	27

3.9. PCR em tempo real.....	27
3.10. Análise Estatística.....	29
4.RESULTADOS.....	31
4.1. Salamandrina-I reduz viabilidade celular na linhagem HEL.....	30
4.2. Salamandrina-I provoca aumento nos níveis de apoptose inicial e tardia em células HEL.....	31
4.3. Salamandrina-I não induz dano mitocondrial em linhagem HEL.....	33
4.4. Salamandrina-I promove liberação da Lactato Desidrogenase (LDH) pela linhagem HEL.....	34
4.5. Salamandrina-I inibe a proliferação celular da linhagem HEL.....	34
4.6. Salamandrina-I inibe o ciclo celular da linhagem HEL.....	35
4.7. Modulação da expressão gênica pela Salamandrina-I	36
5.DISCUSSÃO.....	40
6.CONCLUSÕES.....	47
7.REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Fisiopatologia e Epidemiologia das Leucemias Agudas

As Leucemias Agudas (LA) compreendem um grupo heterogêneo de desordens hematológicas, provocadas por um desarranjo na célula-tronco hematopoiética. Neste processo, ocorrem alterações genéticas nos precursores sanguíneos que bloqueiam a maturação celular, levando ao acúmulo de blastos (PELCOVITS; NIROULA, 2020). As LAs podem ser classificadas em mielóide ou linfóide a depender da linhagem dos precursores celulares afetados, dos genes e cromossomos envolvidos. (CERNAN; SZOTKOWSKI; PIKALOVA, 2017).

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma doença que resulta da proliferação de clones linfóides de maturação interrompida. Essa desordem maligna frequentemente está associada a mutações cromossômicas e rearranjos gênicos, e possui maior incidência em crianças. Dentre as alterações cromossômicas mais prevalentes se destacam as translocações t(1;19)(q23;p13), codificando a fusão TCF3-PBX1; a t(9;22)(q34;q11) que codifica a proteína anômala BCR-ABL e; a t(12;21)(p13;q22) que promove a fusão dos genes ETV6-RUNX1 (NAVARRETE-MENESES; PÉREZ-VERA, 2017).

Por outro lado, a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença mieloproliferativa caracterizada por alterações genéticas nos precursores celulares sanguíneos, ocasionando a hiperexpressão de clones neoplásicos de linhagem mielóide. A grande maioria dos casos não apresenta causalidade bem estabelecida para as conhecidas desordens genéticas e cromossômicas da doença, porém quimioterapia prévia e agentes químicos são fatores de risco para o desenvolvimento da LMA. Destaca-se também que a incidência é idade dependente, sendo a LMA mais comum em pacientes com idade ≥ 60 anos. As alterações frequentemente encontradas em pacientes com LMA são a translocação dos cromossomos 8 e 21 (q22;q22.1)

– t (8:21), a translocação do 15 e 17 – t (15:17)(q24.1; q21.2), que origina a oncoproteína PML-RAR α , e a inversão do cromossomo 16 (p13.1q22) – inv (16) (GRIMWADE; IVEY; HUNTLY, 2016; HEUSER et al., 2020). Devido ao caráter heterogêneo das anormalidades presentes na LMA, em 1975, o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs a classificação da doença baseada em aspectos estritamente morfológicos e citoquímicos e a dividiu em seis subtipos, porém alguns subtipos não eram reconhecidos pela classificação proposta e impossibilitava um diagnóstico preciso (Tabela 1) (MARTINS; FALCÃO, 2000).

Tabela 1. Critério de Diagnóstico da LMA pela FAB. (Adaptado de MARTINS; FALCÃO, 2000).

Critério de diagnóstico da LMA pela FAB	
M0	MPO+ por método imunológico ou ultra estrutural CD13+ ou CD33+ ou CD11b+
M1	MPO+ >3% blastos, >90% blastos da células nucleadas da MO
M2	% blastos MO >30%* e <90% células nucleadas da MO componente monocítico <20%
M3	Predomínio de células M3 (promielócitos)
M4	Similar a M2, componente monocítico na MO entre 20% e 80% e/ou >5.000 monócitos/mm ³ no sangue periférico
M5	Componente monócito >80% das células não eritróides M5A: indiferenciada (monoblástica); M5B: diferenciada (monocítica)
M6	Eritroblastos >50% das células nucleadas da MO, Blastos >30% das células não eritróides
M7	Megacarioblastos >30% das células nucleadas da MO
*30% na classificação FAB inicial, reavaliada para 20% pela classificação da OMS -1999	

MPO: Mieloperoxidase; MO: Medula óssea; FAB: Grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico; OMS: Organização Mundial da Saúde.

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou as distintas categorias da doença baseando-se em anormalidades citogenéticas e morfológicas. Em 2016 a classificação da OMS foi revisada, facilitando a identificação prognóstica de cada subtipo de LMA (Tabela 2) (VARDIMAN *et al.*, 2009; ARBER *et al.*, 2016).

Tabela 2. Classificação da OMS para Leucemia aguda. (Adaptado de ARBER *et al.*, 2016).

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 relatadas
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 basofília aguda
Panmielose com mielofibrose aguda
Sarcoma Mieloide
Proliferação mieloide relatada em Síndrome de Down
Mielopoiese anormal transitória (TAM)
Leucemia mieloide associada à Síndrome. de Down

LMA: Leucemia Mielocítica Aguda; LPA: Leucemia Promielocítica Aguda; NOS: Subtipo Não Especificado.

1.2 Eritroleucemia: aspectos epidemiológicos e fisiopatologia

Inicialmente, a EL foi descrita por Di Guglielmo em 1917 (SCHWARTZ; CRITCHLOW, 1952) como uma síndrome constituída de elementos eritróides e mielóides imaturos presentes na medula óssea (MO). Neste período, A EL foi subdividida em duas categorias: aguda pura (Di Guglielmo disease) e crônica (Di Guglielmo síndrome) (WEINBERG; ARBER, 2021). Posteriormente, a EL foi classificada por William Dameshek como um subtipo da doença mielodisplásica, fundamentada na hipótese de um desarranjo no precursor mieloide comum (BODDU *et al.*, 2016). Contudo, apesar do esforço para a correta classificação da doença, as técnicas de diagnóstico ainda eram incertas e após o advento da caracterização citogenética ficou evidente que as anormalidades presentes na EL se assemelhavam àqueles presentes na LMA durante a crise aguda (WEINBERG; ARBER, 2021).

Atualmente, a EL é descrita como uma leucemia mieloide rara, em que a proliferação eritroblástica acomete cerca de 1% a 5% dos casos de LMA e está associada a um mau prognóstico. A doença possui um caráter agressivo e sua prevalência é maior em pacientes idosos, sendo mais predominante no sexo masculino do que no feminino (2:1) (BODDU *et al.*, 2016; FAGNAN *et al.*, 2021). Muitas vezes, a proliferação eritróide da EL está associada a

presença de cariótipo complexo, anormalidades nos cromossomos 5q e 7q e outros fatores de risco como a hipoalbuminemia e a elevação dos níveis séricos de lactato desidrogenase (LIU *et al.*, 2011; BODDU *et al.*, 2016;). Em um aspirado de MO podem ser observados eritroblastos com um citoplasma abundantemente basófilo, sem grânulos, com cromatina dispersa e a presença de vacúolos (Figura 1) (GROSSMANN *et al.*, 2013).

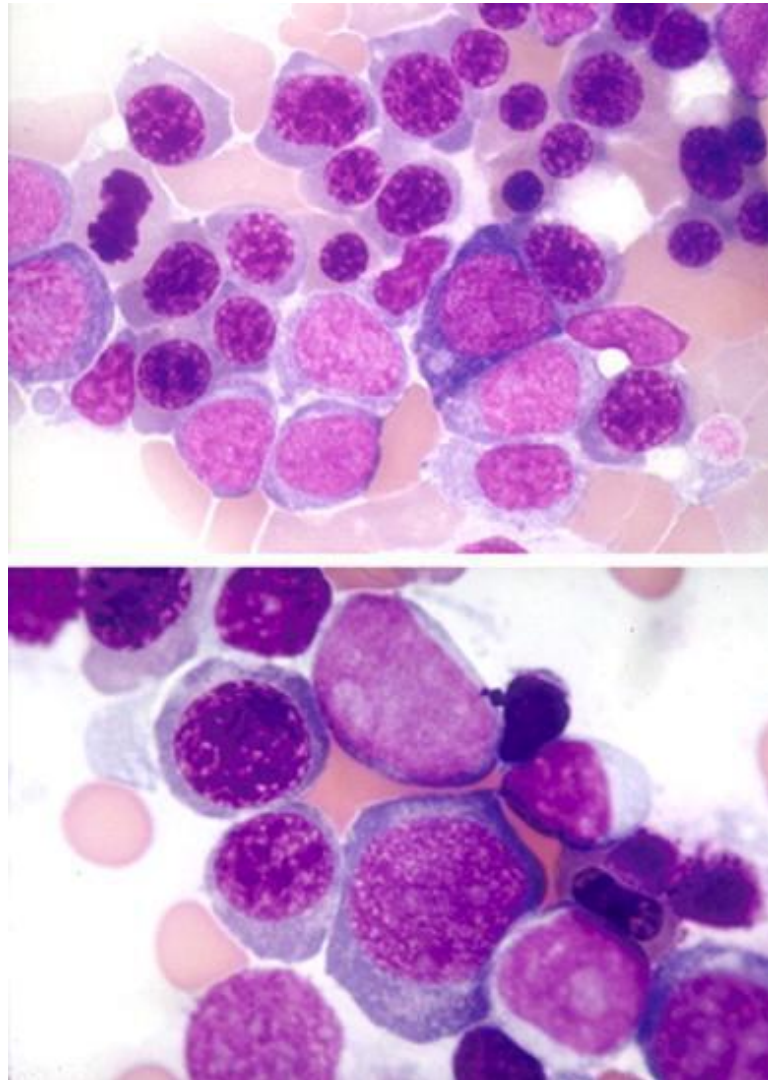


Figura 1. Eritroleucemia (LMA-M6). Esfregaço de medula óssea com evidente desvio à esquerda e presença de precursores eritróides. Adaptado de NAEIM; RAO, 2009.

