

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Isolamento e caracterização funcional e estrutural de  
compostos antitumorais de baixo peso molecular  
da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu***

**Gabriel Neves Cezarete**

**Ribeirão Preto  
2022**

**GABRIEL NEVES CEZARETTE**

**Isolamento e caracterização funcional e estrutural de compostos  
antitumorais de baixo peso molecular  
da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientador(a):** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Vilela

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 23/06/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto  
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Neves Cezarette, Gabriel

Isolamento e caracterização funcional e estrutural de compostos antitumorais de baixo peso molecular da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*. Ribeirão Preto, 2022.

80 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Vilela, Suely

- |                          |                    |
|--------------------------|--------------------|
| 1. Atividade antitumoral | 2. Citotoxicidade  |
| 3. Peptídeos             | 4. <i>Bothrops</i> |

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome do autor: Gabriel Neves Cezarette

Título do trabalho: Isolamento e caracterização funcional e estrutural de compostos antitumorais de baixo peso molecular da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

# Agradecimento

Agradeço e dedico este trabalho,

A Deus, pelos dons que me concede para enfrentar os desafios,

Aos meus pais, Antônio e Sueli, pela formação humana, baseada em princípios e atenção ao próximo,

Ao meu irmão Thiago, minha cunhada Flávia, e minha tia e madrinha Sílvia, pela alegria que tenho em voltar todos os finais de semana e me sentir em família,

À minha prima, e irmã, Maria Luísa, por ser a nossa bebê, que eu tenho muito orgulho de ser padrinho e exemplo,

Aos meus irmãos Leonardo, Evandro e Angelo, pelos anos de amizade e suporte, com a certeza de que virão ainda muitos outros,

A minha família Cezarette, que tenho a honra de levar como meu nome científico,

À minha avó Helena, e em memória de meus avós Oswaldo, Maria Aparecida e Anésio, por serem os pilares de uma família de honesta, trabalhadora e amorosa,

À família de minha companheira, por todo o amor e carinho com que me receberam,

À minha família construída em Ribeirão Preto, Gabriel Burgareli, Igor, Rebeca, Giovanna F., Giovana T., Isabela e Juliana. É impossível me imaginar na Fármacia, se não com vocês,

Ao Theodoro, meu pequeno companheiro de todas as horas, por me despertar o amor mais puro que é possível se ter,

E finalmente Maria, minha companheira de vida, minha sustentação. Sem seu apoio, desde o começo da minha trajetória, nada disso teria sido construído.

Aos meus colegas de trabalho, de hoje e de ontem, Bruna, Gabriela, Thiago, Adélia e Franco, pela amizade, parceria e conhecimento compartilhado. Este trabalho é uma vitória da nossa equipe,

Aos professores e alunos de outros laboratórios que colaboraram com o desenvolvimento deste projeto, Juliana, Emerson, Alexandre, Ana Rita, Eduardo, Vinicius, Jacqueline, e Isadora, nada disso seria feito, ao menos tão bem, quanto foi com a ajuda de vocês,

À Rose do Serviço de Pós Graduação, pela paciência e carinho em me ajudar nesta nova fase,

Ao Marco Aurélio Sartim, que foi a fonte de todo o conhecimento que aqui trago,

E à minha orientadora, Suely Vilela, pelos anos de suporte e formação científica,

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo CNPq processo PQ2018 - n. 305282/2018-2 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 2020/03674-6.

**Obrigado,**

**Somos maior,  
nos basta só  
sonhar,  
seguir.**

*Israel Feliciano  
e  
Leandro Roque de Oliveira*

## RESUMO

NEVES CEZARETTE, G. **Isolamento e caracterização funcional e estrutural de compostos antitumorais de baixo peso molecular da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu***. 2022. 80p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2022.

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de compostos biologicamente ativos, dentre esses, ainda pouco explorados, estão os compostos de baixo peso molecular, como os peptídeos, componentes orgânicos e lipídeos. Estas moléculas possuem atividade farmacológica diversificada, e vêm apresentando crescente interesse científico acerca do seu potencial como agente anticâncer. Embora haja diversos relatos de peptídeos de classes que possuem conhecida atividade antitumoral nesta peçonha, estes nunca foram efetivamente isolados. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo isolar compostos de baixo peso molecular da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, que apresentem ação antitumoral, em uma abordagem que considera efeitos farmacológicos diretos ou mediados por vias biológicas, e se incluem nos aspectos mais atuais de compreensão da tumorigenese e sua terapêutica. A estratégia de bioprospecção destes compostos se utilizou de diferentes linhagens tumorais, a saber: hepatocarcinoma celular (HepG2), carcinoma de próstata (DU-145), carcinoma de pulmão (A549) e adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), para a identificação das atividades citotóxicas, e mecanismos de inibição da tumorigenese *in vitro* não citotóxicos, como a modulação da migração e proliferação celular. A peçonha bruta foi ultrafiltrada em membranas específicas, isolando os compostos de baixa massa molecular, e este pool fracionado por cromatografia de exclusão molecular. As moléculas bioativas destas frações foram identificadas através de ensaios biológicos *in vitro*, e purificadas por cromatografia em fase reversa. Os resultados deste trabalho identificaram quatro compostos com atividade citotóxica, nomeados Js II-I; Js III-I; Js IV-II e Js VI-I, sendo capazes de induzir um aumento nas taxas de apoptose e/ou autofagia, além de reduzir a sobrevivência das células expostas ao seu tratamento. Js III-I, o composto que apresentou maior potencial citotóxico, teve seus mecanismos de ação investigados, onde se mostrou capaz de induzir o processo de apoptose por meio da ativação das vias gênicas BAX, BCL-2 e FAS, e ativação das enzimas da via intrínseca de apoptose (Caspase-3 e -9). Os compostos bioativos foram caracterizados estruturalmente por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, e sua toxicidade às células normais humanas foi investigada pelo ensaio de MTT em células mononucleares de sangue periférico e pela atividade hemolítica, tendo todos os compostos bioativos se apresentado livres de ação tóxica. Os resultados descritos neste trabalho são inéditos, pois se tratam dos primeiros relatos do isolamento e caracterização funcional de compostos de baixo peso molecular com ação antitumoral na peçonha da serpente *B. jararacussu*, e contribuem com a identificação de quatro novos compostos com potencial para serem utilizados em estudos de desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Atividade antitumoral, citotoxicidade, peptídeos, *Bothrops*

## ABSTRACT

NEVES CEZARETTE, G. **Isolation and functional and structural characterization of antitumoral compounds with low molecular mass of *Bothrops jararacussu* snake venom.** 2022. 80p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Snake venoms are complex mixtures of biological active compounds, among them, still little explored, the low molecular weight compounds such as peptides, organic components and lipids. These molecules have diversified pharmacological activity, and are showing increasing scientific interest about their potential to be an anticancer agent. Although there are several reports of peptides from classes with a well-known antitumor activity in this venom, these have never been effectively isolated. In this way, the present study aimed to isolate the low molecular weight of the *Bothrops jararacussu* snake venom, which presents an antitumor action, in an approach that considers direct pharmacological or mediated by biological pathways, and are included in the most current aspects of understanding tumorigenesis and its therapy. The bioprospecting strategy for these compounds used different tumor cell lines, such as cellular hepatocarcinoma (HepG2), prostate carcinoma (DU-145), lung carcinoma (A549), and breast adenocarcinoma (MDA-MB-231), for the identification of cytotoxic activities, and non-cytotoxic *in vitro* tumorigenesis inhibition mechanisms, such as the modulation of cell migration and proliferation. The crude venom was ultrafiltered in specific membranes, isolating the low molecular weight compounds, and this pool was fractionated by molecular exclusion chromatography. The bioactive molecules of these fractions were identified through *in vitro* biological assays, and purified by reversed-phase chromatography. The results of this project identified four compounds with cytotoxic activity, named Js II-I; Js III-I; Js IV-II; and Js VI-I, being able to induce an increase in apoptosis and/or autophagy rates, in addition to reducing the survival of cells exposed to its treatment. Js III-I, the compound that presented the highest cytotoxic potential, had its mechanisms of action investigated, where it was shown to be able to induce the apoptosis process through the activation of the BAX, BCL-2 and FAS gene pathways, and activation of the enzymes of the intrinsic pathway of apoptosis (Caspase-3 and -9). The bioactive compounds were structurally characterized by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance, and their toxicity to normal human cells was investigated by MTT assay in peripheral blood mononuclear cells and by hemolytic activity, being observed no toxic action for any of these compounds. The results described in this work have an unprecedented character, as they are the first reports of the isolation and functional characterization of low molecular weight compounds with antitumor action in the venom of the snake *B. jararacussu*, and contribute to the identification of four new compounds with potential for be used in studies of the development of new drugs.

Keywords: Antitumoral activity, cytotoxicity, peptides, *Bothrops*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>The Hallmarks of cancer</i> (As marcas registradas do câncer) .....	02
Figura 2. Fracionamento dos componentes de massa inferior a 5 kDa da peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> em cromatografia de exclusão molecular e perfil eletroforético das frações .....	35
Figura 3. Fracionamento dos componentes de massa entre 5 e 10 kDa da peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> em cromatografia de exclusão molecular e perfil eletroforético das frações .....	36
Figura 4. Atividade citotóxica das frações com compostos de até 5 kDa .....	40
Figura 5. Atividade citotóxica das frações com compostos de 5 a 10 kDa .....	41
Figura 6. Isolamento dos compostos das frações ativas .....	42
Figura 7. Atividade citotóxica dos compostos isolados da fração Js-II .....	43
Figura 8. Atividade citotóxica das subfrações isoladas da fração Js-III .....	43
Figura 9. Atividade citotóxica das subfrações isolados da fração Js-IV.....	45
Figura 10. Atividade citotóxica das subfrações isolados da fração Js-VI .....	46
Figura 11. Cromatografia dos compostos com atividade citotóxica .....	48
Figura 12. Curvas de dose x resposta dos compostos ativos nas linhagens testadas .....	49
Figura 13. Análise dos níveis de apoptose/necrose em células HepG2 dos compostos ativos .....	52
Figura 14. Avaliação da indução de autofagia em células HepG2 pelos compostos citotóxicos .....	53
Figura 15. Influência dos compostos citotóxicos na migração celular de células HepG2 .....	55
Figura 16. Banco de imagens do ensaio de <i>Wound healing</i> com os compostos citotóxicos .....	56
Figura 17. Influência dos compostos citotóxicos na proliferação celular de células HepG2 .....	57
Figura 18. Banco de imagens do ensaio de sobrevivência clonogênica com os compostos citotóxicos .....	58
Figura 19. Perfil de expressão dos genes FAS, BAX e BCL2 por PCR em tempo real em HepG2 .....	59

Figura 20. Perfil de expressão das caspases 3, 8 e 9 das células HepG2 por <i>Western blot</i> .....	61
Figura 21. Atividade citotóxica dos compostos ativos em células normais (PBMC) .....	63
Figura 22. Atividade hemolítica dos compostos bioativos .....	64
Figura 23. Espectros de massas dos compostos ativos no modo ESI <sup>+</sup> .....	65
Figura 24. Espectro <sup>1</sup> H de RMN do composto citotóxico Js III-I .....	68
Figura 25. Espectro <sup>13</sup> C-APT de RMN do composto citotóxico Js III-I .....	69
Figura 26. Espectro HSQC de RMN do composto citotóxico Js III-I .....	70

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Drogas candidatas a terapia de inibição alvo das proteínas da família BCL-2 .....	05
Tabela 2 – Resultados da prospecção da atividade citotóxica das frações peptídicas .....	47
Tabela 3 – Sinais observados nos espectros de RMN .....	71

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

µg	Microgramas
µL	Microlitros
<sup>13</sup> C	Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono
<sup>1</sup> H	Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ACN	Acetonitrila
ACP	Peptídeos anticancer
ACTB	Beta actina
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de Variância
Anx	Anexina V
APT	<i>Attached próton test</i>
ATCC	<i>American culture type collection</i>
BAK	<i>BCL2 antagonist killer protein</i>
BAX	<i>BCL2 associated protein X</i>
BCA	Ácido bicinchonínico
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2 gene</i>
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BPP	Peptídeo potencializador de bradicinina
CATH	Catelicidinas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CN	Controle negativo
C-Nat	Peptídeos natriuréticos do tipo C
CP	Controle positivo
DMEM	Meio de cultura " <i>Dulbbelco's modified essential medium</i> "
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECM	Matriz extra celular
EPM	Erro padrão da média
ESI	Fonte de ionização do tipo <i>electrospray</i>

FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Horas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolts
M	Molar
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MHz	Mega hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanometros
°C	Grau Celsius
<i>p/p</i>	Peso/peso
PBS	Solução salina tamponada com fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
ppm	Parte por milhão
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma protein</i>
RAS	Sistema Renina-Angiotensina
RGD	Arginina – Glicina – Aspartato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto

RPMI	Meio de Cultura “ <i>Roswell park memorial institute medium</i> ”
RTK	Receptores transmembrana do tipo tirosina quinase
RT-PCR	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
s	Segundos
SBF	Soro bovino fetal
SD	Desvio padrão
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time of flight</i>
v/v	Volume/volume

## SUMÁRIO

<b>Resumo do Projeto</b>	i
<b>Abstract</b>	ii
<b>Lista de figuras</b>	iii
<b>Lista de tabelas</b>	v
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	vi
<b>1. Introdução</b> .....	<b>01</b>
1.1. Câncer: Perspectivas atuais de incidência .....	01
1.2. Busca por novas moléculas anticâncer .....	02
1.3. Compostos de baixo peso molecular das peçonhas de serpentes .....	10
1.4. Isolamento e caracterização de compostos de baixo peso molecular em peçonhas de serpentes com ação antitumoral .....	11
1.4.1. Peptídeos potencializadores de bradiginina (BPPs) .....	11
1.4.2. Peptídeos anticâncer .....	13
1.4.2.1. Catelicidinas .....	14
1.4.2.2. Defensinas .....	16
1.4.2.3. Waprininas .....	17
1.4.2.4. Desintegrinas .....	18
1.4.2.5. Compostos orgânicos e derivados de peptídeos .....	21
1.5. Justificativa .....	21
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
2.1. Objetivo Geral .....	22
a. Objetivos Analíticos .....	22
b. Objetivos Funcionais .....	22
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>23</b>
3.1. Materiais .....	23
3.1.1. Peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	23
3.1.2. Linhagens celulares .....	23
3.1.3. Extração dos compostos do sangue total (leucócitos e hemácias) .....	23
3.1.4. Controle das culturas de células .....	24