Em função da heterogeneidade de desordens citogenéticas associadas à doença, os sintomas apresentados pelos pacientes são de caráter diverso, podendo apresentar-se de forma

mais emergente, como também de modo mais silencioso. Em alguns casos a doença é diagnosticada com complicações sintomáticas como infecções, hemorragias ou coagulação intravascular disseminada, já em outros, em alterações em exames de rotina (PELCOVITS; NIROULA, 2020). A maioria dos sintomas apresentados são consequências da proliferação exacerbada de progenitores mielóides provocando a supressão hematopoiética de células saudáveis e infiltração dessas células na MO e em outros órgãos (NAPOLITANO *et al.*, 2020). Os pacientes comumente apresentam fadiga, palidez, fraqueza e anemia severa. Hepatoesplenomegalia, aumento de blastos no sangue periférico, infecções frequentes e queda plaquetária são resultantes da infiltração e da indiferenciação dos blastos em células maduras efectoras (NAPOLITANO *et al.*, 2020; WEINBERG; ARBER, 2021).

1.2.1 Classificação e Diagnóstico

Em 1975, foi proposto pela FAB a identificação da EL baseada na abundante porcentagem de mieloblastos e o diagnóstico era fornecido se a porcentagem fosse $\geq 30\%$ de blastos na MO (Tabela 1). Em 1985 o critério da FAB foi revisado e passou a considerar o diagnóstico LMA-M6 mediante à presença de $>50\%$ de eritroblastos e $>30\%$ de mieloblastos. Caso a contagem fosse inferior ao limite da porcentagem estabelecido, a doença seria classificada como síndrome mielodisplásica com aumento de eritrócitos (WEINBERG; ARBER, 2021; ARENILLAS *et al.* 2016). A partir da classificação de neoplasias mielóides proposta pela OMS em 2008, a doença passou a ser dividida em dois subtipos: Eritroleucemia Aguda (EA) e Eritroleucemia Pura (EP) (WANG *et al.*, 2017). Desde então, a EA passou a ser definida mediante dois critérios: 1) células eritróides compreendendo $\geq 50\%$ das células nucleadas totais presentes na MO e, 2) mieloblastos compreendendo $\geq 20\%$ das células não eritróides. Em 2016, a doença foi definida como Eritroleucemia Pura e o critério de classificação passou a ser o envolvimento de 80% dos precursores da MO e pelo menos $\geq 30\%$ de proeritroblastos (Tabela 2) (WEINBERG; ARBER, 2021; CALVO *et al.*, 2016). A

eritroleucemia pura se diferencia das demais neoplasias agudas principalmente pela proliferação de precursores eritróides de maturação arrastada e em diferentes estágios.

No diagnóstico da doença comumente são empregadas as técnicas de imunohistoquímica ou citometria de fluxo, onde é realizada a busca por marcadores específicos expressos nos precursores eritróides. Em contraste com uma fração dos casos de LMA, a EL é negativa para CD34 e HLA-DR, por isso não são possibilidades para o diagnóstico (GREAVES; SIEFF; EDWARDS, 1983; WEINBERG; ARBER, 2021). Sendo assim a Anti-glicoforina A, anticorpo mais amplamente utilizado para o diagnóstico por citometria de fluxo, e Caderina-E são marcadores de células eritróides para todos os estágios de maturação e possuem grande utilidade e significância para o diagnóstico da doença. O CD71 (receptor de transferrina) pode também ser empregado, porém é um marcador não específico para células eritróides e pode ser positivo para outros subtipos de LMA (WEINBERG; ARBER, 2021). Alguns casos de EL apresentam expressão para P53 (ALEXANDRES *et al.*, 2021). Foi demonstrado que GATA 1 é um fator de transcrição do desenvolvimento expresso em células megacariocíticas e eritróides que pode ser usado como um marcador nuclear específico e sensível para o diagnóstico, porém em combinação com outros testes que comprovem que a positividade não está relacionada com a linhagem megacariocítica (LEE; WEINBERG; PINKUS, 2017).

1.2.2 Tratamento

Pacientes com EL comumente são tratados com terapias convencionais aplicadas a outros tipos de LMA e SMD. Isso se deve à raridade da doença (2-5% das LMAs), a ausência de estudos clínicos com a população afetada e o desafio para a elucidação de terapias efetivas. Em esquema de terapia intensiva (combinação de '7 + 3' citarabina e antraciclina e/ou regimes similares) a sobrevida global (SG) dos pacientes varia de 7,6 a 9 meses (SANTOS; BUESO-

RAMOS; RAVANDI, 2010; WEINBERG; ARBER, 2021). Com o avanço dos estudos na área de epigenética e agentes hipometilantes do DNA, foi estabelecido que esses possuem um importante papel em SMD e sobre neoplasias hematológicas (KANTARJIAN *et al.*, 2006).

A primeira linha no tratamento com agentes hipometilantes é a azacitidina e decitabina, para pacientes que não são candidatos à terapia intensiva ou transplante halogênico (ALMEIDA *et al.*, 2017). O transplante halogênico é uma possibilidade de tratamento aos pacientes, porém representa alguns riscos devido à toxicidade envolvida no condicionamento dos pacientes, a idade dos indivíduos e as comorbidades que possuem (CORNELISSEN; BLAISE, 2016). Contudo, apesar de aumentar a sobrevida de pacientes com eritroleucemia, as possibilidades terapêuticas disponíveis não são específicas e requerem boa adesão dos pacientes. Com essas possibilidades terapêuticas, a resposta inicial ao tratamento varia em média de 79 a 120 dias (WEINBERG; ARBER, 2021). É importante destacar também que os agentes quimioterápicos convencionais estão associados a toxicidade severa e mecanismo de evasão e multirresistência cancerígena (KYOUNG *et al.*, 2018). Nesse contexto, a busca por novas moléculas com efeito anticâncer tem sido alvo de estudos, pois representa a perspectiva de sobrevida e tratamento efetivo para os pacientes afetados (WEINBERG; ARBER, 2021).

Peptídeos bioativos têm sido alvo de constante estudo devido às aplicações terapêuticas e mimetismo de funções endógenas. Nesse sentido, uma ferramenta terapêutica em potencial são os peptídeos com efeito anticâncer (PACs), que apresentam propriedades citotóxicas favoráveis ao tratamento, bom perfil farmacocinético e conhecida aplicação em modelos de câncer (LAU; DUNN, 2018; WU *et al.*, 2014; LEE; XIE; CHEN, 2010). Devido às suas características promissoras, peptídeos direcionados a alvos específicos, como ao receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), foram sintetizados e aprovados para o tratamento de câncer de próstata, endométrio e ovário (RAJA *et al.*, 2022; EMONS; GRÜNDKER, 2021; GRÜNDKER; EMONS, 2003).

Nessa linha, muitos dos peptídeos bioativos encontrados são de origem animal e endogenamente possuem função imunitária ou reguladora que quando aplicados a células humanas possuem ação anticancerígena por inibição angiogênica tumoral (WU *et al.*, 2010), indução apoptótica (FANG *et al.*, 2013), indução necrótica (WANG *et al.*, 2013), modulação da resposta imune (MURUGAIYAN; SAHA, 2013), modulação da atividade de quinases e proteases (LI *et al.*, 2013), modulação de proteínas funcionais (SUN *et al.*, 2012) e através de indução da diferenciação de celular (FAN *et al.*, 2006).

1.3 Peptídeos Antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (ROS) fazem parte do ciclo celular e são frutos dos processos de proliferação, diferenciação e do metabolismo endógeno e exógeno que são finamente controlados por mecanismos de defesa contra essas espécies reativas formando um equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes. Em situações de desequilíbrio da homeostase, as maiores concentrações de espécies oxidativas reativas podem causar danos irreparáveis à célula, ao microambiente celular e representar um fator de dano capaz de afetar o DNA e gerar processos patológicos mediante ao desarranjo gênico, como a leucemia (DONG; ZHANG; ZHANG, 2021; DIZDAROGLU, 2012). O acúmulo de ROS provoca alterações no microambiente da célula tronco hematopoiética e fornece um desequilíbrio em seus estágios de maturação, competência funcional e diferenciação (CHEN *et al.*, 2017). Dentre um dos potenciais mecanismos de ação dos peptídeos contra as células cancerígenas, há o mecanismo antioxidante. Nesse sentido, moléculas que possam atuar como mediadores do estresse oxidativo, diminuindo a produção descontrolada de espécies reativas, são alvos para a regulação metabólica e possuem aplicação para o tratamento leucêmico (NAVRKALOVA *et al.*, 2015; JANNET *et al.*, 2017).

Recentemente, pesquisadores (PLÁCIDO et al.; 2020) isolaram o peptídeo Salamandrina-I da secreção da pele do anfíbio Salamandra-de-Fogo (*Salamandra salamandra*). Conhecidamente, a secreção da pele dos anfíbios possui papel fundamental na regulação de funções fisiológicas e na proteção contra microrganismos e predadores. Destaca-se que muitos desses peptídeos têm sido explorados quanto às suas ações farmacológicas (LAU; DUNN, 2018; PLÁCIDO et al., 2020). Entretanto, ainda não existem dados mostrando se a Salamandrina-I exerce algum tipo de efeito anticâncer. Dentro desse contexto e considerando o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento do câncer, neste estudo investigamos o efeito do peptídeo Salamandrin-I sobre a viabilidade e proliferação da linhagem celular de eritroleucemia aguda HEL.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I na viabilidade e proliferação da linhagem celular de eritroleucemia HEL e explorar os mecanismos envolvidos nesses processos.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar citotoxicidade do peptídeo Salamandrina-I em cultivo de células HEL;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre a apoptose das células HEL;
- Avaliar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre o potencial de membrana mitocondrial das células HEL;
- Investigar o impacto do peptídeo Salamandrina-I sobre a liberação da Lactato Desidrogenase;
- Determinar se a Salamandrina-I exerce influência na proliferação da linhagem HEL;
- Investigar o efeito do peptídeo Salamandrina-I sobre o ciclo celular da linhagem HEL;
- Avaliar por PCR em tempo real a modulação de genes associados aos processos celulares descritos acima.

3.METODOLOGIA

3.1. Cultivo celular da linhagem HEL

Para a execução desse estudo, utilizamos a linhagem celular humana de eritroleucemia aguda HEL (ATCC 92.1.7). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/mL penicilina e mantidas em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As trocas de meio eram realizadas a cada 48 horas, seguidas de um processo de contagem com auxílio de câmara de Neubauer de forma a manter a densidade celular entre 1x10⁵ e 1x10⁶ células/mL.

3.2. Ensaio de viabilidade/proliferação celular por MTT

O efeito citotóxico do peptídeo Salamandrina-I foi investigado pelo ensaio de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Em uma placa de 96 poços foram semeadas 5x10⁴ células por poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB). As células foram tratadas com concentrações crescentes do peptídeo Salamandrina-I (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM), por 48h e mantidas em estufa incubadora a 37°C com atmosfera úmida e a 5% de CO₂. Após esse intervalo, foram adicionados aos poços 5mg/mL de MTT e a placa foi incubada por 4 horas, sob as mesmas condições. Transcorrida a incubação a placa foi submetida a centrifugação por 10 minutos a uma velocidade de 400 xg. Findada centrifugação, o sobrenadante foi removido e 100 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) foram adicionados aos poços. A placa foi submetida à agitação em bandeja por 15 minutos para dissolver os cristais de Formazan. A leitura da absorbância foi realizada na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) em comprimento de onda de 570nm.

A partir de análise dos resultados obtidos pelo ensaio de MTT, foi possível estabelecer as concentrações do peptídeo Salamandrin-I capaz de matar 25% (IC₂₅) e 50% (IC₅₀) das

células e foi avaliada a influência sobre a taxa de apoptose celular pela técnica de Anexina e PI, conforme descrito a seguir.

3.3. Ensaio de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídeo

Com o objetivo de investigar o impacto do peptídeo Salamandrina - I sobre a apoptose celular das células da linhagem HEL, utilizamos o ensaio de Anexina V e Iodeto de Propídeo (IP). O IP possui ação intercalante ao DNA e é incapaz de penetrar células viáveis com integridade de membrana. Em circunstância de dano, ele é incorporado ao DNA (GALLUZZI *et al.*, 2018; DING *et al.*, 2020). A fosfatidilserina é um fosfolípídeo expresso na membrana bilipídica celular na porção citosólica, porém em condições de dano à membrana sofre a inversão e passa a ser expresso na porção extracelular, que se liga à Anexina V na presença de Cálcio. Quando a Anexina V é utilizada em combinação com IP, é possível distinguir os diferentes estágios apoptóticos pelos quais as células passam (NAMVAR *et al.*, 2015).

Para tal análise, foram cultivadas 2×10^5 células por poço em uma placa de 48 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Essas células cultivadas foram tratadas com o IC25 (21,66 μM) e o IC50 (26,24 μM) do peptídeo por 48 horas, simultaneamente ao grupo controle que não foi tratado. Findado esse período, as células foram recolhidas de seus respectivos poços e lavadas 3X com PBS gelado. Após completa remoção do PBS, as células foram ressuspensas no tampão de cálcio para possibilitar a marcação com Anexina V - FITC (BD Bioscience, USA). Antes da leitura de cada amostra foi adicionado o Iodeto de Propídeo (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante. A análise foi realizada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA), mediante a aquisição de 10.000 eventos.

3.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente Rodamina 123 (Rod 123), uma sonda fluorescente específica que se acumula

dentro de mitocôndrias ativas. Para isso 2×10^5 células foram cultivadas em uma placa de 48 poços e tratadas com as doses de IC25 (21,66 μM) e IC50 (26,24 μM) de Salamandrina-I por 48 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5%. Após este período, as células foram recolhidas de seus respectivos poços transferidas para tubos de citometria onde foram lavadas 3X com PBS e centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 300 μL de meio RPMI 1640 sem a suplementação de SFB e incubadas com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Rod 123 por 20 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Após esse período as células foram lavadas 2x com PBS, ressuspensas em PBS e analisadas no Citômetro FACSCalibur, mediante aquisição de 10.000 eventos. A análise dos resultados obtidos foi realizada no software FlowJo 10.5.3 (LLC, USA).

3.5. Ensaio de liberação de LDH

Para avaliarmos o impacto do tratamento com a Salamandrina-I sobre a liberação de Lactato desidrogenase (LDH), utilizamos o kit Cytotox 96 (Promega, USA). Esse kit permite avaliar a quantidade de LDH liberada no sobrenadante da cultura através de um ensaio enzimático que resulta na conversão de um sal de tetrazólio (iodonitro violeta de tetrazólio; INT) em um produto de formazan vermelho, cuja absorbância é diretamente proporcional à quantidade de LDH.

Para esse ensaio, foram cultivadas 2×10^5 células por poço em uma placa de 48 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Essas células foram tratadas com o IC25 (21,66 μM) e o IC50 (26,24 μM) do peptídeo por 48 horas ao abrigo de luz, em estufa a 37°C, com atmosfera de 5%, simultaneamente ao grupo controle que não foi tratado. Findado esse período, as células foram recolhidas de seus respectivos poços, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido e acondicionado em microtubos previamente identificados. Para a análise de LDH, 100 μL de cada uma das condições foram pipetados em

placas de 96 poços, onde também foram adicionados 50µL do reagente Cytotox. As placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas por 30 minutos a T.A. Após a incubação, foram adicionados 50µL de solução de parada. A placa foi submetida à agitação em bandeja por 15 minutos e a leitura da absorbância foi realizada na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter, CA, USA) no comprimento de onda de 490nm.

3.6. Ensaio de proliferação celular por *carboxyfluorescein sccinimidyl ester* (CFSE)

Para avaliar o impacto do peptídeo sobre a proliferação da linhagem HEL, 1×10^7 células foram marcadas com 7,5µM de *carboxyfluorescein sccinimidyl ester* (CFSE, Sigma-Aldrich). As células foram incubadas com o CFSE por 7,5 minutos em banho-maria a 37°C e após esse período a marcação foi interrompida com a adição de 10 mL de RPMI 1640 gelado contendo 10% de SFB. Após 5 minutos de incubação no gelo, as células foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e o *pellet* celular obtido foi ressuscitado em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e as células foram contadas por meio da câmara de Neubauer. Após a contagem, 2×10^5 foram plaqueadas e tratadas com o IC25 (21,66 µM) e o IC50 (26,24 µM) do peptídeo por 48 horas ao abrigo de luz, em estufa a 37°C, com atmosfera de 5%, simultaneamente ao grupo controle que não foi tratado. Findado esse período, as células foram recolhidas de seus respectivos poços e a proliferação celular foi analisada no Citômetro FACSCalibur (BD Bioscience, USA) mediante aquisição de 10.000 eventos.

3.7. Análise de Ciclo Celular

Para análise do ciclo celular, 8×10^5 células foram cultivadas em uma placa de 24 poços contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB. As células foram tratadas com as doses de IC25 (21,66 µM) e IC50 (26,24 µM) de Salamandrina-I por 48 horas, paralelamente ao grupo controle. As células foram recolhidas dos respectivos poços, transferidas a tubo cônico tipo falcon e lavadas por duas vezes com PBS. Após a lavagem, as células foram

centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos e posteriormente o sobrenadante foi desprezado. As amostras foram ressuspensas no vortex em fluxo contínuo com a adição gota a gota de 5mL de Metanol gelado e foram fixadas em gelo por 30 minutos. Após a fixação, os tubos foram centrifugados a 2000 x g por 5 minutos e lavados com PBS por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas com 50 µL da solução de RNase (100 µg/mL) e incubadas por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 400µL da solução de iodeto Iodeto de Propídeo (50 µg/mL), homogeneizado e incubado por 15 minutos ao abrigo de luz, em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram transferidas a tubos de citometria e foram adicionados 500 µL de PBS. A leitura foi realizada no Citômetro FACSCalibur, mediante aquisição de 100.000 eventos.

3.8. Extração de RNA e transcrição reversa

Para a extração de RNA, 8×10^5 células foram cultivadas em uma placa de 24 poços contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB. As células foram tratadas com as doses de IC25 (21,66 µM) e IC50 (26,24 µM) de Salamandrina-I por 48 horas, paralelamente ao grupo controle. Dado o período de incubação, o RNA das células tratadas e não tratadas foi extraído utilizando o TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA), de acordo com as orientações 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 µg 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.

3.9. PCR em tempo real

A fim de investigar o impacto da Salamandrina-I sobre o perfil transcricional das células leucêmicas, realizamos a análise quantitativa da expressão dos genes definidos na tabela 3 por PCR em tempo real (StepOnePlus, USA), utilizando a metodologia de *SYBR Green Master*

Mix (Thermo Fisher, USA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata e a análise da expressão gênica se deu pela metodologia de $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001), a partir da utilização do gene calibrador *GAPDH*, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvo.

Tabela 3. Sequência dos genes utilizados na PCR em tempo real. Sequência *Forward* e *Reverse* dos *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica utilizando a metodologia de SYBR Green.

Gene	Sequência Forward/Reverse (5'-3')
GAPDH	TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCT GGTGGTCCAGGGGTCTTAC
BAX	CAGACCGTGACCATCTTTGT GCCTCAGCCCATCTTCTTC
BAK	GTTTTCCGCAGCTACGTTTTT GCAGAGGTAAGGTGACCATCTC
BCL-2	CAAAGCTGCAGGCTGTTTAAG GTCTGTCTGTGTGTGTGATGT
P53	AGAAAACCTACCAGGGCAGC ACATCTTGTTGAGGGCAGGG
TP73	CACCTCAGCTCTCCATCTTATTG GCATGGGTCTTAGCCTTCT
CASP1	AAGACCCGAGCTTTGATTGACTC AAATCTCTGCCGACTTTTGTTCC
CASP2	ACAAAAGTGGCAGTGTGCCT TCCTTGCTGGTCAACCTGA
CASP3	CTAGCGGATGGGTGCTATTG GATACACAGCCACAGGTATGAG
CASP8	GGATGGCCACTGTGAATAACTG TCGAGGACATCGCTCTCTCA
MDM4	CCACGAGACGGGAACATTATT CCCAGCCTTCTTAGTCTTCTG
Ki-67	TAACACCATCAGCAGGGAAAG CTGCACTGGAGTTCCATAAA
CDK1	CTTGGCTTCAAAGCTGGCTC GGGTATGGTAGATCCCGGCT
Gasdermina D	ATGAGGTGCCTCCACAACCTCC CCAGTTCCTTGGAGATGGTCTC
NLRP3	TCCTCGGTAATCAGCACTAATCAG GGTCGCCAGGTCATTGTTG

MDM4	GGTGCGCAAGGTGAAATGTT CCATATGCTGCTCCTGCTGA
------	--

3.10. Análise Estatística

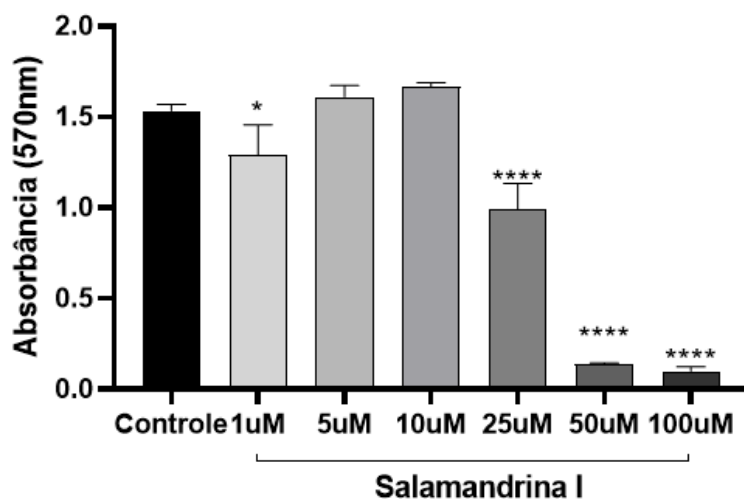
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o limiar de significância adotado foi de $p < 0,05$. Comparações incluindo três ou mais grupos foram realizadas usando ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.RESULTADOS

4.1. Salamandrina-I reduz a viabilidade celular na linhagem HEL

A fim de investigar o papel do peptídeo sobre a proliferação/viabilidade da linhagem HEL, realizamos o ensaio de MTT. Após 48 horas de incubação, as células HEL tratadas apresentaram diminuição da viabilidade celular de maneira dose dependente ($p < 0,0001$) (Figura 2A). A partir desses resultados, estabelecemos as doses para IC₂₅ ($p < 0.0001$) e IC₅₀ ($p < 0.0001$) que foram de 21,66 μ M e 26,24 μ M, respectivamente. (Figura 2B).