<b>3.2. Métodos.....</b>	<b>24</b>
3.2.1. Isolamento e identificação dos compostos com atividade antitumoral .....	24
3.2.1.1. Ultrafiltração em membrana .....	24
3.2.1.2. Cromatografia de exclusão molecular .....	25
3.2.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	25
3.2.1.4. Cromatografia de fase reversa em coluna C18 .....	26
3.2.1.5. Cromatografia dos compostos ativos em coluna de fase reversa. ....	26
3.2.2. Quantificação das amostras .....	26
3.2.3. Identificação dos compostos com atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	27
3.2.3.1. Determinação da viabilidade celular pela redução do MTT .....	27
3.2.3.2. Determinação do índice de concentração inibitória 50% (IC <sub>50</sub> ) dos compostos ativos.....	27
3.2.3.3. Análise da indução de apoptose/necrose pelos compostos citotóxicos .....	28
3.2.3.4. Avaliação da indução de autofagia.....	28
3.2.4. Caracterização de mecanismos antitumorais não citotóxicos .....	29
3.2.4.1. Ensaio de Migração Celular ( <i>Wound Healing</i> ).....	29
3.2.4.2. Ensaio de Proliferação Celular (Sobrevivência Clonogênica) .....	31
3.2.5. Identificação estrutural dos compostos bioativos .....	31
3.2.5.1. Espectrometria de massas em analisador do tipo <i>electrospray</i> .....	31
3.2.5.2. Ressonância magnética nuclear .....	31
3.2.6. Avaliação da toxicidade dos compostos bioativos em células normais .....	31
3.2.6.1. Citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ...	31
3.2.6.2. Atividade hemolítica .....	32
3.2.7. Avaliação toxicogenômica .....	32
3.2.7.1. Análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	32
3.2.7.2. Detecção das caspases por <i>Western blot</i> .....	33
3.3. Análise estatística .....	33
<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>34</b>
4.1. Isolamento de compostos de baixa massa molecular .....	34
4.1.1. Ultrafiltração, cromatografia de exclusão molecular e SDS-PAGE das frações contendo compostos de até 5 kDa.....	34
4.1.2. Ultrafiltração, cromatografia de exclusão molecular e SDS-PAGE das frações peptídicas de até 5 kDa.....	36

4.2. Prospecção dos compostos com atividade antitumoral.....	37
4.2.1. Prospecção dos compostos citotóxicos.....	40
4.2.1.1. <i>Screening</i> da atividade das frações peptídicas de até 5 kDa.....	40
4.2.1.2. <i>Screening</i> da atividade das frações peptídicas de 5 a 10 kDa.....	41
4.2.2. Isolamento e identificação dos compostos com atividade citotóxica .....	42
4.2.2.1. Fração II .....	43
4.2.2.2. Fração III .....	44
4.2.2.3. Fração IV .....	45
4.2.2.4. Fração VI.....	46
4.2.2.5. Compostos citotóxicos e suas atividades nas linhagens tumorais .....	46
4.2.2.6. Cromatografia das subfrações ativas .....	48
4.2.3. Caracterização funcional dos compostos citotóxicos .....	49
4.2.3.1. Elaboração de curvas Dose x Resposta e determinação do IC <sub>50</sub> .....	49
4.2.3.2. Análise da indução de apoptose/necrose pelos compostos ativos .....	51
4.2.3.3. Avaliação da indução de autofagia.....	53
4.2.3.4. Ensaio de migração celular ( <i>Wound Healing</i> ) dos compostos citotóxicos....	55
4.2.3.5. Avaliação da proliferação celular (Sobrevivência Clonogênica) dos compostos citotóxicos .....	57
4.2.4. Ensaios de toxicogenômica.....	59
4.2.4.1. Avaliação das vias gênicas de morte celular induzida por Js III-I.....	59
4.2.4.2. Detecção da expressão proteica por <i>Western blot</i> .....	61
4.3. Avaliação da toxicidade dos compostos ativos .....	63
4.3.1. Atividade citotóxica dos compostos ativos sob células normais (PBMC) .....	63
4.3.2. Atividade hemolítica .....	64
4.4. Caracterização estrutural dos compostos bioativos .....	65
4.4.1. Espectrometria de Massas (ESI-MS) .....	65
4.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	68
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>72</b>
<b>6. Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>73</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO(S).....</b>	<b>83</b>

## **1. Introdução**

### **1.1. Câncer: Perspectivas atuais de incidência**

O câncer é uma das doenças de maior incidência, morbidade e mortalidade, em todo o mundo (SUNG et al., 2021). Cientificamente, câncer se refere ao termo neoplasia, uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células mutadas, normalmente, menos especializadas e ineficazes em suas funções em relação às células naturais do tecido. Os danos causados pelas células cancerosas estão associados à disfunção do órgão, que têm as células normais substituídas. A ocorrência destes fenômenos podem ocorrer em qualquer tecido, totalizando quase 200 tipos de neoplasias diferentes (DE ALMEIDA et al., 2005).

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo são os de pulmão, mama, intestino e próstata. Nos homens, os mais frequentes são pulmão, próstata e intestino, enquanto em mulheres, as maiores frequências são encontradas na mama, intestino e pulmão (FERLAY et al., 2015). Ainda, a ocorrência de cânceres infanto-juvenil, apresentam diferentes fisiopatologia aos tumores de adultos, e se destacam pela ocorrência de leucemias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

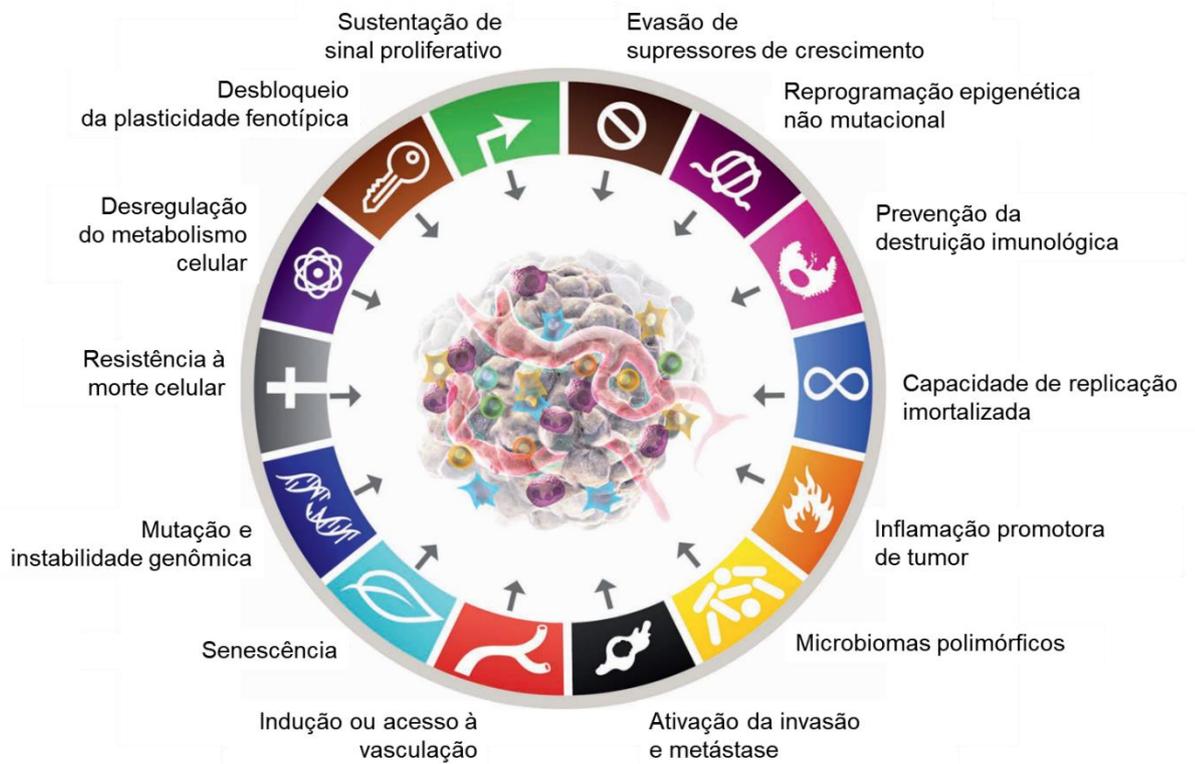
No Brasil, a incidência de novos casos no ano de 2020 foi determinada em 626,03 mil casos, sendo estes representativos de 50,52% de casos acometidos a mulheres e 49,47% para homens. Estes dados superam a estimativa de novos casos para o triênio de 2020-2022, onde se esperava a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer (BRASIL, 2019; INCA, 2020). Os dados de mortalidade do câncer no Brasil, elaborado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) seguem a projeção do índice de novos casos, e demonstram um aumento em média de aproximadamente 0,2% ao ano, desde 1979.

Apesar da alta incidência global, e de avanços científicos e tecnológicos, os tratamentos antitumorais têm sido praticados da mesma forma por cerca de um século, através de modalidades de tratamento/técnicas combinadas como: Cirurgia, hormonioterapia, radioterapia, quimioterapia e fotorradiação (DE ALMEIDA et al., 2005). Com estes métodos de tratamento, um terço dos pacientes consegue ser curado localmente. Nos demais casos, a neoplasia necessita de uma abordagem sistêmica, com o uso da quimioterapia, uma combinação de fármacos interferentes das etapas de síntese, transcrição e tradução do DNA, altamente agressiva ao paciente pois também exerce sua ação sobre as células saudáveis que se encontram no ciclo celular. Estes fatos determinam o grande interesse acadêmico e tecnológico no desenvolvimento de novas terapias mais eficientes, acessíveis e menos tóxicas.

## 1.2. Busca por novas moléculas anticâncer

Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram as "6 Marcas do Câncer", recursos distintos e complementares que permitem o crescimento de tumores e a disseminação metastática. Inicialmente, faziam parte desta lista: Sustentação da sinalização proliferativa; Evasão de supressores de crescimento; Ativação da invasão e metástases; Possibilidade de imortalidade replicativa; Indução de angiogênese; e resistência à morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Avanços na ciência solidificaram e ampliaram esta ideia, revelando que a biologia dos tumores não pode mais ser entendida simplesmente pela enumeração das características das células cancerígenas, mas deve incluir as contribuições do "microambiente tumoral" para a tumorigenese. Desta forma, em uma nova publicação em 2011, os pesquisadores incluíram dentre as marcas do câncer, a desregulação do metabolismo celular e a influência da inflamação (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Recentemente, em 2022, a publicação "*Hallmarks of Cancer*" foi atualizada, destacando a participação de quatro novos mecanismos: O desbloqueio da plasticidade fenotípica; A reprogramação epigenética não mutacional; os microbiomas polimórficos e a senescência (HANAHAN, 2022).

**Figura 1** – *The Hallmarks of cancer* (As marcas registradas do câncer)



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2022.

Cada *hallmark* pode caracterizar não apenas traços da fisiologia de uma célula tumoral, mas também, traz indicativos de sua terapia direcionada, sendo elucidada nas publicações os principais alvos moleculares atribuído a cada *hallmark*. Estas terapias alvos tem ação inibitória de vias de sinalização específicas tumorais e portanto, apresentam menor toxicidade às células normais. A compreensão, de cada uma destas características, direciona a busca e desenvolvimento de novos fármacos capazes de otimizar as atuais estratégias terapêuticas (MIRANDA; SILVA; FORONES, 2019).

Os tumores que produzem uma abundância de citocinas pró-inflamatórias podem levar a um nível de inflamação que potencializa a angiogênese, favorecendo o crescimento neoplásico. Por outro lado, a produção de pouca ou nenhuma citocina ou uma superabundância de citocinas anti-inflamatórias induzem respostas inflamatórias e vasculares limitadas, resultando em crescimento tumoral restrito (COUSSENS; WERB, 2002).

A compreensão destes fatos proveu numerosas descobertas de estratégias de tratamento, que vão além das vertentes de terapia direcionada, conhecidas como imunoterapia, as quais já apresentam excelentes resultados, pois se provou uma rota mais segura e promissora para o combate da doença. Seu sucesso já foi reconhecido como “Maior inovação contra o câncer em 2016” (*American Society of Clinical Oncology*, 2016), e temática do Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina conferido em 2018 à James Allison e Tasuku Honjo (KAISER; COUZIN-FRANKEL, 2018).

Apesar do potencial da imunoterapia no tratamento do câncer, as estratégias terapêuticas precisam ser capazes de contornar a capacidade das células tumorais apresentarem muitas mutações que inibem sua detecção e destruição, e ainda, buscar a associação de fármacos aos atualmente empregados, para que se evite a proliferação e invasão tecidual pelos tumores. Para tais características, temos como destaque 4 *hallmarks*: A resistência à morte celular; Sustentação da proliferação celular; Indução ou acesso à vascularização; e Ativação da invasão e metástase.

O mecanismo mais visado em ações terapêuticas anticâncer é o de resistência à morte celular, uma vez que este remete à própria barreira natural contra o câncer, a morte celular programada por apoptose. Células tumorais apresentam a capacidade de inativar genes supressores de tumores, como o gene p53, responsável por expressar uma proteína homônima, cuja função é interromper o ciclo celular na fase G<sub>1</sub>, e ativar para as células que sofreram danos ao DNA, a maquinaria celular responsável pelo reparo do DNA danificado. Caso este reparo não seja concluído, a p53 deve exibir uma terceira função, onde induz o processo de apoptose. Devido a supressão do seu gene regulador, pelas mutações observadas em células

cancerígenas, ocorrerá uma falha no mecanismo de prevenção endógeno, e a consequente marca de resistência à morte celular (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Fisiologicamente, a apoptose deveria ser induzida a partir de estímulos externos, por meio da interação dos receptores de membrana com os seus ligantes, ou pelo estresse intracelular, porém ambos os caminhos são regulados pela família das proteínas BCL-2. Os membros deste grupo de proteínas possuem caráter antiapoptótico, e atuam como supressores das proteínas próapopticas BAX e BAK. Em uma situação aonde há a supressão do gene p53, um dos principais reguladores de expressão de proteínas antiapoptóticas, as proteínas promotoras do processo de morte celular evadem da ação das BCL-2, gerando uma associação de BAX/BAK com a membrana externa mitocondrial capaz de romper sua integridade, e causando a liberação de proteínas do Citocromo C, componente da cadeia transportadora de elétrons, que no citosol se complexa com o fator ativador da apoptose 1 (Apaf-1), levando à ativação de enzimas efetoras da apoptose, as caspases (CORY; HUANG; ADAMS, 2003; LABI; ERLACHER, 2015).

O estudo de moléculas de baixa massa molecular, atuantes sobre o eixo BCL-2/BAX se mostra uma promissora terapia anticâncer, já possuindo fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), a agência reguladora dos Estados Unidos, atuantes nesta via. O primeiro protótipo de fármaco a ser aprovado para testes foi o ABT-737 desenvolvido pela indústria farmacêutica Abbvie (EUA), a partir de estudos de interação cristalográfica e de ressonância magnética nuclear de pequenas moléculas com BAK e BAX, no ano de 2005. Após estudos que otimizaram a farmacocinética desta molécula, em 2006, os pesquisadores da Abbvie desenvolveram o fármaco comercializado pelo nome de Navitoclax (AB-263). Apesar dos avanços, este ainda apresentava uma baixa dose limite de toxicidade, então, em 2015, a indústria Abbvie desenvolveu um potente inibidor seletivo das proteínas antiapoptóticas de segunda geração que atualmente é comercializado mundialmente pelo nome de Venetoclax (ZHANG et al., 2020).

Além deste exemplo, várias outras pequenas moléculas antagonistas de domínios das proteínas antiapoptóticas (BH3) já foram descritas ou se encontram em fases avançadas de estudos pré-clínicos, como observado na tabela 1 (PFEFFER; SINGH, 2018).

**Tabela 1.** Drogas candidatas à terapia de inibição alvo das proteínas da família BCL-2

<i>Composto ativo</i>	<i>Organização desenvolvedora</i>
Oblimersen de sódio	Genta
Galato de epigallocatequina	Mayo Clínica
Gossipol	Ascenta/National Cancer Institute (EUA)
Obatoclax	Gemin X
Polifenol E	Mitsui Norin
Antimicina A3	Universidade de Washington
Apogossipol	Instituto de Pesquisas Médicas de Burnham
Apogossipolona	Universidade de Michigan
p-Bromobenzilidina	Universidade de Harvard
COM-1285	Raylight Pharmaceuticals
HA14-1	Raylight Pharmaceuticals
SAHBs	Universidade de Harvard
Derivados de Terfenil	Universidade de Yale
Teaflavina	Instituto de Pesquisas Médicas de Burnham

Fonte: Adaptado de YIP; REED, 2008.