A)



B)

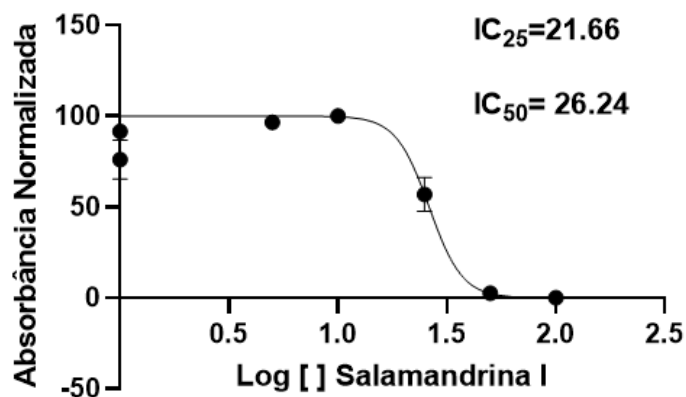


Figura 2. Redução da viabilidade celular nas células HEL. Após tratamento da linhagem celular HEL com doses crescentes do inibidor Salamandrina-I (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) por 48 horas, verificamos os resultados encontrados por espectrofotometria (A). A concentração do inibidor encontrada para o IC25 foi de 21,66 μ M, enquanto para IC50 foi de 26,24 μ M (B). Todos os resultados foram expressos utilizando a média \pm o desvio padrão. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.2. Salamandrina-I provoca aumento nos níveis de apoptose inicial e tardia em células HEL

Com o objetivo de verificar o efeito que a Salamandrina-I promove sobre a apoptose celular, tratamos a linhagem com o IC25 e o IC50 encontrados para o peptídeo por um período de 48 horas e avaliamos por citometria de fluxo (Figura 3), mediante a marcação dessas células com Anexina V e Iodeto de Propídio (IP), os níveis de apoptose inicial (Anexina+ /IP-), apoptose tardia (Anexina+ /IP+) e de apoptose total (Anexina+). Observamos que a presença do peptídeo resultou em um aumento da apoptose inicial (Figura 4A) (IC25 $p = 0.0153$; IC50 $p = 0.0001$), bem como da apoptose tardia (Figura 4B) (IC25 $p = 0.0135$; IC50 $p = 0.0003$) de maneira dose-dependente o que, conseqüentemente, influenciou no aumento dos níveis de apoptose total (Figura 4C) (IC25 $p = 0.0088$; IC50 $p < 0.0001$).

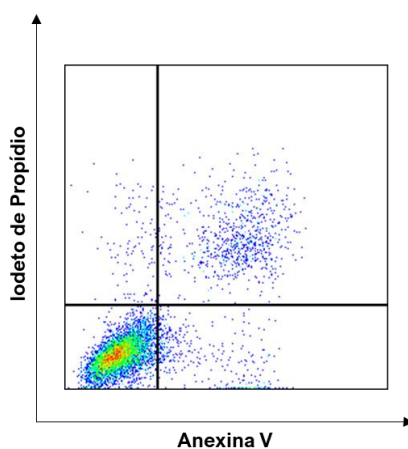


Figura 3. Estratégia de gate utilizada para análise por citometria de fluxo.

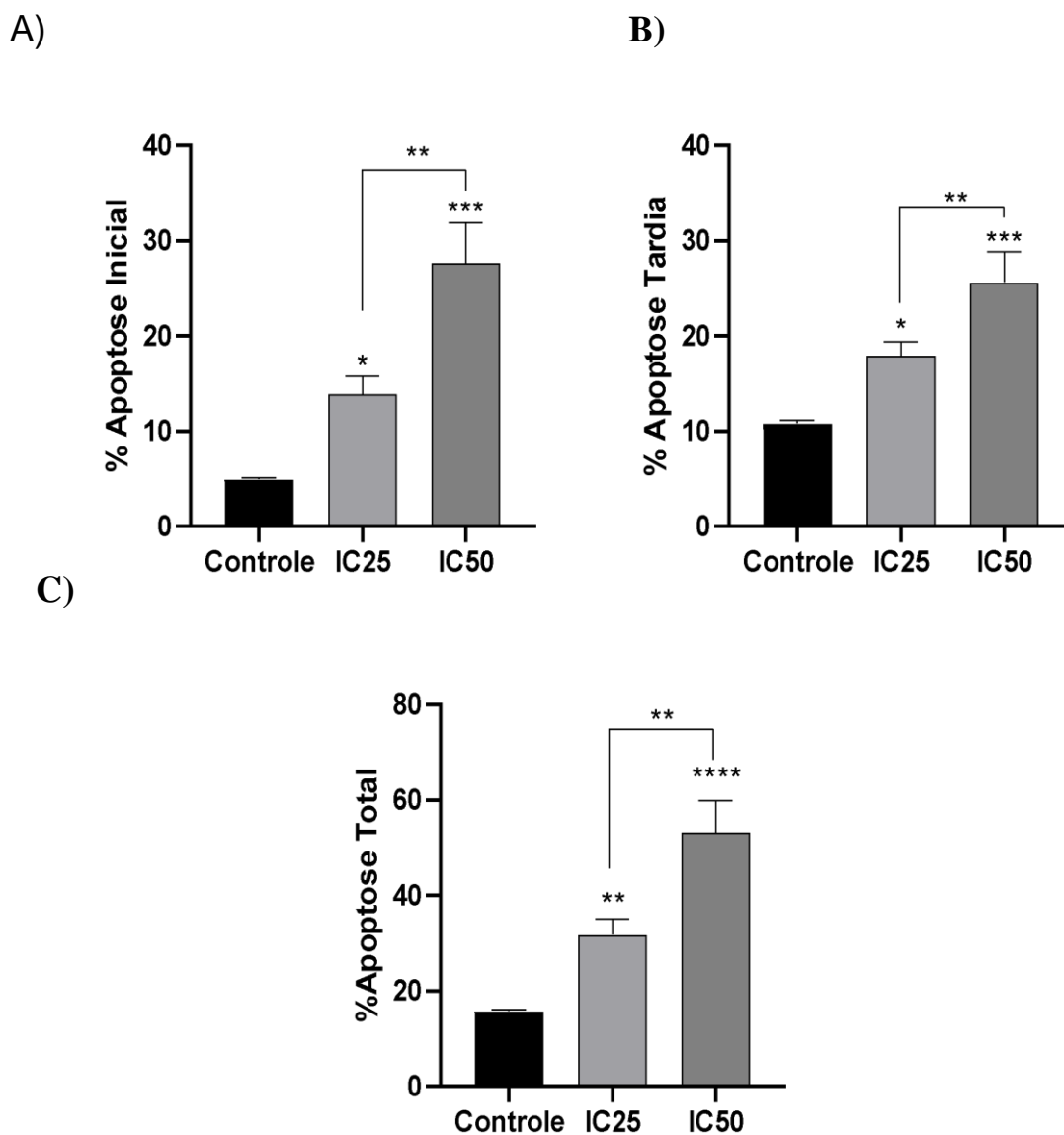


Figura 4. A presença do peptídeo aumenta a apoptose em células HEL. É possível observar um aumento da apoptose de forma dose dependente na apoptose inicial (A), tardia (B) e total (C) . Todos os resultados foram expressos utilizando a média \pm desvio padrão.; * p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,0001.

4.3. Salamandrina-I não induz dano mitocondrial em linhagens HEL.

A fim de investigar o dano mitocondrial provocado pela Salamandrina-I, as células HEL foram previamente tratadas com Rodamina 123. A linhagem foi incubada com os IC25 e o IC50 encontrados para o peptídeo e posteriormente as amostras foram analisadas por

citometria de fluxo. Não observamos impacto significativo no potencial de membrana mitocondrial na presença do peptídeo nas doses de 21,66 μM (IC25) ($p=0.5931$) e 26,24 μM (IC50) ($p=0.3962$) (Figura 5).

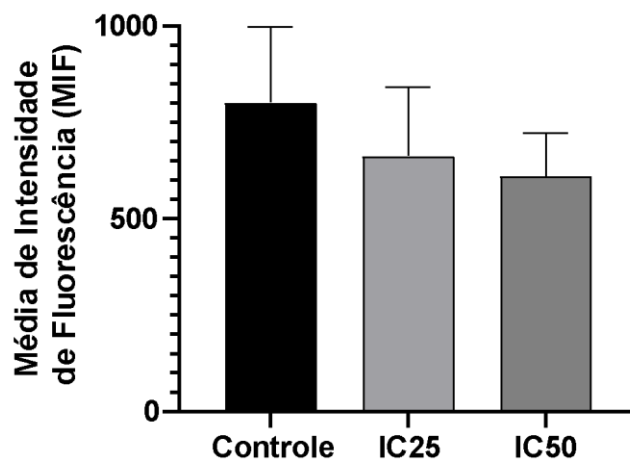


Figura 5. Dano mitocondrial induzido pela Salamandrina-I. Gráficos representando a média de intensidade de fluorescência (MIF) das células marcadas com Rod123 após tratamento com concentrações crescentes de Salamandrina-I por 48 horas.

4.4 Salamandrina-I promove liberação da Lactato Desidrogenase (LDH) pela linhagem HEL.

Para entender o impacto do peptídeo sobre a viabilidade celular da linhagem HEL, avaliamos a indução da liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) após tratamento com o IC25 (21,66 μM) ($p=0.0010$) e IC50 (26,24 μM) ($p=0.0007$) de Salamandrina-I. Observamos que nas células tratadas houve o aumento da liberação da enzima LDH, indicando que o peptídeo foi capaz de induzir a sua liberação de modo dose dependente (Figura 6).