Também associado à resistência a morte celular, observamos uma importante influência do processo de autofagia. A autofagia é o principal mecanismo catabólico celular. Esse processo é desencadeado e regulado por genes relacionados à autofagia (ATGs), normalmente em resposta à depleção de nutrientes no meio celular, levando à degradação de componentes citoplasmáticos e organelas em uma vesícula denominada vacúolo autofágico ou autofagossomo (LEVINE; KLIONSKY, 2004; LEVINE; KROEMER, 2019).

Esse processo possui uma complexa correlação com o gene p53, uma vez que mediante ao estresse celular, como o observado em um microambiente tumoral, a proteína p53 ativa a maquinaria autofágica e proteínas lisossomais, fornecendo metabólitos que servem como suporte de sobrevivência para as células cancerosas. Em condições basais, a proteína p53 inibe a autofagia por meio de mecanismos independentes de transcrição, mantendo-o apenas como um processo homeostático (WHITE, 2016). Devido ao duplo caráter do processo de autofagia, em promover a citoproteção e desencadear a morte autofágica, diversos relatos científicos dispõem deste mecanismo como um atrativo alvo terapêutico de supressão de tumores, sendo capaz de reduzir a viabilidade dos tumores (YUN; LEE, 2018).

A capacidade de sustentar a proliferação celular também é um traço fundamental das células cancerosas. Em tecidos normais, há um cuidadoso controle da produção e liberação de sinais promotores de crescimento que induzem as células ao ciclo de crescimento e divisão celular, garantindo um equilíbrio do número de células e das funções teciduais (HANAHAN, WINBERG, 2011). As cascatas promotoras de proliferação celular podem ser iniciadas por diferentes vias e fatores, tais como fatores de crescimento, hormônios ou estresse celular, mas convergem em relação ao envolvimento de enzimas da família MAPK (*Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos*).

Em células normais, a partir da interação de fatores de crescimento com receptores transmembrana do tipo tirosina quinase (RTK) irá ocorrer a dimerização do receptor, permitindo que um resíduo de tirosina na porção citoplasmática seja transfosforilada e desencadeie uma pequena via de sinalização ativadora das enzimas quinases Ras (*Rat sarcoma protein*), e posteriormente Raf (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*), estimulantes da fosforilação das MAPK. Raf é uma das principais enzimas quinases efetoras da proliferação e membro de uma família de serina/treonina quinases, que inclui diferentes isoformas, A-Raf, B-Raf e C-Raf. Sua mutação está altamente atrelada à malignidade no câncer, sendo a B-Raf a que apresenta uma mutação mais grave, por promover uma atividade exacerbada da enzima (MOLINA; ADJEI, 2006; PAWSON, 1995).

A sinalização da proliferação induzida por hormônios se inicia com a interação por receptores acoplados à proteína G, mas converge no eixo RAS/RAF/MAPK (HAUACHE, 2001). A ativação das vias de proliferação por estresse celular ocorre mediante sinais de calor, choque, irradiação UV, alta osmolaridade ou o reconhecimento de citocinas pró inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , FASL e IL-1 (ACHKAR et al., 2018). Nestes casos, não é observado o envolvimento das proteínas RAS/RAF, mas observa-se a ativação das isoformas de MAPK, Jun N-terminal quinases (JNKs) e p38 (GAO; XING, 2009). As quinases da família MAP, quando ativadas translocam-se para o núcleo celular e fosforilam fatores de transcrição, estimulando a transcrição e tradução de um conjunto de genes necessários para a multiplicação celular.

Células tumorais podem sustentar a sinalização proliferativa a partir da produção excessiva de fator de crescimento, em um caráter autócrino, ou sinalizando as células normais do tecido associado ao tumor para que estas produzam fatores de crescimento. Ainda, podem apresentar mutações que causam a desregulação do número de receptores ou potencializam a atividade de enzimas da via de sinalização, como citado acima para as quinases Raf (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Compreendendo as vias de sinalização e alterações observadas no câncer, as terapias disponíveis contra a proliferação celular se concentraram em bloquear a ativação das vias de transdução de sinal do eixo RAS/RAF/MAPK, existindo atualmente, cerca de 37 diferentes inibidores aprovados pelo FDA (BOLAND; WU, 2018). Estes inibidores são pequenas moléculas, com aproximadamente 400 daltons, e apresentam caráter multi-inibitório. O sorafenibe, um destes fármacos, desenvolvido pela Bayer Pharmaceuticals Corporation, é capaz de inibir as quinases B-RAF e C-RAF, e é reconhecido desde 2006 como a primeira terapia direcionada para o tratamento de tumores sistêmicos (ESCUДИER; WORDEN; KUDO, 2019).

A partir do acúmulo descontrolado e desordenado das células em um tecido tumoral, o excesso de células é capaz de se desprender do tecido inicial e invadir progressivamente todo o organismo, formando tumores secundários. Para que este processo ocorra, as células tumorais devem ser capazes de invadir matrizes extracelulares, extravasar parênquimas de órgãos distantes, sobreviver ou manipular diferentes tipos de microambientes e estarem amparadas por uma neovasculatura, para a obtenção de nutrientes e oxigênios, o que ocorre por meio da angiogênese (SUHAIL et al., 2019).

Durante a embriogênese, o desenvolvimento da vasculatura é realizado por células endoteliais em um processo denominado de vasculogênese, no entanto, a ramificação, migração ou remodelação dos vasos já existentes, ocasionada por eventos fisiológicos como ferimentos, inflamação crônica ou ciclo reprodutivo, no caso das mulheres, é nomeada angiogênese. O processo de angiogênese ocorre de forma autolimitada, podendo ser ativada, desligada ou prolongada conforme regulação celular, mas durante o processo carcinogênico, a angiogênese é continuamente ativada, sobre tudo pela hipóxia.

A hipóxia é o resultado da diminuição de oxigênios nos tecidos. A resposta celular à hipóxia é mediada por fatores de transcrição chamados fatores induzíveis por hipóxia (HIF), que são os principais reguladores dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFs) (KROCK; SKULI; SIMON, 2011). O VEGF age diretamente à receptores do endotélio vascular promovendo a permeabilidade das vênulas às macromoléculas, e permite que proteínas plasmáticas extravasem para o espaço extravascular, levando a coagulação do fibrinogênio e deposição de um gel de fibrina que serve como matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos (VALIATTI et. al., 2011).

Além de seus efeitos para a formação de novos vasos, o VEGF estimula células endoteliais na degradação da matriz extracelular, o que com a participação de outros receptores de superfície, as integrinas, são capazes de promover a “*Ativação da invasão e metástase*”, outra importante *hallmark* do câncer.

As integrinas são uma família de receptores transmembrana responsáveis por fixar o citoesqueleto celular com as proteínas da matriz extracelular (ECM), como colágeno, laminina, fibronectina e vibronectina, ou à contra receptores em outras células. Sua estrutura é composta por glicoproteínas heterodiméricas, com duas subunidades:  $\alpha$  e  $\beta$ . Existem 18 tipos de subunidades  $\alpha$ , 8 tipos de subunidades  $\beta$ , e ao todo, 24 tipos de integrinas, com a capacidade de reconhecer diferentes epítomos das proteínas da ECM (KECHAGIA; IVASKA; ROCA-CUSACHS, 2019). A partir da especificidade de cada integrina, pode-se classificá-las em vários grupos, incluindo os receptores de ligação de arginina-glicina-aspartato (RGD), receptores específicos de leucócitos, receptores de laminina e receptores de colágeno. Dada a frequência da sequência RGD em muitas proteínas da matriz extracelular, considera-se que o grupo de integrinas de ligação a RGD é um dos mais importantes receptores de adesão (BACHMANN et al., 2019).

As integrinas estão envolvidas em quase todas as etapas da progressão do câncer, tendo a literatura relatado diversas correlações entre aumento da expressão de receptores  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$  e  $\alpha_v\beta_8$  com a ocorrência de metástase e agravamento prognóstico do paciente (HAMIDI; IVASKA, 2018). As integrinas, sobretudo as portadoras de subunidades  $\alpha_v$ , reconhecem proteínas indutoras da desregulação de proteínas epiteliais, e regulam positivamente proteínas mesenquimais como a N-Caderina, induzindo o processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT), isto é, que permite células epiteliais adquirirem um fenótipo de célula tronco mesenquimal, e percam a integridade e estabilidade de suas membranas, o que facilita a migração celular (PARK et al., 2020).

As integrinas possuem um funcionamento complexo e dinâmico, ainda não completamente elucidado, mas onde já se observa a capacidade de influenciar outros mecanismos da tumorigenese pela ativação e autofosforilação de quinases de adesão focal (FAK), seguindo a ativação das enzimas MAPK e Ras, envolvidas nas vias de proliferação celular (LI et al., 2015); aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (GUO; GIANCOTTI, 2004); hipóxia (ATA; ANTONESCU, 2017) e ativação de diferentes vias de sinalização protooncogênicas (HAMIDI; IVASKA, 2018; YOUSEFI et al., 2021).

Devido a estas características, as integrinas se mostram um importante alvo terapêutico para o controle da angiogênese e invasão celular. Estudos de fase II e III já foram conduzidos com o Cilengitide (Merck), um peptídeo cíclico contendo os aminoácidos RGD, inibidor das integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_5\beta_1$ , em células de glioblastoma. Apesar dos resultados positivos para a regressão dos tumores nos ensaios pré clínicos e de fase II, os estudos multicêntricos randomizados de fase III não apresentaram progressão dos tumores, sendo descontinuado os estudos em 2012 (MAS-MORUNO; RECHENMACHER; KESSLER, 2011). Acredita-se hoje, que os estudos focaram apenas na ação em um tipo de tumor e suas integrinas, conseqüentemente, o desenvolvimento de novas moléculas, com alvos terapêuticos que abranjam o microambiente tumoral, são considerados necessários para determinar o valor destes inibidores na terapia do câncer (ALDAY-PAREJO; STUPP; RÜEGG, 2019).

Poucos são os fármacos que se apresentam eficazes no controle da invasão tecidual e metástase, destacando-se apenas o uso de anticorpos monoclonais anti-VEGF, em aprovação desde 2004 pelo FDA como Bevacizumab (Avastin – Roche ®). Esta primeira terapia aprovada com ação específica na inibição da angiogênese tumoral é até hoje considerada como a terapia chave para cânceres com altos índices metastáticos (GARCIA et al., 2020).

Disposto as principais características das células tumorais, observamos que os estudos para a busca e desenvolvimentos de fármacos anticâncer se encontram bastante avançados, mas ainda enfrentam desafios que os fazem ser cada vez mais necessários, tais como a ampla gama de mutações entre pacientes e o desenvolvimento de resistência à fármacos pelas células.

Neste contexto, a bioprospecção tem se apresentado como uma estratégia de desenvolvimento de novos fármacos vantajosa. Embora existam nos dias atuais diversas estratégias avançadas para o desenvolvimento de novos fármacos, o isolamento e caracterização de produtos biológicos é um tipo de bioprospecção mais eficiente e competitiva, quando comparada à processos puramente sintéticos e de criação de drogas, porque, ao longo da evolução, moléculas foram construídas, por meio da seleção natural para serem capazes de induzir respostas específicas. Além disso, em métodos de bioprospecção uma grande quantidade de moléculas pode ser testada em um curto período de tempo, avaliando talvez, alvos e estratégias terapêuticas ainda não pensadas. Estima-se que cerca de 60% dos atuais fármacos anticâncer possuem origem em produtos naturais (COSTA-LOTUFO et. al., 2010), comprovando a importância desta estratégia de obtenção de novos compostos bioativos.

### 1.3. Compostos de baixo peso molecular das peçonhas de serpentes

As peçonhas das serpentes são formadas por misturas complexas de carboidratos, lipídeos, peptídeos e proteínas que constituem uma importante fonte de moléculas bioativas, nas quais os pesquisadores têm identificado e comprovado seus potenciais como ferramentas de diagnóstico e como agentes terapêuticos, com propriedades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, neurotóxica e anticoagulante (CHAN et. al., 2016; WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017).

A composição destas peçonhas se destaca pela presença de macromoléculas. À exemplo, o gênero *Bothrops*, a qual pertencem as espécies popularmente conhecidas como “jararacas”, e com ampla disposição no território nacional com as espécies de *B. jararacussu* e *B. moojeni* (nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste), *B. jararaca* (Sudeste e Sul), e *B. atrox* (encontrada na Amazônia Brasileira - ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL, 2003), possuem em média 83,8% de enzimas, 9,7% de proteínas sem atividade enzimática e cerca de 6,5% de moléculas com baixo peso molecular (< 10 kDa), sendo este um valor representativo de peptídeos (1,7%), fatores de crescimento (2,2%), carboidratos e outros metabólitos (2,6%) (SOUSA et al., 2013).

Com o avanço tecnológico, que possibilita abordagens integrais e técnicas complementares para isolar, caracterizar e explorar as relações estrutura-função, estes compostos minoritários das peçonhas de serpentes passaram a ser de grande interesse para pesquisas biotecnológicas (GOMES et al., 2010). Atualmente, a causa da ausência de estudos avançados nas atividades destas moléculas era a sua baixa disponibilidade frente ao isolamento, porém, esta dificuldade pôde facilmente ser combatida com os avanços tecnológicos para a descoberta, caracterização e síntese destas estruturas bioativas. Observa-se, sobretudo, um alto interesse científico nos peptídeos, decorrente de sua alta estabilidade, afinidade e seletividade por receptores, atividade farmacológica diversificada, possibilidade de serem utilizados diretamente como agentes farmacológicos (ALMEIDA et al., 2017).

Os peptídeos tendem a ser os componentes de baixo peso molecular de maior relevância biotecnológica nas peçonhas. Observa-se que para o gênero *Bothrops*, 50,67% dos peptídeos pertencem à classe dos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), 43,38% são C-natriuréticos, enquanto 4,72% representam as desintegrinas e 1,23% outras classes, como as catelicidinas, os tipos Kunitz e os Three-Fingers, que possuem conhecida atividade antitumoral, mas nunca foram efetivamente isolados ou testados acerca de sua atividade anticâncer, em diversas peçonhas do gênero (MUNAWAR et al., 2011).

#### **1.4. Isolamento e caracterização de compostos de baixo peso molecular em peçonhas de serpentes com ação antitumoral**

Desde o desenvolvimento do captopril, o primeiro medicamento derivado de um peptídeo de serpente, até o uso das desintegrinas e outras moléculas que apresentam potencial contra certos tipos de câncer, existe um contínuo desenvolvimento, por meio dos avanços biotecnológicos, para o isolamento, caracterização funcional e estrutural e produção de novos medicamentos a partir de moléculas de baixo peso molecular (WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017).

A busca por novos compostos em peçonhas utiliza de diversas áreas do conhecimento para a elaboração de métodos de purificação específicos e que forneçam compostos com alto grau de pureza, característica essencial para que estudos de estrutura e função sejam realizados com a adequada precisão. Estes métodos usualmente se aproveitam das propriedades físico-químicas destas moléculas, como o tamanho, carga e propriedades de ligação, empregando como principal método analítico a cromatografia em coluna (MUNAWAR et al., 2018).

A seguir, iremos avaliar as principais classes de moléculas de baixo peso molecular, suas metodologias de purificação e como se correlacionam com a atividade antitumoral, uma das principais atividades biológicas com interesse biotecnológico na atualidade, a qual poderá ser utilizada para a prospecção de novas moléculas na peçonha de serpentes:

##### **1.4.1. Peptídeos potencializadores de Bradicinina (BPPs)**

Por serem representantes das classes mais abundantes de peptídeos, o maior número de estudos conduzidos sobre o isolamento e caracterização funcional dos peptídeos do gênero *Bothrops* envolveram os BPPs e C-Nat, evidenciando hoje uma extensa descrição de atividades hipotensoras (MORAIS et al., 2013), e atualmente, cresce o interesse científico em observar a ação antimicrobiana destes peptídeos.

Os BPPs são pequenos peptídeos hipotensores, ricos em resíduos de prolina, e que consistem em uma estrutura de 5 a 14 resíduos de aminoácidos. Estes peptídeos são conhecidos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), um importante componente do sistema renina angiotensina (RAS), sendo responsável por regular a pressão arterial (SCIANI; PIMENTA, 2017). O primeiro relato da purificação de um BPP foi realizado por FERREIRA e colaboradores em 1970, pela combinação de métodos de cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G25) na peçonha bruta e purificação das frações por cromatografia em fase reversa.

Ianzer (2004) realizou o isolamento e caracterização de 18 BPPs na peçonha de *B. jararaca*, tendo identificado 5 novas moléculas, pela execução destes mesmos dois passos cromatográficos. Em seu trabalho, a peçonha bruta foi fracionada em coluna Sephadex G25, em tampão acetato de amônio em pH 4, e os picos finais da corrida, correspondentes aos compostos de baixa massa foram coletados, para purificação em coluna C18.

Estes exemplos, entre outros diversos relatos da literatura, nos permitem concluir que existe uma abordagem metodológica padronizada para o isolamento de peptídeos potencializadores de bradicinina, a qual requer pouca manipulação de amostras, e se mostra rápida, confiável e eficaz. Devido ao estabelecimento destas metodologias, diversos BPPs foram identificados em peçonhas do gênero *Bothrops*, com destaque para as espécies *B. jararaca* (HAYASHI; CAMARGO, 2005; IANZER et al., 2004; MURAYAMA et al., 1997), *B. insularis* (CINTRA; VIEIRA; GIGLIO, 1990), *B. neuwiedi* (FERREIRA et al., 1998), e *B. moojeni* (MENIN et al., 2008).

Em uma breve revisão acerca do tema, foi possível identificarmos mais de 70 tipos de sequência para BPPs, tendo apenas o banco de dados de proteínas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), 66 depósitos de diferentes sequências de aminoácidos (ALMEIDA et al., 2017; BERMAN et al., 2000). Estudos com a peçonha da serpente *B. jararacussu* apresentam o isolamento de pelo menos 24 sequências específicas de peptídeos potencializadores de bradicinina (MUNAWAR et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, desde o desenvolvimento do captopril, o primeiro medicamento derivado de um BPP, o interesse científico sob estas moléculas se potencializou acerca de sua atividade hipotensora, mas hoje também, considera-se outros tipos de atividade.

Recentemente, foram encontrados 8 BPPs nas peçonhas de *B. atrox* e *B. jararacussu*, com atividade citotóxica sobre fungos e bactérias de importância clínica (DA SILVA CALDEIRA et al., 2021). Um dos poucos relatos de BPPs com atividade antitumoral está na peçonha de *B. jararaca*, uma das mais ricas em BPPs, onde foi identificado o peptídeo BPP13a, com atividade citotóxica sobre as linhagens de melanoma SK-MEL-28 e A2058, atuando de modo a induzir a permeabilidade da membrana celular (SCIANI et al., 2017).

Apesar da escassez na literatura de BPPs com atividade antitumoral, os resultados obtidos para atividade antimicrobiana, nos reforçam a necessidade de um maior estudo destas classes como agentes citotóxicos. Uma vez que a atividade destes peptídeos sob os patógenos é exercida através da interação com suas membranas, que possuem carga residual negativa, característica em comum com as células de tumores, estes peptídeos podem apresentar uma correspondência na atividade biológica (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

### 1.4.2. Peptídeos anticâncer

Em contrapartida aos BPPs, outros peptídeos de serpente já são descritos exatamente pela sua capacidade de matar células cancerígenas tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Estes são chamados de peptídeos antitumorais, ou anticâncer (ACP, do inglês *anticancer peptides*) (ARMBRECHT et al., 2017). Os ACPs possuem grande diversidade estrutural, mas apresentam algumas características semelhantes, como a dimensão relativamente pequena (até 50 resíduos de aminoácidos); a natureza catiônica (decorrente da presença de resíduos de arginina e lisina, e em alguns casos presença de resíduos de histidina) e também uma porção substancial de aminoácidos hidrofóbicos (por volta de 50%) (HANCOCK; SAHL, 2006; ZASLOFF, 2002). Fazem parte deste grupo de peptídeos, tanto aqueles com atividade citotóxica direta às células, mas também os capazes de realizar interferência em processos intracelulares chave, como a síntese de proteínas e ácidos nucleicos; recrutar ou ativar as células imunes; inibir a angiogênese ou metástases (PÉREZ-PEINADO et al, 2020).

Um dos principais representantes dos ACPs são os peptídeos catiônicos. Estes são peptídeos com destaque para atividades citotóxicas, e que possuem alta carga líquida positiva, devido à abundância de aminoácidos básicos em sua estrutura, que conta em média com 35 resíduos de a.a. (~3,5 kDa). Seu mecanismo antitumoral está relacionado à permeabilização da membrana, com alta especificidade a células tumorais (BI et al., 2013).

Em geral, as membranas de células tumorais apresentam uma carga residual negativa devido a presença de lipídeos do tipo fosfatidilglicerol, cardiolipina ou fosfatidilserina. Diferente destas, as membranas de células normais humanas, são enriquecidas de fosfolipídios zwitteriônicos, como a fosfatidiletolamina, fosfatidilcolina e esfingomielina, que mantem a membrana com uma carga líquida neutra (YOUNT; YEAMAN, 2013). A interação eletrostática entre os peptídeos e os lipídeos aniônicos de membrana leva à adsorção dos peptídeos, que podem ser difundidos da superfície das membranas negativamente carregadas para o interior das células, causando a permeabilidade seletiva às células tumorais.

Apesar desta atividade não ser observada para a maioria das células com composição lipídica “normal”, algumas células apresentam macromoléculas negativamente carregadas em suas membranas, tais como os eritrócitos e a glicoproteína Glicoforina A, o que resultada na ação permeabilizante dos peptídeos à estas células, caracterizando uma atividade hemolítica (MURADOR; DEFFUNE, 2007). Este é um importante parâmetro a ser avaliado durante a o isolamento e caracterização destes compostos.

Os peptídeos catiônicos de peçonha de serpentes podem ainda ser agrupados em 3 famílias: Catelicidinas, defensivas e waprinas.

### 1.4.2.1. Catelicidinas

A maior família até então descrita, é a das catelicidinas (CATHs). Este grupo possui diversos peptídeos bioativos com atividades antimicrobicidas, anticâncer e imunomodulatória. Os membros deste grupo são oriundos de pré-pró peptídeos, e possuem regiões N-terminais altamente homólogas, que contêm originalmente um sinal para clivagem, domínio pré peptídeo, domínio inibidor de L Catepsina (Cathelin-Like), e domínio pró-peptídeo. As regiões C-terminais divergem na estrutura de aminoácidos, e representam a estrutura “madura” do peptídeo. Suas estruturas finais são obtidas pela clivagem proteolítica de serino-proteases, e apresentam de 12 a 35 resíduos de a.a., sendo mais comum a ocorrência de peptídeos de 25-35 resíduos, com estrutura linear (PÉREZ-PEINADO, 2020).

A primeira catelicidina descoberta em peçonha de serpentes foi isolada do veneno da serpente asiática *B. fasciatus*, a partir de cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-50, troca catiônica em coluna CM-Sephadex C-25, e purificação por fase reversa (WANG et al., 2008). Este peptídeo, denominado de catelicidinas-BF, possui massa molecular de 3.637 kDa, com 30 resíduos de aminoácidos e um ponto isoelétrico (PI) de 11.79.

Apesar do estabelecimento desta metodologia de purificação, que se mostrou eficaz para o isolamento de uma catelicidina, a concentração de dessa classe de peptídeos catiônicos em peçonhas é sempre muito escassa, o que impediu outros autores de realizarem a purificação de outras catelicidinas da partir da peçonha bruta. Estudos proteomicos informam que a concentração destes peptídeos na peçonha variam de cerca de 0,1% do valor da massa total da peçonha de serpentes da família *Viperidae*, até no máximo 1% em peçonhas da família *Elapidae*, família no qual são consideradas mais abundantes (TASOULIS; ISBISTER, 2017).

Acredita-se que a baixa presença destes compostos na peçonha é decorrente de que seu papel evolutivo está associado à ação de defesa do organismo contra patógenos, não sendo produzida unicamente pela glândula da peçonha com o intuito de predação. Foram possíveis encontrar o cDNA codificante de catelicidinas nos tecidos de baço, pulmão, glândula de peçonha e pele das serpentes (DE BARROS et al., 2019).

Desta forma, as catelicidinas-BF se tornam o único registro de isolamento de uma catelicidina em peçonha, mas ao todo, existem cerca de 28 sequências de aminoácidos caracterizadas para catelicidinas da peçonha de serpentes, as quais já foram sintetizadas ou expressas via expressão heteróloga, e avaliadas funcionalmente.

A atividade das catelicidinas é capaz de atingir diferentes pontos da tumorigenese. Foi observada para a catelicidina-BF, por exemplo, a capacidade inibição da proliferação,

migração e angiogênese, *in vitro* e *in vivo*, contra células de melanoma murino, da linhagem B16F10, com um IC<sub>50</sub> de aproximadamente 7 µM *in vitro*, e variando nas concentrações de 20-100µM, a depender da atividade, *in vivo* (CHEN et al., 2011).

Seu mecanismo antitumoral está relacionado à permeabilização da membrana, ligação ao DNA e prevenção da expressão do gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Embora tenha obtido resultados promissores para uma linhagem tumoral murina, sua atividade não foi reprodutível para as linhagens humanas de câncer de gástrico (AGS), adenocarcinoma (LoVo e HT-29) e mama (MCF-7) (Wang et al, 2013).

Ainda não foi isolada nenhuma catelicidina de uma peçonha do gênero *Bothrops*, porém, a partir de estudos do transcriptomas da glândula de peçonha, sabe-se que há a produção destas moléculas por diferentes espécies do gênero (AMORIM et al., 2017). Dentre estas sequências de cDNA codificante de precursores de catelicidinas do gênero *Bothrops*, apenas 2 foram efetivamente sintetizadas e avaliadas quanto a sua atividade, a Batroxicidin, da peçonha de *Bothrops atrox*, e a Lutzicidin, identificada na glândula de *B. lutzii* (PÉREZ-PEINADO; DEFAUS; ANDREU, 2020). Ambos os peptídeos foram sintetizados e caracterizados por MELLO, em 2017, utilizando a técnica de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).

A Batroxicidin, apresentou atividade citotóxica sob microrganismos multidrogas resistentes e células tumorais renais murinas da linhagem LLC-MK2, mas ainda não há relatos a cerca de sua atividade anticâncer em linhagens humanas (DEMATEI et al., 2021). A Lutzicidin, identificada na peçonha de *B. lutzii*, devido à alta similaridade estrutural com a Batroxicidin, as quais variam em apenas 2 resíduos de aminoácidos no centro de sua cadeia, ainda não foi sintetizada e avaliada.

### 1.4.2.2. Defensinas

As defensinas, o segundo maior grupo de peptídeos catiônicos, possuem estrutura rica em resíduos de cisteína, com uma típica presença de folhas  $\beta$  estabilizadas por três ligações dissulfeto. As defensinas são ainda divididas em três grupos, com base no comprimento e emparelhamento de cisteínas:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\theta$ - Defensinas. Estudos demonstraram que além de atuar na permeação da membrana plasmática, algumas defensinas possuem alvos intracelulares, que interferem no ciclo celular de células tumorais, e são capazes de modular o fluxo de íons através da interação com canais iônicos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (RÁDIS-BAPTISTA, 2017).

A crotamina é uma das principais defensinas descritas da peçonha de serpente, sendo isolada da peçonha de diferentes subespécies das serpentes *Crotalus durissus*, como a *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* (TASIMA et al., 2020). Seu primeiro relato de isolamento foi realizado por KERKIS et al., 2004, pela combinação das técnicas de cromatografia de troca catiônica, em coluna CM-Sepharose, e precipitação de proteínas por *salting out*. Outras metodologias de purificação foram descritas para as isoformas desta toxina, com a associação das técnicas cromatográficas de exclusão molecular e troca iônica, e a purificação por cromatografia de fase reversa (PONCE-SOTO et al., 2009).

Estruturalmente, a crotamina possui 42 resíduos de aminoácidos ( $\approx 4,2$  kDa) e está relacionada à família das  $\beta$ -defensinas, possuindo um arranjo de estrutura secundária  $\alpha 1\beta 1\alpha 2\beta 2$ , em estabilidade por três ligações dissulfeto. Esta molécula já foi extensamente estudada acerca de suas propriedades antitumorais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Pereira e colaboradores (2011), identificaram uma citotoxicidade seletiva às células de linhagem tumoral de câncer de pele murino (B16-F10) e humano (SK-Mel-28), mesmo em baixas concentrações (5  $\mu\text{g/mL}$ ). Quando testada em modelos de melanoma murino, a crotamina foi capaz de inibir significativamente o crescimento do tumor e promover o aumento da sobrevivência dos animais (NASCIMENTO et al., 2012; PEREIRA et al., 2011).

As peçonhas do gênero *Bothrops* ainda não possuem nenhum relato quanto ao isolamento de defensinas, entretanto, a presença destes peptídeos já foi caracterizada por técnicas ômicas. Dentre as  $\beta$ -defensinas já descritas para o gênero estão a: Bja-defensin de *Bothrops jararacussu*; Bj1, 2 e 3-defensin de *Bothrops jararaca*; e Ba-defensin de *Bothrops atrox* (PÉREZ-PEINADO, 2020).

Análogos sintéticos das defensinas com estrutura definida, foram produzidos pela síntese de peptídeos em fase sólida, e constataram um valioso potencial antimicrobiano destas moléculas (CORREA; OGUIURA, 2013), porém, ainda não foram avaliados estudos de atividade antitumoral para estas moléculas.

### 1.4.2.3. Waprininas

As waprinas são o último grupo de peptídeos catiônicos, os quais apresentam cerca de 50 resíduos de a.a., com 8 resíduos de cisteína ligados através de 4 pontes dissulfeto. Esta estrutura não apresenta similaridade com nenhuma outra proteína de peçonha de serpentes, mas sim, com proteínas ácidas do whey (*Whey Acidic Proteins* – WAP) (NAIR et al., 2007). Esta família dispõe de uma ampla gama de funções biológicas que envolvem o sistema imunológico inato (regulação da proliferação celular e inibição de várias proteases), inibição da bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  e atividade antimicrobicas (SUNTRAVAT et al., 2016).

Existem apenas duas Waprinas isoladas e caracterizadas a partir das peçonhas de serpente, a Omwaprina, isolada da peçonha de *Oxyuranus microlepidotus*, e a Nawaprina, isolada da peçonha de *Naja nigricollis*.