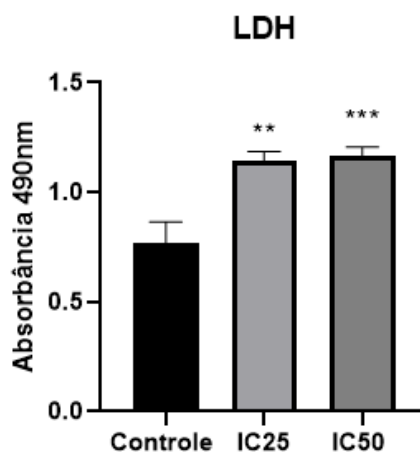


Figura 6: Indução da liberação de LDH pela Salamandrina-I. Células da linhagem HEL foram tratadas com IC25 e IC50 do peptídeo durante 48 horas e a quantidade de LDH liberada foi analisada por espectrofotometria. **p=0.0010 e ***p=0.0007

4.5 Salamandrina-I inibe a proliferação celular da linhagem HEL.

Para avaliar o impacto do peptídeo sobre a proliferação da linhagem HEL, as células HEL foram previamente marcadas com CFSE. A linhagem foi incubada com os IC25 e o IC50 encontrados para o peptídeo e posteriormente as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foi evidenciado um impacto na proliferação celular, evidenciado pela redução da proliferação celular na presença do peptídeo nas doses de 21,66 μM (IC25) (p=0.0215) e 26,24 μM (IC50) (p=0.0027) (Figura 7A).

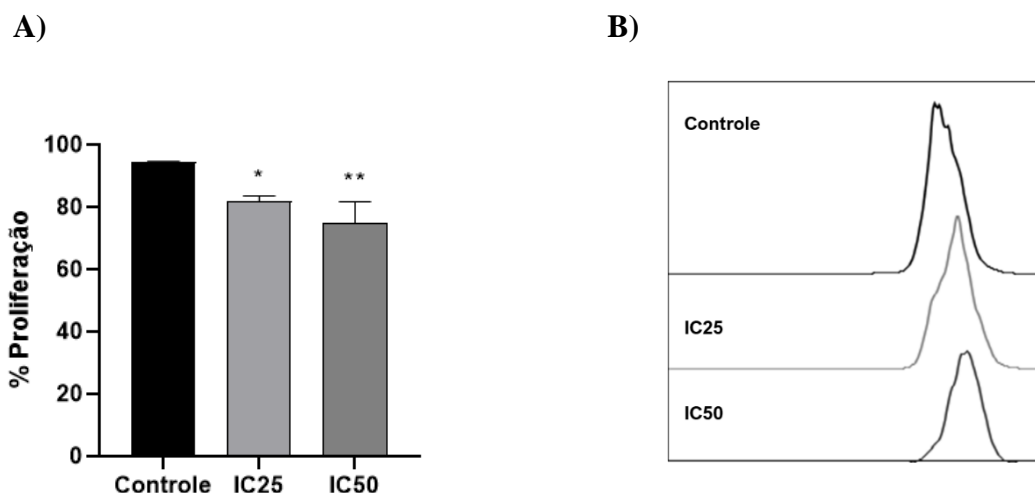


Figura 7. Capacidade antiproliferativa da Salamandrina-I em modelo de linhagem HEL. A) Os gráficos em barra mostram a taxa de proliferação celular na ausência de tratamento (grupo controle) e na presença do peptídeo (IC25 e IC50) e B) Histogramas representativos dos grupos controle, IC25 e IC50 mostrando a diminuição do sinal fluorescente emitido que é inversamente proporcional à taxa de proliferação celular. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$

4.6. Salamandrina-I inibe o ciclo celular da linhagem HEL.

Para entender o efeito provocado pelo peptídeo sobre o ciclo celular da linhagem HEL, foi realizado ensaio com a fixação de metanol gelado e posterior incubação com RNase e Iodeto de Propídeo (IP). Observamos que as células não tratadas possuíam uma distribuição elevada de células em fase G1 e G2 (Figura 8). Foi observado que na presença do IC25 e do IC50 houve um acúmulo de células na fase G1 (IC25 $p=0.0076$ e IC50 $p=0.0040$) e S (IC25 $p=0.0010$ e IC50 $p=0.0299$), bem como a diminuição da porcentagem de células na fase G2 (IC25 $p=0.0001$ e IC50 $p=0.0001$).

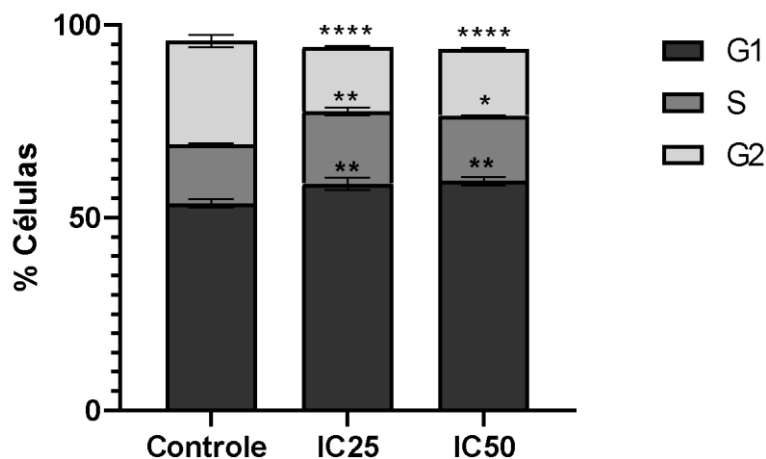
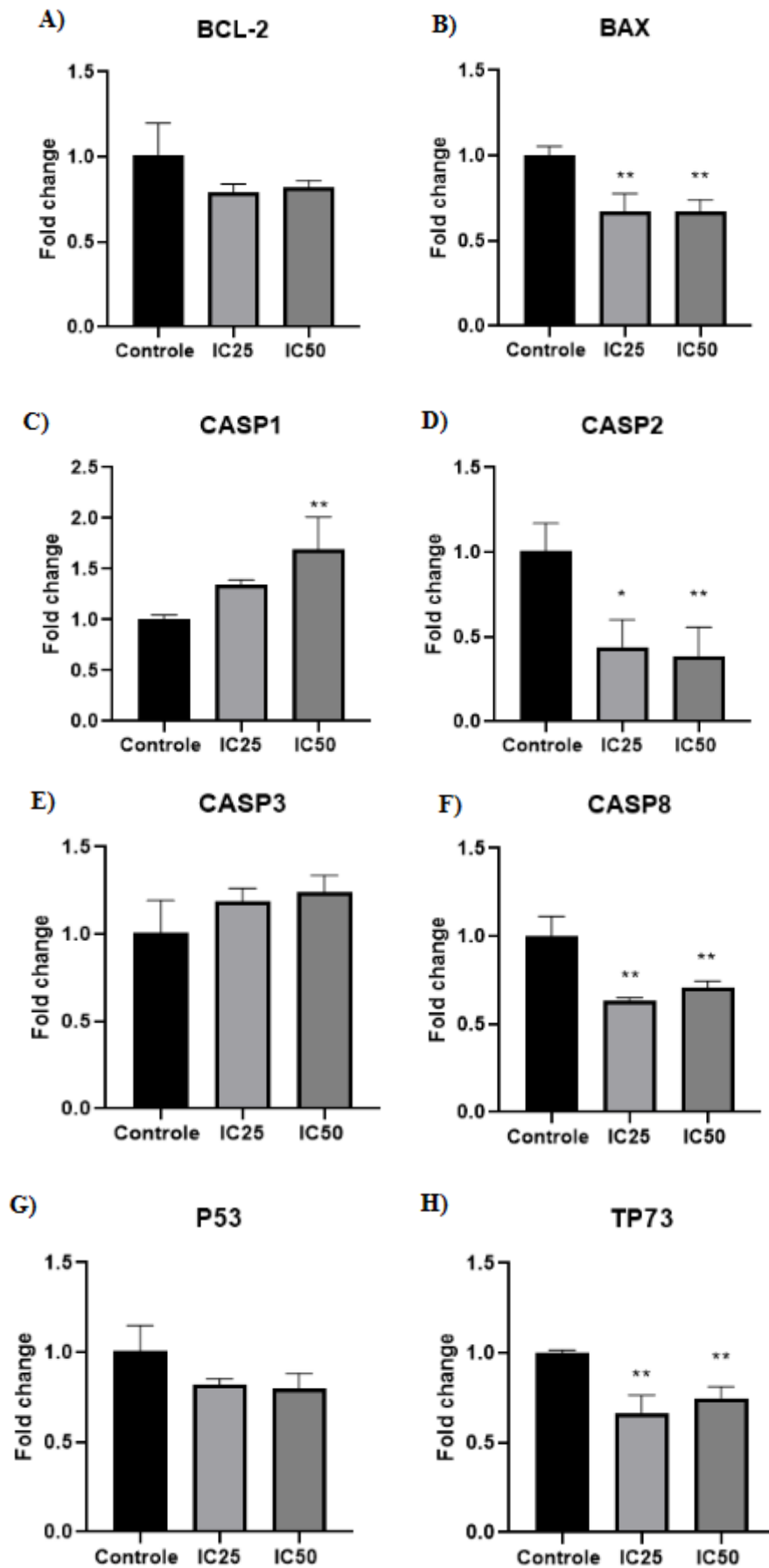


Figura 8. Impacto da Salamandrina - I sobre o ciclo celular das células HEL. Análise da variação da quantidade de DNA na linhagem HEL por citometria de fluxo, caracterizando as diferentes fases do ciclo celular. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

4.7. Modulação da expressão gênica pela Salamandrina-I.

Para entender os possíveis mecanismos envolvidos no processo de morte celular exercido pelo peptídeo, avaliamos a expressão de genes relacionados com morte e inflamação nas células HEL. De maneira geral, observamos que as células não tratadas possuíam uma expressão bem mais elevada de *BAX* (IC25 $p = 0.0054$ e IC50 $p = 0.0052$) (Figura 9B), *CASP-2* (IC25 $p = 0.0133$ e IC50 $p = 0.0087$) (Figura 9D), *CASP-8* (IC25 $p = 0.0012$ e IC50 $p = 0.0040$) (Figura 9F), *TP73* (IC25 $p = 0.0024$ e IC50 $p = 0.0097$) (Figura 9H), *Ki-67* (IC25 $p = 0.0063$ e IC50 $p = 0.0034$) (Figura 9I), *CDK1* (IC25 $p = 0.0063$ e IC50 $p = 0.0017$) (Figura 9J) e *GSDM-D* (IC25 $p = 0.0045$ e IC50 $p = 0.0039$) (Figura 9K) quando comparado com as células tratadas. Na presença da Salamandrina-I, observamos aumento da expressão de *CASP-1* (IC50 $p = 0.0093$) (Figura 9C) e *NLRP3* (IC25 $p = 0.0322$ e IC50 $p = 0.0015$) (Figura 9L). Não encontramos, entretanto, diferenças significativas na expressão de *BCL-2* (Figura 9A), *CASP-3* (Figura 9E) e *P53* (Figura 9G).