A Omwaprina foi isolada a partir da ultrafiltração em membrana da peçonha bruta, em membranas de 50 kDa, para que se isolasse parcialmente o conteúdo proteico da peçonha. Em seguida, foi realizado o isolamento dos componentes do pool ultrafiltrado por cromatografia de fase reversa (NAIR et al., 2007).

A Nawaprina foi isolada pela associação de cromatografia de exclusão molecular, em coluna Sephadex 30, cromatografia de troca catiônica e cromatografia de fase reversa. Como já observado em diversos outros relatos sobre a purificação de peptídeos, o uso de colunas Sephadex foi capaz de separar os compostos em diferentes massas moleculares, sendo as frações finais, as responsáveis por conter peptídeos com 4 a 9 kDa, e a partir disso, as frações foram efetivamente purificadas por outras técnicas cromatográficas (TORRES et al., 2003).

Ambas as waprinas isoladas foram testadas acerca de seu potencial antimicrobiano, gerando resultados positivos quanto à inibição da atividade bacteriana *in vitro* de cepas de importância clínica de bactérias gram-positivas (NAIR et al., 2007).

Até então, não foram encontradas evidências de atividade antitumoral para as waprinas. Acredita-se que a ausência de resíduos de a.a. hidrofóbicos, dificultam a inserção destas moléculas na bicamada lipídica, reduzindo sua efetividade como disruptor de membranas de células eucarióticas (GLUKHOV et al., 2005). A priori, esta classe de peptídeos catiônicos aparenta ter uma melhor aplicação como agente antimicrobiano.

Estudos transcriptômicos de nosso grupo de pesquisa apontam a presença de waprinas na peçonha de *Bothrops moojeni*, porém, em uma concentração relativa à 0,25% da peçonha bruta (AMORIM et al., 2017). Foi detectado a presença de Waprinas também para outras espécies do gênero *Bothrops*, ocorrendo sempre em baixas concentrações (cerca de 0,2 a 2% do total da peçonha (DE MATTOS PEREIRA et al., 2020; SUNTRAVAT et al., 2016).

#### 1.4.2.4. Desintegrinas

O maior representante dos ACPs, com ausência de atividade citotóxica, são as desintegrinas. Estas são peptídeos de massa molecular de aproximadamente 7 kDa, ricos em resíduos de cisteína e que contêm uma sequência tripeptídica “adesiva”, sendo o primeiro a ser descoberto, e mais abundante, o motivo RGD (Arginina-Glicina-Aspartato). Outros motivos já foram identificados em desintegrinas de serpentes, possuindo um aminoácido diferente no N-terminal do motivo, seguido dos a.a. Glicina-Aspartato (GD), ou ainda, com configurações completamente diferentes, como KTS (Lisina-Treonina-Serina) ou MTD (Metionina-Leucina-Aspartato) (CALVETE et. al., 2003). A presença destes motivos permitem essas moléculas a interação com glicoproteínas do citoesqueleto celular (integrinas), levando à ocorrência de efeitos antiangiogênese (LI; HUANG; LIN, 2018).

A depender da sequência de aminoácidos do motivo e a configuração das pontes dissulfeto, as principais responsáveis pela estrutura tridimensional deste peptídeo, as desintegrinas terão afinidades específicas pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  das integrinas. Acredita-se que o resíduo de aspartato (D), conservado em diversos motivos (RGD, KGD, MGD, VGD, WGD e MLD), seja o responsável pela interação da molécula com as subunidades  $\beta$ , enquanto o aminoácido do N-terminal do motivo influencie a ligação com as subunidades  $\alpha$  (LINO et. al., 2019). É observado para o motivo RGD uma alta afinidade por receptores  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_1$ , o que permite a observação de efeitos biológicos *in vitro* em concentrações da escala micro e nanomolar (SELISTRE-DE-ARAUJO et. al., 2010). É importante ressaltar que o aumento da expressão das integrinas  $\alpha_5\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$ , são marcadores da ocorrência de metástase e agravamento prognóstico de pacientes com câncer (HAMIDI; IVASKA, 2018).

Tendo em vista o papel das integrinas no crescimento de um tumor e na neovascularização, o uso de desintegrinas para inibição da antiangiogênese é uma estratégia propícia para a terapia direcionada contra o câncer, já possuindo estudos avançados em análogos sintéticos de desintegrinas da peçonha de serpentes como fármacos anticâncer, porém, nenhum ainda apresentou resultados superiores às drogas normalmente utilizadas na clínica (JAYSON et. al., 2016).

O isolamento de desintegrinas já foi amplamente descrito na literatura para peçonhas de serpentes, porém, poucas foram identificadas no gênero *Bothrops*. Atualmente, a literatura apresenta relatos apenas de desintegrinas nas peçonhas de *Bothrops alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. colombiensis*, *B. cotiara* e *B. jararaca*, no entanto algumas destas, ainda não foram avaliadas quanto ao seu potencial antitumoral (AKHTAR et al., 2021).

Desde o descobrimento do primeiro peptídeo inibidor de integrinas, a Trigramina, isolada em 1987 por HUANG a partir da peçonha da serpente *Trimeresurus gramineus*, diferentes estudos sugerem a bioprospecção destes compostos a partir da atividade inibitória da agregação plaquetária ou capacidade de ligação à integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$  e  $\alpha_v\beta_{III}$ , imobilizadas em colunas cromatográficas, a partir de ultrafiltrados de peçonhas brutas. Desta forma, SCARBOROUGH et al. (1993) identificaram diversas desintegrinas de peçonha de serpentes, tendo identificado no gênero *Bothrops* as desintegrinas Jararacin (*B. jararaca*) e Cotiarin (*B. Cotiara*), tendo utilizado a cromatografia de exclusão molecular, em coluna Sephadex G-50, e cromatografia de C18 para o isolamento dos peptídeos. Estas desintegrinas porém, não apresentam estudos acerca de seu potencial antitumoral.

Sob a mesma técnica de purificação a Columbistatina foi isolada da peçonha da serpente *Bothrops colombiensis*. Sua estrutura é composta por 72 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular de 7,778 kDa. Em estudos de sua atividade biológica, a desintegrina foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP, e reduzir a adesão e migração celular de células de linhagem de melanoma cutâneo (SK-Mel-28) e bexiga urinária (T24 - SÁNCHEZ et al., 2009). Análogos deste peptídeo foram produzidos por expressão heteróloga em bactérias *E. coli*, onde se observou a reprodutibilidade dos efeitos em plaquetas e em melanoma humano (SUNTRAVAT et al., 2016).

Em uma breve revisão literária identificamos o relato de 23 diferentes sequências de desintegrinas, todas isoladas a partir da associação de cromatografia de exclusão molecular, que em sua grande maioria foram empregadas o uso de colunas do tipo Sephadex G75 ou G50 como passo inicial, e em seguida, a realização de ensaios biológicos para identificar frações ativas, as quais foram purificadas por cromatografia em fase reversa (AKHTAR et al., 2021).

Apesar da disposição de metodologias eficazes para suas identificações e a identificação de desintegrinas em peçonhas de serpente em um grande número de estudos transcriptômicos, assim como relatado para os outros tipos de peptídeos anticancer, estas moléculas sofrem com a ausência de estudos utilizando técnicas avançadas e seletivas para

compostos de baixa massa molecular para que se combata a sua baixa disponibilidade frente ao isolamento (KING, 2011).

Algumas das desintegrinas observadas no gênero *Bothrops* apesar de não terem sido efetivamente isoladas, tiveram sua sequência identificada por estudos transcriptômicos e foram produzidas via expressão heteróloga. A Dis-Ba 01, é uma desintegrina recombinante, identificada na peçonha de *Bothrops alternatus*, com atividade antitumoral descrita para linhagens células murinas de fibroblasto (L929) e tumor de mama (4T1BM2). Este peptídeo foi produzido em bactérias *E. coli*, reduziu a mobilidade dos tumores, tendo demonstrado maior eficiência de inibição sob os tumores de mama, uma vez que estes possuem maior expressão de integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , em comparação aos fibroblastos (DANILUCCI et al., 2019). Além disso, este trabalho também demonstrou uma interferência do peptídeo no ciclo celular, na fase S, sem induzir apoptose, e a promoção de marcadores de indução de autofagia, nas células tumorais, abrindo novas perspectivas à serem estudadas a cerca do potencial antitumoral das desintegrinas (AKHTAR et al., 2021).

Além destas citadas desintegrinas “verdadeiras”, existem relatos na peçonha de serpentes de moléculas com ação inibitória de integrinas, reconhecidas como desintegrinas símiles (*disintegrin-like*), mas que não devem ser confundidas, apesar da semelhança observada nas atividades biológicas.

As desintegrinas símiles não são peptídeos, mas sim proteínas, com cerca de 30 kDa, oriundas do processamento de metaloproteinases P-III da peçonha de serpentes. Suas estruturas são compostas por motivos tripeptídicos D/ECD, reconhedores específicos de integrinas  $\alpha_2\beta_1$ , interferindo nos processos de adesão, proliferação e migração celular. A desintegrina-símile Alt-C, isolada da peçonha de *Bothrops alternatus* demonstrou uma importante inibição da angiogênese pela ligação ao receptor  $\alpha_2\beta_1$  de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), e devido à correlação deste receptor com outras vias de sinalização, como a  $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2 (DOS SANTOS et al., 2020), demonstraram ainda, a ativação da autofagia pela Alt-C. Estes resultados reforçam a necessidade de identificar novas moléculas em peçonhas que ainda não foram detectadas, e também isolar e avaliar as desintegrinas verdadeiras já descritas, na modulação dos efeitos antiangiogênicos e pró-autofagia.

#### 1.4.2.5. Compostos orgânicos e derivados de peptídeos

Outros compostos de baixo peso molecular isolados de peçonhas, com conhecida atividade antitumoral, são os componentes orgânicos e lipídeos, os quais constituem um caso mais complexo para o isolamento e caracterização. Apesar de suas inegáveis presenças, os metabólitos orgânicos representam intermediários em redes complexas de metabolismo das glândulas de peçonha, dificultando a obtenção de concentrações relativas de substratos e produtos (VILLAR-BRIONES; AIRD, 2018).

Estudos já caracterizaram, principalmente, a presença de aminas biogênicas, sobretudo as terciárias e quaternárias (colinas), histamina e N-acetil histamina, moléculas capazes de induzir a vasodilatação, na peçonha de *Bothrops moojeni*. Ainda, foram caracterizadas através de técnicas ômicas, para esta mesma peçonha, a presença de lipídeos bioativos, como as ceramidas, capazes de modular a agregação plaquetária, adesão celular, apoptose e liberação de mediadores inflamatórios (ACUNHA; NARDINI; FACCIOLI, 2021).

Essas observações destacam a importância de estudos de isolamento destes compostos nas peçonhas de serpente, pois embora haja evidência de suas presenças na peçonha, ainda não há relatos de obtenção destes e realização de avaliações funcionais dos mesmos.

### 1.5. Justificativa

O câncer se mantém como uma das doenças de maior impacto mundial e conta com poucas perspectivas de tratamentos seguros, eficazes e que aliem acessibilidade e qualidade de vida ao paciente durante a terapia. Além disso, estudos recentes, de moléculas ainda inexploradas das peçonhas de serpentes, têm se mostrado promissoras para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas, devido à alta estabilidade, afinidade e seletividade por receptores e atividade farmacológica diversificada destes compostos (ALMEIDA et al., 2017).

Para todas as classes de peptídeos anticâncer descritos, a literatura informa que há a presença de moléculas ainda não isoladas, pois não há o emprego de metodologias analíticas sensíveis e específicas para combater a sua baixa disponibilidade na peçonha. O que reforça a necessidade de novos estudos voltados ao tema. Buscamos, portanto, incluir nas perspectivas de nosso trabalho, a exploração de compostos de baixa massa molecular, desde a purificação à exploração de suas relações estrutura-função, em uma abordagem que considera uma variedade de efeitos farmacológicos, reexplorando técnicas de purificação de uma maneira inédita. O presente trabalho possibilitará o conhecimento de novas moléculas, abrindo perspectivas e reflexos para a população e para o grupo de estudo em que está inserido.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral:

Isolar compostos de baixo peso molecular com atividade antitumoral na peçonha de *B. jararacussu*, caracterizando-os funcional e estruturalmente, visando à descoberta de moléculas candidatas à geração de novas drogas com potencial aplicação terapêutica no tratamento de diferentes tipos de câncer.

#### a. Objetivos Analíticos

- Fracionar os compostos de baixa massa molecular da peçonha bruta da serpente *Bothrops jararacussu*, por Ultrafiltração em membranas de 5 e 10 kDa, seguida por cromatografia de exclusão molecular.
- Purificar as frações biologicamente ativas, por cromatografia de fase reversa, utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Determinar a massa e estrutura molecular dos componentes bioativos por espectrometria de massas em analisador do tipo *electrospray* e ressonância magnética nuclear (RMN).

#### b. Objetivos Funcionais

- Avaliar o potencial citotóxico das frações obtidas no processo de purificação, por meio da determinação da viabilidade celular (MTT) em linhagens tumorais humanas.
- Avaliar os mecanismos de ação dos compostos ativos com maior atividade quanto à indução de morte celular por apoptose e autofagia, migração e proliferação celular.
- Avaliar a toxicidade dos compostos bioativos sobre células normais do sangue (leucócitos e hemácias), pelos métodos do MTT e hemólise.
- Avaliar o perfil de expressão de genes relacionados com a via de morte celular e confirmar a validação por meio do estudo de expressão de proteínas por *western blot*, nos principais tratamentos.

## 3. Materiais e métodos

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*

A peçonha bruta de *B. jararacussu* foi adquirida do Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA), cadastrado no IBAMA pelo nº 3002678 – Morungaba - SP.

### 3.1.2. Linhagens celulares

As linhagens de células provenientes de tumores humanos estudadas foram: hepatocarcinoma celular (HepG2) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), carcinoma de próstata (DU-145), carcinoma de pulmão (A549) e adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), obtidas da *American Type Culture Collection (ATCC)*.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 10% de soro bovino fetal, 1% de mix antibiótico (50 µg/mL penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL neomicina) e 0,024% de bicarbonato de sódio. Os procedimentos de cultura de células *in vitro* foram realizados em capelas de fluxo laminar da Classe II e tipo 1A do modelo Bioprotector VSFL-09 (VecoFlow Ltda) e as células mantidas em estufa Forma Series II, Water Jacket CO<sub>2</sub> Incubator (ThermoFisher Scientific) com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e 95% de umidade.

### 3.1.3. Extração dos componentes do sangue total (Leucócitos, plaquetas e hemácias).

Foram coletados 10 mL de sangue periférico, em tubos citratados, de indivíduos saudáveis, sem uso de terapia farmacológica, que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O sangue foi homogeneizado e transferido cuidadosamente para um tubo falcon contendo 5 mL de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, 10771). Este material foi então centrifugado a 500x g por 30 min em centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf), para a separação entre as fases do sangue, sendo o anel leucocitário formado retirado com a ajuda de uma pipeta Pasteur e reunido em um tubo falcon, e lavado por centrifugação três vezes com 5 ml de PBS, a 500x g por 5 min em centrífuga Eppendorf 5804R. Após as lavagens, o pellet foi ressuscitado em 5 mL de meio RPMI (Gibco, 31800-022) suplementado com 20% de SBF (Gibco, 12657). A partir da separação das fases do sangue, foi coletado cerca de 1 mL da suspensão de hemácias, que foi lavada 3 vezes com tampão PBS pH 7,4 através de centrifugação a 500 G por 5 min.

Estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob o número do parecer CAAE: 40741720.1.0000.5403.

### **3.1.4. Controle das culturas de células**

As células de linhagens tumorais foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 10% de soro bovino fetal, 1% de mix antibióticos (50 µg/mL penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL neomicina) e 0,024% de bicarbonato de sódio. Para a execução dos experimentos ou manutenção da cultura, estas foram desaderidas, utilizando cerca de 2 mL de Tripsina 0,25% (Gibco, 25200056), em incubação de 5 minutos à 37°C. A tripsina foi inativada pela adição de 3 mL de meio de cultura DMEM completo, e a suspensão foi transferida para um tubo falcon de 15 mL, para centrifugação à 400x g durante 5 minutos, em centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf), para sedimentação do pellet de células. Após este procedimento, o sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspensas em um novo meio de cultura.

A quantidade e porcentagem de células viáveis dessa suspensão foi verificada pelo contador automático de células Countess 3 (Life Technologies), utilizando em uma lâmina de contagem, 10 µL da suspensão e 10 µL do corante azul de tripan. Foram utilizadas para os experimentos, apenas culturas cuja viabilidade era igual ou superior à 95%.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Isolamento e identificação dos compostos com atividade antitumoral**

#### **3.2.1.1. Ultrafiltração em membrana**

Cerca de 100 mg de peçonha bruta foram suspensas em 15 mL de água deionizada e submetidas a ultrafiltração em membrana de polietersulfona de 5 kDa (Merck Millipore), a 2.000x g em centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf) durante 25 minutos e em temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, o material filtrado foi coletado e o volume do reservatório, contendo a peçonha, completado para 15 mL, para a realização de uma nova centrifugação. Este procedimento foi repetido duas vezes, completando um total de três centrifugações. O pool contendo as moléculas com massa molecular  $\leq$  5kDa foi coletado e liofilizado.

A peçonha filtrada foi novamente submetida à ultrafiltração, sob os mesmos parâmetros, mas agora em membranas de polietersulfona de 10 kDa (Merck Millipore), para a obtenção de um pool de moléculas de massa molecular entre 5 e 10 kDa. Este pool foi coletado e armazenado na forma de pó liofilizado.

### 3.2.1.2. Cromatografia de exclusão molecular

O fracionamento dos pools extraídos na ultrafiltração foi realizado por cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel filtração Superdex® Peptide 10/300 GL em sistema ÄKTA™ Purifier (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Formiato de Amônio 50 mM pH 5. O filtrado obtido foi dissolvido em 500 µL do tampão de corrida, centrifugado a 2.000 x g em centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf), e este mesmo volume do sobrenadante límpido foi aplicado à coluna com um fluxo de 0,5 mL/min em eluição isocrática, totalizando a massa de 1 mg/injeção. A monitorização da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 215 nm, e a coleta dos eluentes se deu de forma automatizada, no volume de 0,5 mL/tubo, os quais foram agrupados em 6 frações, liofilizados e ressuspensos em 1 mL de água deionizada, com posterior dosagem pelo método do BCA (ácido bicinchonínico), e armazenados em alíquotas de massa equivalente a 1 mg/tubo em forma de pó liofilizado.

### 3.2.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular foram submetidas a análise do perfil eletroforético. Para isso, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixo peso molecular na presença de dodecil sulfato de sódio, como descrito por SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987. O gel foi composto por uma fase superior com concentração de acrilamida de 5% e uma fase inferior de separação, de concentração 16%. As amostras aplicadas ao gel (25 µg/pista) foram solubilizadas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 50 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol (2%), SDS 4% e Coomassie Brilliant Blue 0,01%.

Para a corrida da eletroforese foi utilizado o Tampão do Cátodo Tris 0,1M, Tricina 0,1M + SDS 0,1%, pH 8,25 e Tampão de Ânodo Tris 0,2M pH 8,9. A corrida eletroforética foi realizada utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply EPS 601 (GE Healthcare), inicialmente aplicando uma corrente de 10 mA à 150 V, para concentração das amostras, e após atingir o gel inferior, a corrente foi alterada para 20 mA. O tempo de corrida foi de 5 horas, e após seu término, o gel foi lavado por 15 minutos com água destilada, fixado com uma solução de glutaraldeído 25%, corado com Coomassie Brilliant Blue G 250 0,02% (Sigma-Aldrich) por 30 minutos, e descorado em ácido acético 10% (v/v). Como padrão de peso molecular, foi utilizado Ultra-low Range Molecular Weight Marker (Sigma-Aldrich) composto por triosefosfato isomerase (26,6 kDa), mioglobina (17 kDa), α-lactoalbumina (14,2 kDa), aprotinina (6,5 kDa), cadeia β de insulina oxidada (3,5 kDa) e bradicinina (1,1 kDa).

#### **3.2.1.4. Cromatografia de fase reversa em coluna C18**

As frações obtidas na etapa cromatográfica de exclusão molecular que apresentaram alguma das atividades de interesse sob as linhagens tumorais, tiveram seus compostos isolados através da cromatografia em coluna de fase reversa C18 (7  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm ID x 25 cm, Shimadzu) em HPLC (Shimadzu). A eluição dos analitos presentes em cada fração foi realizada em um fluxo de 1 mL/min utilizando os solventes A (TFA 0,1%) e B (acetonitrila 70%) em gradiente fracionado: 0% de B de 0 a 10 minutos, e 0 a 100% de B de 10 a 60 minutos. Cada injeção foi realizada utilizando 100  $\mu\text{L}$  das frações + 200  $\mu\text{L}$  de solvente (aproximadamente 100  $\mu\text{g}$ /injeção). A monitorização da absorvância foi realizada em comprimento de onda de 280 nm, e a coleta do eluente feita de forma manual.

#### **3.2.1.5. Cromatografia dos compostos ativos em coluna de fase reversa**

Os compostos ativos foram submetidos a uma segunda etapa de cromatografia de fase reversa C18, desta vez utilizando uma coluna com poros de tamanho reduzido (5  $\mu\text{m}$ , 2 mm ID x 25 cm, Phenomenex) em HPLC (Shimadzu). O material foi eluído em um fluxo de 0,8 mL/min em gradiente de TFA 0,1% e Acetonitrila 70%. Cada injeção foi realizada utilizando 100  $\mu\text{L}$  das frações + 200  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1% ( $\approx 50$   $\mu\text{g}$  /injeção). A monitorização da absorvância foi realizada em 280 nm e a coleta do eluente feita de forma manual.

#### **3.2.2. Quantificação das amostras**

Durante todo o isolamento e purificação dos compostos, as amostras foram quantificadas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA), utilizando o kit Pierce <sup>TM</sup> Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo Scientific<sup>TM</sup>), segundo as recomendações do fabricante. Brevemente, 20  $\mu\text{L}$  das amostras a serem quantificadas foram adicionadas aos poços de uma placa de 96 poços, e adicionadas de 180  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho (50% Reagente A + 48% Reagente B + 2% Reagente C do kit), mantendo incubação em 37°C durante 15 minutos. Após incubação, a absorvância das amostras foi lida em comprimento de onda de 480 nm em leitor de microplaca Spectramax 190 (Molecular Devices). As análises utilizaram o diluente da amostra (água deionizada) como branco, e foram realizadas em triplicata para cada amostra. Os valores de concentrações correspondem à média da triplicata das absorvâncias das amostras, submetidas à uma curva padrão previamente preparada com soro albumina bovina.

### **3.2.3. Identificação dos compostos com atividade citotóxica *in vitro***

#### **3.2.3.1. Determinação da viabilidade celular pela redução do MTT**

A viabilidade das células expostas às frações e/ou compostos isolados foi determinada pelo método de redução do MTT (MOSMANN, 1983). Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $2 \times 10^4$  cél/poço e volume de 100  $\mu$ L, e mantidas em repouso por 24 horas para completa aderência à placa. Após este período, foram tratadas com 50  $\mu$ L das amostras, ou com os controles negativo tampão PBS, e positivo Cisplatina (40  $\mu$ g/mL) para as células HepG2 e DU-145, e Metanossulfonato de metila (50  $\mu$ g/mL) para as células A549 e MDA-MB. Após 24 horas do tratamento, os poços receberam 20  $\mu$ L do reagente de MTT (5 mg/mL), sendo mantidos por 4 horas a 37°C. Após incubação, as placas foram centrifugadas a 400 g por 5 min, invertidas para o descarte do sobrenadante, e os cristais, solubilizados em 100  $\mu$ L de DMSO (Dimetil sulfóxido). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca Spectramax 190 (Molecular Devices), em 570 nm. Para a análise dos resultados, a média dos valores de absorbância dos grupos Controle Negativo correspondeu à 100% de viabilidade celular. As avaliações foram realizadas em três experimentos independentes, em triplicata para cada grupo experimental (n = 9).

#### **3.2.3.2. Determinação do índice de concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) dos compostos ativos**

A determinação do IC<sub>50</sub> (concentração capaz de matar 50% da população de células) dos compostos com atividade estatisticamente significativa para redução da viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. As células plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de  $2 \times 10^4$  cél/poço e volume de 100  $\mu$ L, foram mantidas em repouso por 24 horas, e então receberam 50  $\mu$ L de amostra, tampão PBS ou agentes antitumorais controle (Cisplatina – HepG2 e DU145; MMS – A549 e MDA-MB) nas concentrações de 1, 3, 6, 12, 25 e 50  $\mu$ g/mL, diluídos em tampão PBS. Após incubação de 24 horas, foi adicionado de 20  $\mu$ L do reagente de MTT (5 mg/mL), diluído em tampão PBS, prosseguindo a análise como descrito no item 3.2.3.1. A leitura da absorbância dos poços foi realizada em leitor de microplaca Spectramax 190 (Molecular Devices), no comprimento de onda de 570 nm. O IC<sub>50</sub> foi calculado por meio da regressão não linear de uma curva dose-resposta, através do software GraphPad Prism 8 (GraphPad, USA). A avaliação foi realizada em três experimentos independentes, em triplicata para cada grupo experimental (n = 9).

### 3.2.3.3. Análise de indução apoptose/necrose pelos compostos citotóxicos

Para o ensaio de avaliação de morte celular por apoptose ou necrose foi utilizado o kit Annexin V-FITC/PI e os procedimentos realizados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Invitrogen). As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  cél/poço, volume de 450  $\mu$ L, e mantidas em repouso por 24 horas para completa aderência à placa. Após este período, foram tratadas com 50  $\mu$ L dos compostos ativos, nas concentrações correspondentes aos valores de IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub>, pré determinados pela Curva Dose x Resposta, a concentração usual das triagens para as demais moléculas (16  $\mu$ g/mL), ou com os controles negativo tampão PBS e positivo Cisplatina, na concentração determinada como IC<sub>50</sub> (11,69  $\mu$ g/mL). Após 24 horas do tratamento, o sobrenadante dos poços foi transferido para tubos de poliestireno (Corning – Corning, NY, Estados Unidos), os poços lavados com 500  $\mu$ L de tampão PBS e as células remanescentes desaderidas com a adição de 100  $\mu$ L de Accutase® durante 3 minutos, e transferidas para o tubo de poliestireno.

As células coletadas nos tubos foram submetidas a centrifugação a 400x g por 5 minutos, à 4°C, em centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf), e tiveram seu sobrenadante descartado. O conteúdo do tubo foi lavado com uma nova centrifugação utilizando 500  $\mu$ L de tampão PBS. Após o descarte deste sobrenadante, as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L do tampão Annexin-Binding Buffer. Cerca de 15 minutos antes da análise foram adicionados 10  $\mu$ L de solução de Anexina-V\*FITC em todos os tubos, exceto no tubo destinado a calibração. Imediatamente antes da análise foram adicionados 2  $\mu$ L de solução PI (1  $\mu$ g/mL) em todos os tubos de citometria. Foi realizada a leitura de 10.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences – San Jose, Califórnia, Estados Unidos) e analisada pelo software BD FACSDiva™ 6.1.3 (BD Biosciences – San Jose, Califórnia, Estados Unidos). A avaliação foi realizada em três experimentos independentes, em triplicata para cada grupo experimental (n = 9).

### 3.2.3.4. Avaliação da indução de autofagia

O ensaio foi conduzido de acordo com as especificações do fabricante do kit utilizado na detecção (Autophagy Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  cél/poço, volume de 450  $\mu$ L, e mantidas em repouso por 24 horas para completa aderência à placa. Após este período, foram tratadas com 50  $\mu$ L das amostras ativas, nas concentrações pré determinadas pela Curva Dose x Resposta de IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub>, para Js III-I; concentração usual das triagens para os demais compostos (16  $\mu$ g/mL), ou com os controles negativo

tampão PBS e positivo Cisplatina, na concentração determinada como IC<sub>50</sub> (11,69 µg/mL). Após 24 horas do tratamento, o sobrenadante dos poços foi transferido para tubos FACS (Corning – Corning, NY, Estados Unidos), os poços lavados com 500 µL de tampão PBS, e as células remanescentes desaderidas com a adição de 100 µL de Accutase®.

As células coletadas nos tubos foram submetidas a centrifugação a 400x g por 5 minutos, à 4°C, em centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf), e tiveram seu sobrenadante descartado. O conteúdo do tubo foi lavado com uma nova centrifugação utilizando 500 µL de tampão PBS. Após o descarte deste sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 µL do tampão de marcação de autofagossomos e mantidas em incubação durante 30 minutos em temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a marcação, as células foram lavadas 2 vezes em processo de centrifugação e ressuspensas para a leitura em 200 µL de tampão PBS.

Foi realizada a leitura de 10.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences – San Jose, Califórnia, Estados Unidos), em canal com laser de emissão de 405 nm e detecção em 525/50 e analisada pelo software BD FACSDiva™ 6.1.3 (BD Biosciences – San Jose, Califórnia, Estados Unidos). A avaliação foi realizada em três experimentos independentes, em triplicata para cada grupo experimental (n = 9).

### **3.2.4. Caracterização de mecanismos antitumorais não citotóxicos**

#### **3.2.4.1. Ensaio de Migração Celular (*Wound Healing*)**

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 2×10<sup>4</sup> cél/poço e volume de 100 µL, e mantidas em repouso durante 24 horas para total aderência das células, obtendo uma confluência de 90%. Após este período, com o auxílio de uma ponteira estéril, foi efetuado um risco (cicatriz) na monocamada aderente de células. O meio de cultura foi removido para retirar os restos celulares e as células soltas, e o poço gentilmente lavado com 100 µL de tampão PBS. Um novo meio de cultura (150 µL) foi adicionado contendo as amostras de interesse nas concentrações pré determinadas na Curva Dose x Resposta correspondentes ao IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, 16 µg/mL, ou com tampão PBS.

As imagens das feridas foram registradas com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio invertido (Zeiss - Primovert), nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação. A área interna das feridas foi determinada utilizando o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Estados Unidos). A avaliação foi realizada em três experimentos independentes, em triplicata para cada grupo experimental (n = 9), e os resultados foram expressos em Eficiência de Migração (%), calculada através do software GraphPad Prism 8 (GraphPad, USA).