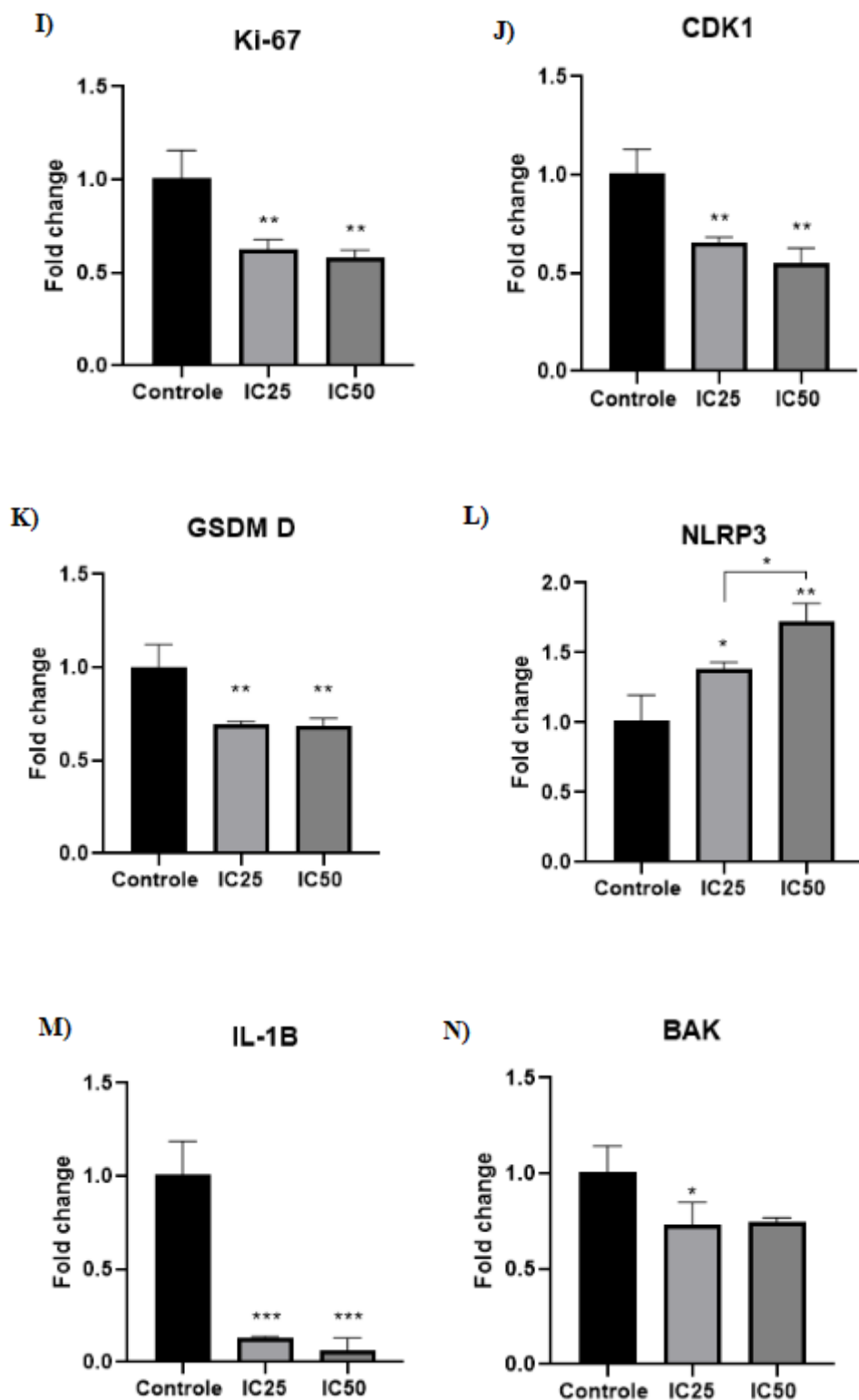


Figura 9. Influência da Salamandrina-I sobre os níveis de expressão gênica. Análise por PCR em tempo real da expressão dos genes BCL-2 (A), BAX (B), caspase 1 (C), caspase 2 (D), caspase 3 (E), caspase 8 (F), gene supressor de tumor 53 (G), proteína tumoral 73 (H), KI-67 (I), CDK1 (J),

gasdermina D (K), NLRP3 (L), interleucina 1 beta (M) e BAK (N) nas células HEL tratadas ou não com Salamandrina-I. O DDCt foi normalizado para cada alvo a partir do grupo HEL sem tratamento.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços na busca de efetivas terapias que proporcionem melhor condição de vida e sobrevida aos indivíduos afetados pelas leucemias, muitas das descobertas se tornaram pouco efetivas frente aos mecanismos de resistência apresentados pelas células cancerígenas e devido a toxicidade severa provocada ao paciente. Nesse contexto, peptídeos com propriedades anticâncer estão sendo explorados cientificamente como alternativa terapêutica ao câncer. A Salamandrina-I é um peptídeo antioxidante com efeito desconhecido sobre células cancerosas. Neste estudo, investigamos se esse peptídeo possui atividade anticâncer em um modelo celular de eritroleucemia.

A partir do ensaio de MTT, observamos que o peptídeo Salamandrina-I foi capaz de provocar uma redução na viabilidade celular da linhagem HEL, sendo este efeito mais expressivo nas concentrações de 25 μM , 50 μM e 100 μM . Resultados similares foram reportados por Ding *et al.*, (2020), que descreveram a atividade citotóxica de um polissacarídeo que possui propriedades antioxidantes sobre células HEL. De fato, diversos trabalhos têm mostrado a ação citotóxica de peptídeos sobre linhagens de leucemia, como é o caso do peptídeo boronato bortezomib (Velcade®), aprovado pelo governo americano, Food Drug Administration (FDA), para o tratamento de mieloma múltiplo e linfoma de células do manto (ZHANG *et al.*, 2019; MICALE *et al.*, 2014).

A determinação da enzima citoplasmática Lactato Desidrogenase (LDH) está intimamente relacionada com o dano celular e a apoptose (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018; JURISIC; RADENKOVIC; KONJEVIC, 2015). A partir do ensaio para a quantificação dessa enzima presente no sobrenadante das células, observamos que o peptídeo foi capaz de aumentar a liberação de LDH do meio intracelular para o extracelular (sobrenadante). Esse resultado evidencia que houve ruptura da membrana plasmática nas células tratadas e está de

acordo com o resultado de viabilidade celular obtido no MTT. LI *et al.*, (2022), reportaram semelhantes resultados de morte celular em diferentes linhagens de células tumorais a partir do peptídeo ppM1, o que também pôde ser caracterizado pela liberação sustentada de LDH pelas membranas danificadas (Li *et al.*, 2022).

Os mecanismos de Morte Celular Programada (MCP) variam a depender da modulação provocada sobre a célula e do tipo de dano causado. Dentre algumas das características e alterações morfológicas de células em processo de apoptose já bem esclarecidos, há a translocação da fosfatidilserina (SUZUKI.; IMANISHI; NAGATA, 2014; SEGAWA *et al.*, 2014; FADEEL *et al.*, 1999) e, assim como em outros processos, a apoptose celular pode ser modulada por agentes farmacológicos ou intervenções genéticas (GALLUZZI *et al.*, 2018; GALLUZZI *et al.*, 2016). Utilizando as doses IC₂₅ e IC₅₀ da Salamandrina-I, observamos que a linhagem HEL apresentava um aumento tanto nas taxas de apoptose inicial, quanto de apoptose tardia. Similarmente, Wu et al. (2018) observaram um aumento nas taxas de apoptose em um modelo celular de câncer de esôfago após exposição dessas células à hesperetina, que além de propriedades antioxidantes, possui função anti-inflamatória. (WU *et al.*, 2018). Outro importante achado morfológico em células em processo de apoptose envolve alterações funcionais ou estruturais da membrana mitocondrial (KROEMER, *et al.*, 2009; LEE, *et al.*, 2007). A mitocôndria é uma organela intracelular que possui importante papel na produção de energia celular, Adenosina Trifosfato (ATP), mediante a fosforilação oxidativa (LI, *et al.*, 2021). O gradiente de potencial da membrana mitocondrial ($\Delta \psi$) formado em sua porção interior é a chave para a ocorrência da fosforilação oxidativa e a produção basilar de energia para a célula e, devido a isso, o potencial da membrana mitocondrial tem sido utilizado como marcador da saúde celular ou evidenciador de mecanismos apoptóticos (GALLUZZI, *et al.*, 2018; BOYA; KROEMER, 2008). Após o tratamento, avaliamos por meio de uma sonda fluorescente que se acumula no interior de mitocôndrias ativas, Rod123, que a Salamandrina-I

não possui direto impacto sobre o potencial da membrana mitocondrial, o que nos direciona à ocorrência de outros mecanismos apoptóticos.

Sabe-se que a expressão de fosfatidilserina na porção extracelular está relacionada com a cascata de sinalização envolvendo as Caspases 1, 2, 3, 8 e 9 e já foram descritas para a linhagem HEL (DING *et al.*, 2020; JORGE *et al.*, 2020; LONG *et al.*, 2021). Surpreendentemente, observamos a diminuição da expressão das Caspases 2 e 8, bem como o aumento da expressão não validada de *CASP-3*, o que pode ser um forte indicativo de que essa não é a via mediadora da morte celular provocada pelo peptídeo. Nessa perspectiva, mediante ao tratamento da linhagem com as doses de IC25 e IC50 do peptídeo, observamos um aumento dose-dependente da expressão de *CASP-1*. O aumento da expressão desse gene pode estar relacionado com a ativação da cascata inflamatória que frequentemente está envolvida com o mecanismo de morte celular por piroptose, um mecanismo de morte que envolve a formação de poros na membrana dirigidos por proteínas da família gasderminas, bem como pode estar envolvido com o inflamassoma. Apesar de não termos observado um aumento da expressão gênica de Gasdermina D na presença do peptídeo, outros subtipos de gasderminas também parecem estar envolvidos no processo de piroptose. ZHANG *et al.*, (2020), demonstraram que o aumento da expressão de Gasdermina E (*GMDE*) está associado com a supressão tumoral pelo mecanismo de piroptose, em modelo de linhagem celular HeLa. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores validaram a ativação de *GMDE*, independentemente de caspases, pela sua clivagem a partir da granzima B das células NK (ZHANG *et al.*, 2020).