### 3.2.4.2. Ensaio de proliferação celular (Sobrevivência clonogênica)

As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de  $2 \times 10^4$  cél/poço, volume de 100  $\mu\text{L}$ , e mantidas em repouso durante 24 horas para total aderência das células. Após este período, as células foram tratadas com 50  $\mu\text{L}$  de amostra, nas concentrações pré determinadas pela Curva Dose x Resposta de  $\text{IC}_{20}$ ,  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{80}$ , 16  $\mu\text{g/mL}$ , ou com o tampão PBS. Após incubação, os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS, e as células desaderidas com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de Accutase® durante 3 minutos.

Estas células foram transferidas para tubos Eppendorf de 600  $\mu\text{L}$ , centrifugadas, resuspendidas em 100  $\mu\text{L}$  em DMEM completo e contadas em contador automático de células Countess® (*Automated Cell Counter* – Life Technologies, Carlsbad, EUA). O volume referente a 150 células foi adicionado à placa de 6 poços, completando-se o volume final do poço para 2 mL de meio de cultura DMEM + 10% SBF. Após 7 dias, os poços foram lavados com 2 mL de PBS e as células fixadas à placa com Metanol: Ácido acético: Água (1:1:8 v/v) por 30 minutos. Para a análise, as células foram coradas com o corante Giemsa, em uma solução com Tampão fosfato pH 7 (1:20 v/v) por 25 minutos. Após coloração, as placas foram gentilmente lavadas com água destilada e mantidas em ambiente ventilado para secagem natural.

A capacidade de proliferação destas células foi mensurada pelo parâmetro de fração de sobrevivência (FS), determinadas pela equação:

$$FS = \frac{n^{\circ} \text{ colônias totais}}{n^{\circ} \text{ colônias viáveis}} \times \frac{n^{\circ} \text{ células em colônias viáveis}}{n^{\circ} \text{ células plaqueadas}}$$

Foram consideradas como colônias viáveis as que continham 50 células ou mais. A avaliação foi realizada em dois experimentos independentes, em triplicata para cada grupo experimental ( $n = 6$ ).

### **3.2.5. Identificação estrutural dos compostos bioativos**

#### **3.2.5.1. Espectrometria de Massas em analisador do tipo *electrospray***

As análises de espectrometria de massas de moléculas com até 2 kDa foram realizadas via inserção direta em um espectrômetro de massas Xevo TQ-S tandem quadrupole (Waters Corporation, Milford, MA) operando com uma fonte de ionização Z-spray em modo positivo de análise. As amostras foram solubilizadas em metanol (grau HPLC) em volume de 5  $\mu$ L, e injetadas diretamente na fonte de ionização em uma mistura de solvente consistindo de 0,1% de ácido fórmico e metanol com 0,1% de ácido fórmico 2:8 (v/v). A taxa de fluxo foi de 150  $\mu$ L/min. O tempo total de análise foi de 3 min. Os parâmetros de operação utilizados na fonte Z-spray foram: voltagem do capilar = 3,2 em modo positivo e 2,5 kV para o modo negativo, voltagem do cone = 40 V, temperatura da fonte = 150 °C, fluxo do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) = 800 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise Full-scan foi de 100 a 2000 Da. As análises via espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foram realizadas por dissociação induzida por colisão (DIC) utilizando argônio como gás de colisão em diferentes energias (10-50 eV).

#### **3.2.5.2. Ressonância Magnética Nuclear**

A identificação dos compostos por RMN foi realizada utilizando técnicas 1D (<sup>1</sup>H, e <sup>13</sup>C-APT) e 2D (HSQC). O espectro de RMN foi obtido em espectrômetro Bruker Avance DRX 500 FT (Karlshure, Germany), operando em 500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C, e utilizando 1 mg do composto isolado, solubilizado em água deuterada (D<sub>2</sub>O). Os resultados foram avaliados pelo software MestReNova (MestreLab Research).

### **3.2.6. Avaliação da toxicidade dos compostos bioativos em células normais**

#### **3.2.6.1. Citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC)**

A citotoxicidade dos compostos ativos em células normais foi avaliada pelo método do MTT, segundos as mesmas condições já descritas (item 3.2.3.1.) e utilizando as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) como alvo.

### **3.2.6.2. Atividade hemolítica**

O ensaio para avaliação de hemólise foi realizado segundo descrito por DEIBLER et. al., 1959. Alíquotas de 100  $\mu$ L de uma suspensão de hemácias (1% v/v) foram adicionadas em placas de 96 poços. Os poços foram tratados com 50  $\mu$ L dos compostos ativos, tampão PBS como controle negativo, ou Triton X-100 1% (v/v) como controle positivo. Após incubação por 1 hora em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C, a placa foi centrifugada (3000 rpm/5 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância das hemoglobinas liberadas, em leitor de microplacas Spectramax 190 (Molecular Devices) à 405 nm.

### **3.2.7. Avaliação toxigenômica**

#### **3.2.7.1. Análise de expressão gênica por RT-qPCR**

Os compostos com atividade citotóxica foram submetidos à análise de expressão gênica dos genes envolvidos nas vias de morte celular (BAX, BCL-2 e FAS).

As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de  $1 \times 10^6$  cél/poço e volume de 1,5 mL, e mantidas em repouso durante 24 horas para total aderência das células. Após este período, os poços foram tratados com 500  $\mu$ L de amostras ou cisplatina, na concentração de IC<sub>50</sub>, ou com tampão PBS apenas. Após uma nova incubação de 24 horas, as células foram lisadas utilizando TRIzol® (Thermo Scientific). A extração do RNA total foi realizada com o PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada por espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) e eletroforese em gel de agarose 1%.

O cDNA foi sintetizado com o auxílio do kit High Capacity cDNA Reserve Transcription Kit (Applied Biosystems), segundo as recomendações do fabricante, utilizando 1  $\mu$ g de RNA. Os cDNA obtidos foram submetidos a reação de polimerase reversa utilizando as sondas TaqMan Gene Ex Assay (Applied Biosystems), no equipamento Step One Plus system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos). As reações foram executadas em placas de 96 poços, utilizando 10  $\mu$ L do reagente TaqMan Universal Master Mix, 9,5  $\mu$ L de amostra diluída de cDNA à 2,5 ng/ $\mu$ L e 0,5  $\mu$ L da sonda de interesse. As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos, e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas com 3 replicatas técnicas. As expressões relativas foram analisadas pelo software DataAssist™ v3.01 (Applied Biosystems), comparando os níveis de expressão entre os grupos tratados com os respectivos controles negativos, usando o gene de referência  $\beta$ -actina como controle de normalização.

### 3.2.7.2. Detecção das caspases por *Western blot*

Foram investigadas a modulação na expressão das caspases 3, 8 e 9, as principais enzimas relacionadas com as vias de indução de morte celular, pela técnica de *Western blot*, segundo Costa et. al. (2017). A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como proteína de referência.

As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de  $1 \times 10^6$  cél/poço e volume de 1,5 mL, e mantidas em repouso durante 24 horas para total aderências das células. Após este período, os poços foram tratados com 500  $\mu$ L de amostra, cisplatina, ou tampão PBS apenas. Após nova incubação de 24 horas, as células foram lisadas utilizando tampão RIPA contendo um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, 200-664-3).

O lisado foi dosado através do método do BCA, e 25  $\mu$ g de proteína de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, em corrida de 180 minutos à 100 V. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45  $\mu$ m (Bio-Rad), em sistema de eletrotransferência, utilizando tampão bicarbonato 50 mM, com 120 V e 250 mA, durante 150 minutos. Após a corrida de transferência, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 15 minutos, em tampão PBS+Tween 0,1% (PBS-T), e bloqueadas em PBS contendo 3% de Soro Albumina Bovina, em incubação de 2 horas.

As membranas foram marcadas com os anticorpos primários: anticorpo monoclonal anti-caspase 8, na diluição de 1:1000 (BD Pharmingen, 551243); anticorpo monoclonal anti-caspase 9, 1:250, (BD Pharmigen 63103); e anticorpo anti-caspase 3, 1:5000 (BD Pharmingen, T3320). Foi utilizado como marcador de proteína endógena o anticorpo antitubulina, 1:5000 (BD Pharmingen, T3320). Após marcação overnight, foi realizada a marcação com anticorpos secundários, mantendo a incubação por 2 horas.

Após este período, a membrana foi lavada novamente em tampão PBS-T, por três vezes, e revelada utilizando o kit Amersham ECL *Western Blotting Detection Kit* e o equipamento ChemiDoc™ MP System Image (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

### 3.3. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade para comparação dentre os diferentes tratamentos. Nos casos de dados com distribuição normal foi empregado o teste paramétrico de análise de variância *one way* ANOVA com repetição, para testar a variância entre as médias. Para selecionar os grupos que apresentarem respostas diferentes, foi empregado o teste de comparação multiparamétrica pelo teste de Student-Newman-Keuls. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0.05$ . As análises estatísticas foram elaboradas utilizando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad, USA).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Isolamento de compostos de baixa massa molecular

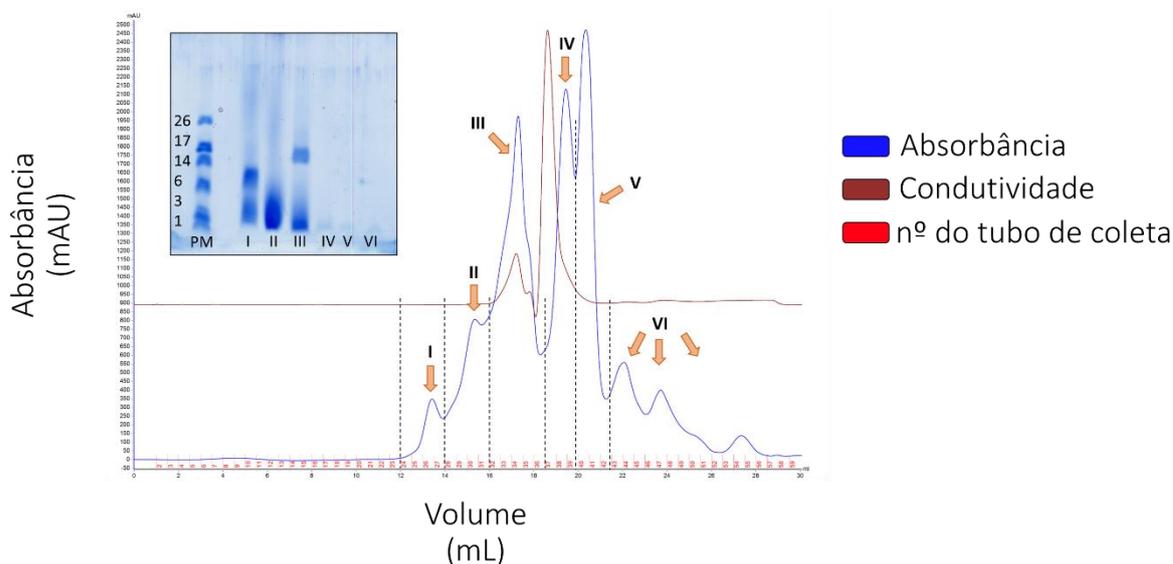
#### 4.1.1. Ultrafiltração, cromatografia de exclusão molecular e SDS-PAGE das frações contendo compostos de até 5 kDa

Considerando que a peçonha se trata de uma mistura complexa de substâncias (proteínas, peptídeos, lipídeos, carboidratos, metabólitos e sais inorgânicos), a primeira etapa da purificação de um composto biologicamente ativo tende a separar o maior número de moléculas em pools que serão mais facilmente triados. Este processo é conhecido como “fracionamento”, e pode ser realizado por diferentes técnicas cromatográficas, como a cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iônica ou cromatografia de afinidade, porém, a técnica mais empregada no estudo de compostos de baixa massa molecular é a cromatografia de exclusão molecular (MUNAWAR et al., 2018).

No entanto, a purificação da maior parte dos compostos de baixo peso molecular da peçonha de serpente, sobretudo os peptídeos, se inicia pelo fracionamento em colunas de gel filtração (exclusão molecular), pois os princípios deste método favorecem a obtenção de frações de massa molecular mais homogênea. Estas colunas se utilizam de fases estacionárias porosas, onde peptídeos e proteínas de menor tamanho acabam adentrando as cavidades das partículas, e ficam retidas por um maior tempo. As proteínas de maior tamanho são incapazes de entrar nestes poros, e por isso permeiam ao redor dos grânulos, eluindo mais rapidamente.

Os compostos de baixa massa molecular presentes na peçonha de *B. jararacussu*, inicialmente foram isolados através de ultrafiltração em membrana de 5 kDa, inicialmente selecionando compostos da peçonha com massa molecular inferior à 5 kDa (item 3.2.1.1). Seu fracionamento foi realizado por cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel filtração Superdex® Peptide 10/300 GL em sistema ÄKTA™ purifier (GE Healthcare) (item 3.2.1.2.). A Figura 2 demonstra o cromatograma obtido, e em destaque, a caracterização do conteúdo das frações por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 16% (item 3.2.1.3.).

**Figura 2** – Fracionamento dos componentes de massa inferior a 5 kDa da peçonha bruta de *B. jararacussu* em cromatografia de exclusão molecular e perfil eletroforético das frações



Cromatograma do ultrafiltrado em membrana de 5 kDa, em coluna de gel filtração Superdex Peptide® (GE Life Sciences). A corrida foi monitorada através da absorbância em 215 nm (Linha Azul) e condutividade (Linha Laranja). O material eluído foi coletado de forma automatizada, em volumes contínuos de 0,5 mL/tubo, e os picos agrupados nas 6 frações, destacadas na figura entre linhas tracejadas. O eixo *x* se refere ao volume, em mL, e o eixo *y* à absorbância, medida em mAu. As frações também tiveram seus conteúdos caracterizados por SDS-PAGE, cujo gel está inserido na imagem. Foi utilizado 25 µg/pista. A pista PM se refere aos padrões de massa molecular Triosefosfato Isomerase (26 kDa), Mioglobina (17 kDa),  $\alpha$ -Lactoalbumina (14,2 kDa), Aprotinina (6,7 kDa), Cadeia  $\beta$  da Insulina oxidada (3,49 kDa) e Bradicinina (1,06 kDa). Fonte: Próprio autor.

Os materiais eluídos foram agrupados em 6 grupos, indicados pelas linhas tracejadas na imagem, os quais, foram denominados de Frações I a VI. A Fração I reuniu o conteúdo dos tubos 25 – 27; Fração II - tubos 28 – 31; Fração III - tubos 32 – 36; Fração IV -tubos 37 – 39; Fração V - tubos 40 – 42 e Fração VI - tubos 43 – 55.