Wu *et al.*, (2018), também reportaram uma diminuição na taxa de proliferação e invasão dessas células no modelo de câncer de esôfago, possivelmente relacionada com a supressão da via *PI3K/AKT*. Da mesma forma, notamos uma diminuição da taxa de proliferação das células HEL de maneira dose-dependente após tratamento com a Salamandrina-I, indicando que esse peptídeo é capaz de afetar direta ou indiretamente o mecanismo de proliferação celular. Chao

et al. (2018) observaram que polissacarídeos com semelhantes ação antioxidante impactaram sobre a diferenciação e proliferação celular em modelo de leucemia monocítica aguda (ABDEL-MEGEED *et al.*, 2019). Similarmente, Siddiqui *et al.* (2019) obtiveram resultados de polissacarídeo antioxidante e seu impacto sobre a diferenciação celular em modelo celular de hepatocarcinoma.

Em condições fisiológicas o ciclo celular é finamente regulado e depende de sinais extracelulares que garantem a integridade, fidelidade e a ordem do processo de replicação e divisão celular (BARNUM; O'CONNELL, 2014; OLIVEIRA; SANTOS; FERNANDES, 2020). Dentre os marcadores desse processo, a proteína nuclear *Ki-67* desempenha múltiplas funções inerentes à proliferação e também é amplamente utilizada como seu biomarcador (PYO; KANG; SOHN, 2016). Durante a mitose, a proteína *Ki-67* possui importante papel na manutenção da camada pericromossômica e no acúmulo de RNAs pré-ribossômicos, bem como proteínas nucleares constitutivas a essa camada. Foi demonstrado que a depleção desse marcador está associada à diminuição da agregação de cromossomos mitóticos e a divisão assimétrica de material nuclear à células filhas formadas (HAYASHI; KATO; KIMURA, 2017; TAKAGI, *et al.*, 2016; BOOTH, *et al.*, 2014). Na presença da Salamandrina-I, observamos que essa proteína teve sua expressão negativamente regulada. SOBECKI *et al.*, (2017), demonstraram através dos seus estudos com diferentes modelos de linhagens que a diminuição da proliferação celular está relacionada com a diminuição da expressão de *Ki-67* (SOBECKI, *et al.*, 2017). Em concordância com esses resultados e com nossos achados do ensaio de proliferação celular, observamos ainda que a presença do peptídeo provocou diminuição da porcentagem de células em fase G2, evidenciando a diminuição do processo de divisão celular.

O ciclo celular em mamíferos é um processo finamente controlado por diversas proteínas que respondem tanto a sinais mitogênicos, quanto a danos ao DNA. Dentre elas, os

complexos formados pelas ciclinas e as Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são fundamentais no processo de proliferação, por regularem a progressão das células durante as diferentes fases do ciclo celular (OTTO; SICINSKI, 2017). A Quinase Dependente de Ciclina 1 (*CDK1*) possui essencial papel na modulação da transição das células em fase G2 para a fase M do ciclo celular e a concretização da mitose (MORGAN, 1995; VASSILEV, 2006). Observamos que ao tratarmos as células com Salamandrina-I houve significativa diminuição da expressão de *CDK1* pelas células HEL. A inibição da expressão de *CDK1* está associada à inibição da mitose e ao bloqueio da fase G2/M, pois *CDK1* é responsável pela coordenação bioquímica da mitose e permite a adaptação da síntese proteica à taxa de proliferação celular (HANEKE, *et al.*, 2020). Resultados similares foram reportados por HUANG *et al.*, (2012), que observaram em modelo *in vitro* de leucemia que a regulação negativa de *CDK1* está relacionada com o bloqueio da maturação celular na fase G2, impedindo que as células evoluam à fase M e o início da mitose (HUANG, *et al.*, 2011).

Apesar de ser conhecido como o “guardião do genoma”, o gene *P53* tem sido caracterizado como uma importante mutação presente em cânceres sólidos, porém também se encontra presente na linhagem de eritroleucemia HEL e em LMA com cariótipo complexo, e que está diretamente relacionado a um pior prognóstico da doença, pois se encontra desprovido de sua função (ZHAO *et al.*, 2012; FERBEYRE; LOWE, 2002). Em condições de normalidade celular, o *P53* está relacionado a mecanismos de supressão tumoral e é ativado por hipóxia, dano ao DNA, dano mitocondrial, ativação de oncogenes e estresse ribossomal (HAFNER, *et al.*, 2019). Outra isoforma já caracterizada da *P53* é a proteína *TP73*, que além de características estruturais compartilha também a capacidade de ativar os alvos do *P53* (BOTCHKAREV; FLORES, 2014). Portanto, apesar da elevação dos níveis de apoptose celular provocado pelo tratamento da Salamandrina-I e do bloqueio do ciclo celular em G2, não foi possível validar que o mecanismo pelo qual essas alterações ocorrem foi via *P53/TP73*.

O inflamassoma é um complexo de sinalização multiproteica responsável por controlar e coordenar a resposta inflamatória mediante a presença de patógenos e sinais de dano à célula ou a estruturas nela presente, como a mitocôndria (BROZ; DIXIT, 2016). A montagem desse complexo é mediada pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRR) por padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ou padrões moleculares associados ao perigo ou ao dano (DAMP). Dentre algumas das proteínas receptoras responsáveis pela formação do inflamassoma há a *NLRP3*, um membro da família de receptores do domínio de ligação a nucleotídeos (NOD), que responde a diversos tipos de estímulos e sinais relacionados a PAMP e DAMP, bem como está relacionado com mecanismo de piroptose e dano mitocondrial (KELLEY, *et al.*, 2019; BROZ; DIXIT, 2016; SHIMADA, *et al.*, 2012). Após tratamento com Salamandrina-I observamos o aumento da expressão gênica de *NLRP3*, o que sugere que o mecanismo de ação do peptídeo pode estar relacionado com a formação do complexo do inflamassoma. Alguns estudos demonstraram que a ativação do inflamassoma está relacionada com o aumento da ativação de caspases 1 e 8 (KETELUT-CARNEIRO, *et al.*, 2018; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Apesar de observamos o aumento de *CASP-1*, surpreendentemente observamos a modulação negativa de *CASP-8*, não observamos de igual modo a modulação positiva da expressão de *IL-1 β* . SIMPSON *et al.*, 2022, demonstrou em seu estudo que a ativação das proteínas pró apoptóticas *BAX* e *BAK* está relacionada com ação dirigida por caspase 8 (SIMPSON *et al.*, 2022). Após tratamento com o peptídeo, observamos a redução da expressão de *CASP-8* e concordantemente *BAX*, *BAK* e *BCL-2*. Esses dados nos sugerem que o mecanismo de morte celular provocado pelo peptídeo não está diretamente relacionado com esses alvos.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados, embora preliminares, demonstraram que o peptídeo Salamandrina-I possui impacto sobre a viabilidade celular da linhagem de eritroleucemia HEL, promovendo o gatilho para mecanismos de apoptose, bem como provocando a diminuição da proliferação celular, sendo assim uma molécula com propriedades desejadas para tratamento do câncer. Por meio dos resultados obtidos a partir dos ensaios funcionais realizados, ficou evidente que a morte celular provocada pelo peptídeo ocorre de maneira dose-dependente. Com base nos resultados obtidos, observamos que o peptídeo atua sobre essas células por meio da inibição da expressão de *CDK1* e *Ki-67*, resultando na diminuição da proliferação celular ao bloquear a entrada das células na fase G2 do ciclo celular. Por outro lado, também identificamos uma expressão elevada de *NLRP3* e *CASP1*, sugerindo uma possível ação sobre o inflamassoma, podendo ainda estar associado ao mecanismo de piroptose. A investigação da aplicabilidade deste peptídeo na terapia anticâncer necessita de estudos adicionais que validem estes resultados em modelo *in vivo*, de modo que esse bioativo possa apresentar significativa efetividade em modelos biológicos e baixa toxicidade a células saudáveis. Com base no conjunto de resultados obtidos, a Salamandrina-I pode ser uma ferramenta em potencial para o tratamento de eritroleucemia.

7.REFERÊNCIAS

ABDEL-MEGEED, R. M. et al. Regulation of apoptotic and inflammatory signaling pathways in hepatocellular carcinoma via Caesalpinia gilliesii galactomannan. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 451, n. 1, p. 173-184, 2019.

ALEXANDRES, C. et al. p53 immunohistochemistry discriminates between pure erythroid leukemia and reactive erythroid hyperplasia. **Journal of Hematopathology**, v. 14, n. 1, p. 15-22, 2021.

ALMEIDA, A. M. et al. Clinical outcomes of 217 patients with acute erythroleukemia according to treatment type and line: a retrospective multinational study. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 837, 2017.

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**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.

ARENILLAS, L. et al. Considering bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves the prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 27, p. 3284-3292, 2016.

BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. In: **Cell cycle control**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 29-40.

BODDU, P. et al. Erythroleukemia-historical perspectives and recent advances in diagnosis and management. **Blood reviews**, v. 32, n. 2, p. 96-105, 2018.

BOOTH, D. G. et al. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. **Elife**, v. 3, p. e01641, 2014.

BOTCHKAREV, V. A.; FLORES, E. R. p53/p63/p73 in the epidermis in health and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 8, p. a015248, 2014.

BOYA, P.; KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6434-6451, 2008.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407-420, 2016.

CALVO, X. et al. Erythroleukemia shares biological features and outcome with myelodysplastic syndromes with excess blasts: a rationale for its inclusion into future classifications of myelodysplastic syndromes. **Modern Pathology**, v. 29, n. 12, p. 1541-1551, 2016.

CERNAN, M.; SZOTKOWSKI, T.; PIKALOVA, Z. Mixed-phenotype acute leukemia: state-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc**, v. 161, n. 3, 2017.

CHAO, T. L. et al. Anti-cancerous effect of inonotus taiwanensis polysaccharide extract on human acute monocytic leukemia cells through ROS-independent intrinsic mitochondrial pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 393, 2018.

CHEN, Y. F. et al. The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 112, p. 21-30, 2017.

CORNELISSEN, J. J.; BLAISE, D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 1, p. 62-70, 2016.

DING, H. M. et al. Effect of Sargassum fusiforme polysaccharide on apoptosis and its possible mechanism in human erythroleukemia cells. **Chinese journal of natural medicines**, v. 18, n. 10, p. 749-759, 2020.

DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. **Cancer letters**, v. 327, n. 1-2, p. 26-47, 2012.

DONG, C.; ZHANG, N. J.; ZHANG, L. J. Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment. **Chinese Medical Journal**, v. 134, n. 16, p. 1897-1907, 2021.

EMONS, G.; GRÜNDKER, C. The role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in endometrial cancer. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 292, 2021.

FADEEL, B. et al. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 266, n. 2, p. 504-511, 1999.

FAGNAN, A. et al. Molecular Landscapes and Models of Acute Erythroleukemia. **Hemasphere**, v. 5, n. 5, 2021.

FAN, Y. et al. Thymopentin (TP5), an immunomodulatory peptide, suppresses proliferation and induces differentiation in HL-60 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 10, p. 1059-1066, 2006.

FANG, X. et al. Plant cyclopeptide RA-V kills human breast cancer cells by inducing mitochondria-mediated apoptosis through blocking PDK1–AKT interaction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 267, n. 1, p. 95-103, 2013.

FERBEYRE, G.; LOWE, S. W. The price of tumour suppression?. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 26-27, 2002.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GALLUZZI, L. et al. Regulated cell death and adaptive stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 2405-2410, 2016.

GREAVES, M. F.; SIEFF, C.; EDWARDS, P. A. W. Monoclonal antiglycophorin as a probe for erythroleukemias. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 61, n. 4, p. 645-651, 1983.

GRIMWADE, D.; IVEY, A.; HUNTLY, B. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 1, p. 29-41, 2016.

GROSSMANN, V. et al. Acute erythroid leukemia (AEL) can be separated into distinct prognostic subsets based on cytogenetic and molecular genetic characteristics. **Leukemia**, v. 27, n. 9, p. 1940-1943, 2013.

GRÜNDKER, C.; EMONS, G. Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2003.

HAFNER, A. et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 4, p. 199-210, 2019.

HANEKE, K. et al. CDK1 couples proliferation with protein synthesis. **Journal of Cell Biology**, v. 219, n. 3, 2020.

HAYASHI, Y.; KATO, K.; KIMURA, K. The hierarchical structure of the perichromosomal layer comprises Ki67, ribosomal RNAs, and nucleolar proteins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 493, n. 2, p. 1043-1049, 2017.

HEUSER, M. et al. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 6, p. 697-712, 2020.

HUANG, S. et al. The novel synthesized 2-(3-(methylamino) phenyl)-6-(pyrrolidin-1-yl) quinolin-4-one (Smh-3) compound induces G2/M phase arrest and mitochondrial-dependent apoptotic cell death through inhibition of CDK1 and AKT activity in HL-60 human leukemia cells. **International journal of oncology**, v. 38, n. 5, p. 1357-1364, 2011.

JANNET, S.B. et al. Antioxidant and selective anticancer activities of two Euphorbia species in human acute myeloid leukemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 375-385, 2017.

JORGE, J. et al. Apoptosis induction and cell cycle arrest of pladienolide B in erythroleukemia cell lines. **Investigational New Drugs**, v. 38, n. 2, p. 369-377, 2020.

JURISIC, V.; RADENKOVIC, S.; KONJEVIC, G. The actual role of LDH as tumor marker, biochemical and clinical aspects. **Advances in Cancer Biomarkers**, p. 115-124, 2015.

KANTARJIAN, H. et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 106, n. 8, p. 1794-1803, 2006.

KETELUT-CARNEIRO, N. et al. A dectin-1-caspase-8 pathway licenses canonical caspase-1 inflammasome activation and interleukin-1 β release in response to a pathogenic fungus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 2, p. 329-339, 2018.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, 2019.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death & differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095497, 2018.

KYOUNG A. et al. Pro-apoptotic peptides-based cancer therapies: Challenges and strategies to enhance therapeutic efficacy. **Archives of pharmacal research**, v. 41, n. 6, p. 594-616, 2018.

LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2700-2707, 2018.

LEE, S.; XIE, J.; CHEN, X. Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis. **Chemical reviews**, v. 110, n. 5, p. 3087-3111, 2010.

LEE, S. et al. Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 357, n. 1, p. 111-117, 2007.

LEE, W. Y.; WEINBERG, O. K.; PINKUS, G. S. GATA1 is a sensitive and specific nuclear marker for erythroid and megakaryocytic lineages. **American journal of clinical pathology**, v. 147, n. 4, p. 420-426, 2017.

LIN, B. et al. Membrane-Activated fluorescent probe for High-Fidelity imaging of mitochondrial membrane potential. **ACS sensors**, v. 6, n. 11, p. 4009-4018, 2021.

LI, T. et al. A short peptide derived from the gN helix domain of FGF8b suppresses the growth of human prostate cancer cells. **Cancer letters**, v. 339, n. 2, p. 226-236, 2013.

LI, H. et al. Poroptosis: A form of cell death depending on plasma membrane nanopores formation. **Iscience**, v. 25, n. 6, p. 104481, 2022.

LIU, W. et al. Pure erythroid leukemia: a reassessment of the entity using the 2008 World Health Organization classification. **Modern Pathology**, v. 24, n. 3, p. 375-383, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**. v.25, n.4, p.402–408, 2001.

LONG, Q. et al. L20, a Calothrixin B analog, induces intrinsic apoptosis on HEL cells through ROS/ γ -H2AX/p38 MAPK pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111336, 2021. **(Esse artigo demonstra o mecanismo de apoptose intrínseca- mitocondria-dependente da HEL)***

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . **Molecular cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.

MARTINS, S. L. R.; FALCÃO, Roberto Passetto. A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 57-62, 2000.

MICALE, N. et al. Peptide-Based Proteasome Inhibitors in Anticancer Drug Design. **Medicinal research reviews**, v. 34, n. 5, p. 1001-1069, 2014.

MORGAN, D. O. Principles of CDK regulation. **Nature**, v. 374, n. 6518, p. 131-134, 1995.

MURUGAIYAN, G.; SAHA, B. IL-27 in tumor immunity and immunotherapy. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 2, p. 108-116, 2013.

NAEIM, F.; RAO, P. N. Acute Myeloid Leukemia. In: NAEIM, F. et al., **Atlas of Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches**. 2. ed. Waltham: Academic Press, 2009, p. 207.

NAMVAR, F. et al. Apoptosis induction in human leukemia cell lines by gold nanoparticles synthesized using the green biosynthetic approach. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015.

NAPOLITANO, R. et al. Kevetrin induces apoptosis in TP53 wild-type and mutant acute myeloid leukemia cells. **Oncology reports**, v. 44, n. 4, p. 1561-1573, 2020.

NAVARRETE-MENESES, M. D. P. PÉREZ-VERA, P. Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. **Boletín Médico Del Hospital Infantil de México** (English Edition), v. 74, n. 4, p. 243-264, 2017. mutant acute myeloid leukemia cells. **Oncology reports**, v. 44, n. 4, p. 1561-1573, 2020.

NAVRKALOVA, Veronika et al. Oxidative stress as a therapeutic perspective for ATM-deficient chronic lymphocytic leukemia patients. **haematologica**, v. 100, n. 8, p. 994, 2015.

OLIVEIRA, J. M. P. F.; SANTOS, C.; FERNANDES, E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. **Phytomedicine**, v. 73, p. 152887, 2020.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93-115, 2017.

PELCOVITS, A.; NIROULA, R. Acute myeloid leukemia: a review. **Rhode Island Medical Journal**, v. 103, n. 3, p. 38-40, 2020.

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

PLÁCIDO, A. et al. The antioxidant peptide salamandrin-I: first bioactive peptide identified from skin secretion of Salamandra genus (*Salamandra salamandra*). **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 512, 2020.

PYO, J.; KANG, G.; SOHN, J. Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis. **The International journal of biological markers**, v. 31, n. 2, p. 204-210, 2016.

RAJA, T. et al. Gonadotropin-releasing hormone agonists in prostate cancer: A comparative review of efficacy and safety. **Indian Journal of Cancer**, v. 59, n. 5, p. 142, 2022.

SANTOS, F. P. S; BUESO-RAMOS, C. E.; RAVANDI, F.. Acute erythroleukemia: diagnosis and management. **Expert review of hematology**, v. 3, n. 6, p. 705-718, 2010.

SCHWARTZ, S. O.; CRITCHLOW, J. Erythremic myelosis (Di Guglielmo's disease) Critical review with report of four cases, and comments on erythroleukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 7, n. 8, p. 765-793, 1952.

SEGAWA, K. et al. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. **Science**, v. 344, n. 6188, p. 1164-1168, 2014.

SIDDIQUI, S. et al. Cytostatic and anti-tumor potential of Ajwa date pulp against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

SIMPSON, D. S. et al. Interferon- γ primes macrophages for pathogen ligand-induced killing via a caspase-8 and mitochondrial cell death pathway. **Immunity**, v. 55, n. 3, p. 423-441. e9, 2022.

SHIMADA, K. et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 401-414, 2012.

SOBECKI, M. et al. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. **Cancer research**, v. 77, n. 10, p. 2722-2734, 2017.

SUN, J. et al. A novel mouse CD133 binding-peptide screened by phage display inhibits cancer cell motility in vitro. **Clinical & experimental metastasis**, v. 29, n. 3, p. 185-196, 2012.

SUZUKI, J.; IMANISHI, E.; NAGATA, S. Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30257-30267, 2014.

TAKAGI, M. et al. Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. **Genes to Cells**, v. 21, n. 10, p. 1113-1124, 2016.

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, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 114, n. 5, p. 937-951, 2009.

VASSILEV, L. T. Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. **Cell cycle**, v. 5, n. 22, p. 2555-2556, 2006.

WANG, K. et al. Membrane active antimicrobial activity and molecular dynamics study of a novel cationic antimicrobial peptide polybia-MPI, from the venom of *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 39, p. 80-88, 2013.

WANG, W. et al. Pure erythroid leukemia. **American journal of hematology**, v. 92, n. 3, p. 292-296, 2017.

WEINBERG, O. K.; ARBER, D. A. Erythroleukemia: an Update. **Current oncology reports**, v. 23, n. 6, p. 1-7, 2021.

WU, D. et al. Hesperetin inhibits Eca-109 cell proliferation and invasion by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway and synergistically enhances the anti-tumor effect of 5-fluorouracil on esophageal cancer in vitro and in vivo. **RSC advances**, v. 8, n. 43, p. 24434-24443, 2018.

WU, D. et al. Anti-tumor effects of a novel chimeric peptide on S180 and H22 xenografts bearing nude mice. **Peptides**, v. 31, n. 5, p. 850-864, 2010.

ZHANG, Z. et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. **Nature**, v. 579, n. 7799, p. 415-420, 2020.

ZHAO, W. et al. JAK2V617F and p53 mutations coexist in erythroleukemia and megakaryoblastic leukemic cell lines. **Experimental hematology & oncology**, v. 1, p. 1-6, 2012.