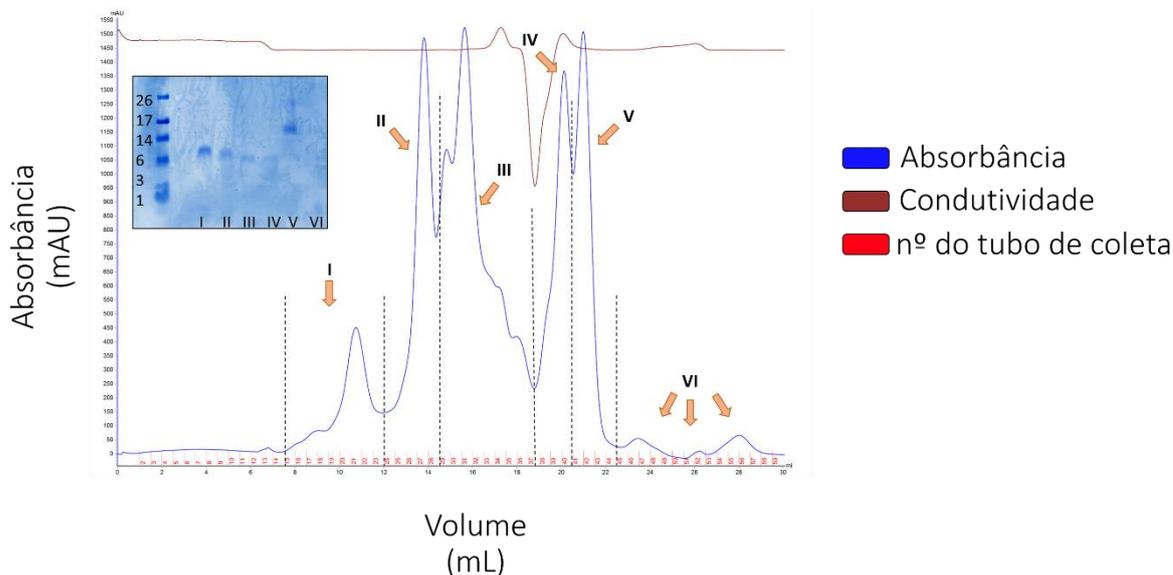
A análise de SDS-PAGE indica que a Fração I possui compostos de aproximadamente 2 kDa e 7 kDa. A Fração II possui compostos de 1 à 3 kDa, enquanto que a Fração III apresenta compostos inferiores a 1 kDa, e de forma atípica, compostos de aproximadamente 15 kDa. As Frações IV, V e VI, apresentam bandas com baixa intensidade na região inferior à 1 kDa, podendo indicar a baixa concentração de compostos de origem peptídica nestas frações, uma vez que esta análise foi feita apenas utilizando a concentração de 25 µg/poço, ou ainda, a possibilidade de difusão destas moléculas para fora do gel, uma vez que seu tamanho pode ser inferior ao tamanho dos poros.

É importante ressaltar que a coloração de géis de eletroforese utilizando o corante Azul de Coomassie é específica para proteínas e peptídeos, uma vez que o corante atua por meio de interações iônicas entre o grupo de ácido sulfônico (SH) de sua estrutura, e os grupos amina do N-terminal de aminoácidos, por meio de atrações de Van der Waals (BRUNELLE; GREEN, 2014). Com isso, podemos inferir que todos os compostos identificados em nossas frações possuem origem peptídica.

#### 4.1.2. Ultrafiltração, cromatografia de exclusão molecular e SDS-PAGE das frações de massa molecular de 5 a 10 kDa

Assim como executado para os compostos de massa molecular inferior à 5 kDa, a Figura 3 demonstra o cromatograma obtido para os compostos extraídos da ultrafiltração em membrana de 10 kDa.

**Figura 3** – Fracionamento dos componentes de massa entre 5 e 10 kDa da peçonha bruta de *B. jararacussu* em cromatografia de exclusão molecular e perfil eletroforético das frações



Cromatograma do ultrafiltrado em membrana de 10 kDa, em coluna de gel filtração Superdex Peptide® (GE Life Sciences). A corrida foi monitorada através da absorbância em 215 nm (Linha Azul) e condutividade (Linha Laranja). O material eluído foi coletado de forma automatizada, em volumes contínuos de 0,5 mL/tubo, e os picos agrupados nas 6 frações, destacadas na figura entre linhas tracejadas. O eixo  $x$  se refere ao volume, em mL, e o eixo  $y$  à absorbância, medida em mAu. As frações também tiveram seus conteúdos caracterizados por SDS-PAGE, cujo gel está inserido na imagem. Foi utilizado 25  $\mu$ g/pista. A pista PM se refere aos padrões de massa molecular: Triosefosfato Isomerase (26 kDa), Mioglobina (17 kDa),  $\alpha$ -Lactoalbumina (14,2 kDa), Aprotinina (6,7 kDa), Cadeia  $\beta$  da Insulina oxidada (3,49 kDa) e Bradicinina (1,06 kDa). Fonte: Próprio autor.

Novamente, o fracionamento do pool de ultrafiltrado resultou em 6 picos, os quais foram agrupados e denominados de Frações I a VI. A Fração I reuniu o conteúdo dos tubos 15 – 23; Fração II - tubos 24 – 28; Fração III - tubos 29 – 37; Fração IV - tubos 38 – 40; Fração V - tubos 41 – 44 e a Fração VI - tubos 45 – 59.

É possível observar pelo perfil eletroforético que as frações possuem abundância de compostos de massa molecular entre 6 e 10 kDa, tendo a Fração I os compostos com maior massa molecular (aproximadamente 8 kDa), a Fração II moléculas com cerca de 7 kDa, e as Frações III e IV apresentaram uma concentração de peptídeos com aproximadamente 6 kDa. A Fração V, diferente do que se observava para as demais Frações, possui compostos de massa molecular superior à 14 kDa, enquanto a Fração VI não apresentou nenhuma banda, podendo indicar a ausência de peptídeos, ou baixa concentração de compostos nesta fração.

#### **4.2. Prospecção dos compostos com atividade antitumoral**

Assim como descrito na literatura, buscamos iniciar a prospecção de nossos compostos através do fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* por técnicas que fossem capazes de subdividir nossa matriz já no “alvo” do estudo, os compostos de baixa massa molecular. Para isso, buscamos inovar a utilização de uma conhecida técnica de fracionamento: a ultrafiltração em membrana.

A ultrafiltração em membrana consiste em um método simples de separação de proteínas, caracterizado pela imobilização de uma membrana porosa em um tubo cônico, que ao ser centrifugada à altos níveis de rotação, atua como uma barreira permeável e seletiva, que restringe a transferência de massa entre duas fases.

Nossa abordagem se diferenciou dos relatos convencionais, pois utilizamos uma membrana com tamanho de poro igual à 5 kDa, para que obtivéssemos compostos com até esta massa molecular, e em seguida, para se concentrar um pool com compostos na faixa de massa de 5 à 10, a mesma peçonha, já ausente de moléculas inferiores à 5 kDa, foi novamente ultra filtrada em membranas com poros 10 kDa. Este passo, além de ter contribuído para a qualidade de nossas amostras iniciais, garantiu a execução de um fracionamento mais rápido e econômico, uma vez que não foi necessário utilizar as técnicas convencionais de cromatografia.

Como sugerido pela literatura, o fracionamento do pool ultrafiltrado procedeu pela cromatografia de gel filtração, porém, buscamos novamente otimizar nosso processo optando por uma coluna com fase estacionária específica para compostos de baixa massa molecular.

Observa-se para a maioria dos relatos de purificação de peptídeos o fracionamento em colunas do tipo Sephadex G50. Estas colunas, porém, apresentam como fase estacionária esferas de sílica com poros em tamanho de 50 à 150  $\mu\text{m}$ , que é um tamanho considerado grande para a separação efetiva de compostos de baixa massa. Ainda, segundo a orientação de fabricantes, estas colunas são específicas para realizar a separação de proteínas maiores que 30 kDa. A utilização destas colunas apenas se justifica pela efetividade em se separar as proteínas dos compostos de baixa massa.

Nossa metodologia de fracionamento utilizou uma coluna cromatográfica de gel filtração específica para peptídeos, a Superdex Peptide 10/300 L, a qual possui poros de tamanho reduzido (13  $\mu\text{m}$ ), sendo descrita como eficiente na separação, com alta resolução, de peptídeos e outras pequenas biomoléculas com massas moleculares entre 100 e 7000 daltons. Em pesquisas voltadas à toxilogia este tipo de coluna cromatográfica ainda é pouco utilizada. Dentre estes escassos relatos de uso, observamos que esta é uma das poucas colunas indicadas para o isolamento de compostos orgânicos da peçonha de serpentes.

Aird, 2004, conduziu estudos para a busca da distribuição e quantificação de nucleosídeos de purinas e pirimidinas na peçonha de 32 diferentes espécies de serpente, dentre elas, apenas a espécie *B. moojeni*, pertencente ao gênero *Bothrops*. Assim como observado em nossos resultados de isolamento (Figs. 2 e 3), a utilização desta coluna foi eficaz na separação dos compostos de baixa massa em diferentes frações peptídicas.

De forma geral, nossa metodologia de ultrafiltração foi capaz de isolar pools quase que unicamente com compostos com massa molecular na faixa de interesse. Ainda, a separação destes ultrafiltrados foi eficaz e capaz de eluir frações com massas moleculares quase que específicas. Ao observamos suas caracterizações no SDS-PAGE, notamos que cada fração é quase que unicamente composta por moléculas de apenas uma massa molecular.

Agora, será realizada a busca por moléculas anticâncer nestas frações pelas metodologias de “*screening*” das amostras em diferentes ensaios biológicos *in vitro*. Esta estratégia de bioprospecção já é descrita por outros pesquisadores como a mais eficaz para a identificação de peptídeos com atividade anticâncer na peçonha de serpentes (LIN, 2002).

Buscando otimizar as nossas metodologias de trabalho, aliamos o conhecimento sobre técnicas de prospecção de compostos em um produto de origem natural, às premissas dos estudos de biologia tumoral, onde se considera essencial a caracterização da ação de um composto, a testagem em diferentes linhagens tumorais, uma vez que estas possuem diferentes características genéticas que contribuem para a resistência, sensibilidade e seletividade dos alvos do estudo (FRANCHI et al., 2012).

Foram selecionadas as linhagens tumorais de tumor hepático – HepG2, tumor de próstata – DU145, tumor de mama - MDA-MB e adenocarcinoma pulmonar – A549.

As células HepG2 mantêm muitas das funções especializadas dos hepatócitos primários, tais como a secreção de enzimas envolvidas nas vias de metabolização de substâncias plasmáticas (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004; STEINKELLNER et al., 1998). Pelo uso desta linhagem, conseqüentemente, pode-se avaliar a citotoxicidade de substâncias, mas também de seus metabólitos.

DU-145 é uma linhagem clássica de tumor prostático, originada a partir de sítios de metástase, usada na maioria das investigações *in vitro*. Esta célula tem como característica a expressão de receptores de hormônios androgênicos, porém, possuem crescimento independente de hormônios (SCHNEIDER et al., 2021). Com isso, é tida como uma linhagem tumoral com importante agressividade.

A linhagem de adenocarcinoma pulmonar, A549, é a linhagem celular de câncer de pulmão humano mais comumente usada para pesquisa básica e descoberta de medicamentos. Esta linhagem se destaca por possuir resistência a drogas quimioterápicas, tais como os derivados, como a cisplatina (SARIN et al., 2017). Os mecanismos desenvolvidos para a resistência à cisplatina são complexos, e iniciado por diferentes vias, tais como a capacidade de reparo aos adutos de cisplatina-DNA, ou até mesmo à resistência às vias de morte celular induzida pela cisplatina.

A MDA-MB-231 é uma linhagem humana de adenocarcinoma mamário, que tal como a A549, é amplamente conhecida pela sua resistência aos agentes antitumorais. Estas células apresentam o fenótipo triplo negativo, referente à ausência de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e de fator de crescimento epidérmico humano, que são importantes marcadores clínicos da gravidade do tumor e alvos terapêuticos. (ENGEBRAATEN; VOLLAN; BØRRESEN-DALE, 2013). Dada a dificuldade de se implantar terapias eficazes para tumores de mama com características análogas à esta linhagem, esta se torna um importante modelo para estudo da prospecção de novos agentes anticâncer.

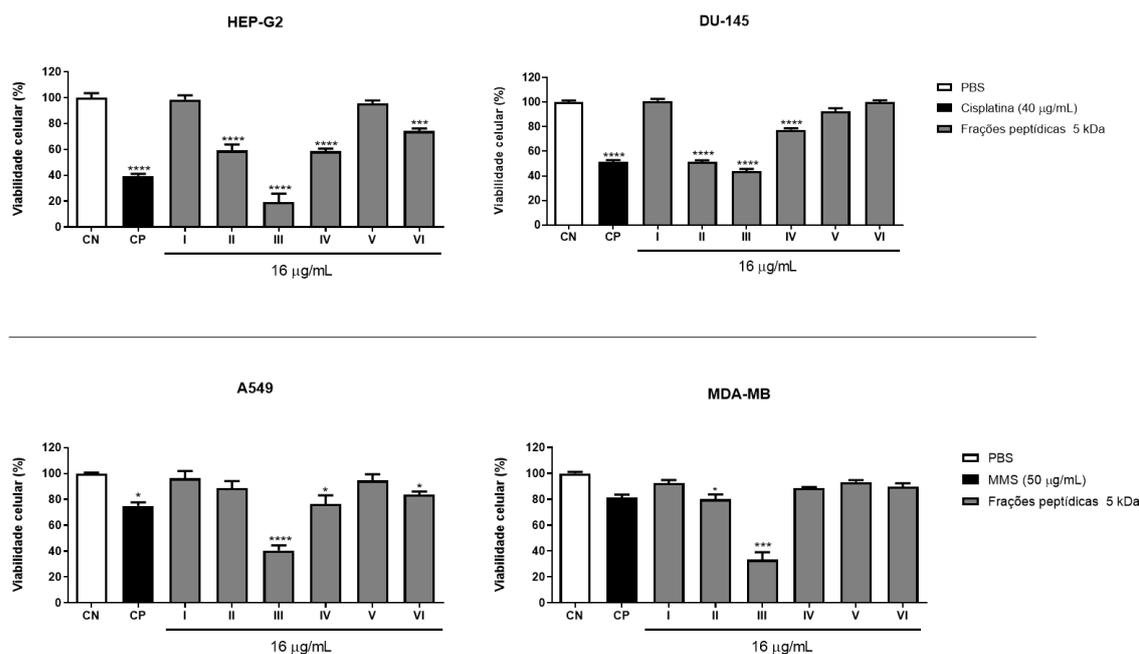
A seguir, vamos discorrer os resultados obtidos nas triagens das frações peptídicas a partir a partir do mecanismo inibitório da tumorigenese *in vitro* de Citotoxicidade, com posterior avaliação dos efeitos dos compostos ativos sob uma possível inibição da migração ou proliferação celular. A partir destes resultados, descreveremos a purificação dos compostos das frações bioativas, buscando executar suas caracterizações funcionais e estruturais.

## 4.2.1. Prospecção de compostos citotóxicos

### 4.2.1.1. Screening da atividade das frações peptídicas de até 5 kDa

Avaliação da viabilidade celular pela redução do sal de MTT, em diferentes linhagens tumorais para as frações peptídicas de até 5 kDa, como apresentado na Figura 4.

**Figura 4** – Atividade citotóxica das frações com compostos de até 5 kDa



Avaliação da citotoxicidade das frações obtidas em cromatografia de exclusão molecular, em cultura de células em microplaca ( $2 \times 10^4$  cél/poço), de linhagens de HepG2, DU-145, MDA-MB e A549, segundo o método da redução do MTT (item 3.2.3.1.). Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN), como controle positivo (CP): Cisplatina (40 µg/mL) e MMS (40 µg/mL) e amostras na concentração de 16 µg/mL. Os controles e amostras foram diluídos utilizando tampão PBS. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo tratado com frações vs controle. Fonte: Próprio autor.

Foram realizados tratamentos com os controles positivo Cisplatina, na concentração de 40 µg/mL, Metanosulfonato de metila a 50 µg/mL e frações peptídicas a 16 µg/mL. Estas concentrações foram selecionadas à partir de relatos da literatura, que as indicam como capazes de reduzir a viabilidade celular em 50%, tanto para os controles positivo (AYYANAAR et al., 2020; BOCCATO PAYOLLA et al., 2020), quanto para as frações de baixo peso molecular da peçonha de serpentes (CHONG; TAN, 2020).

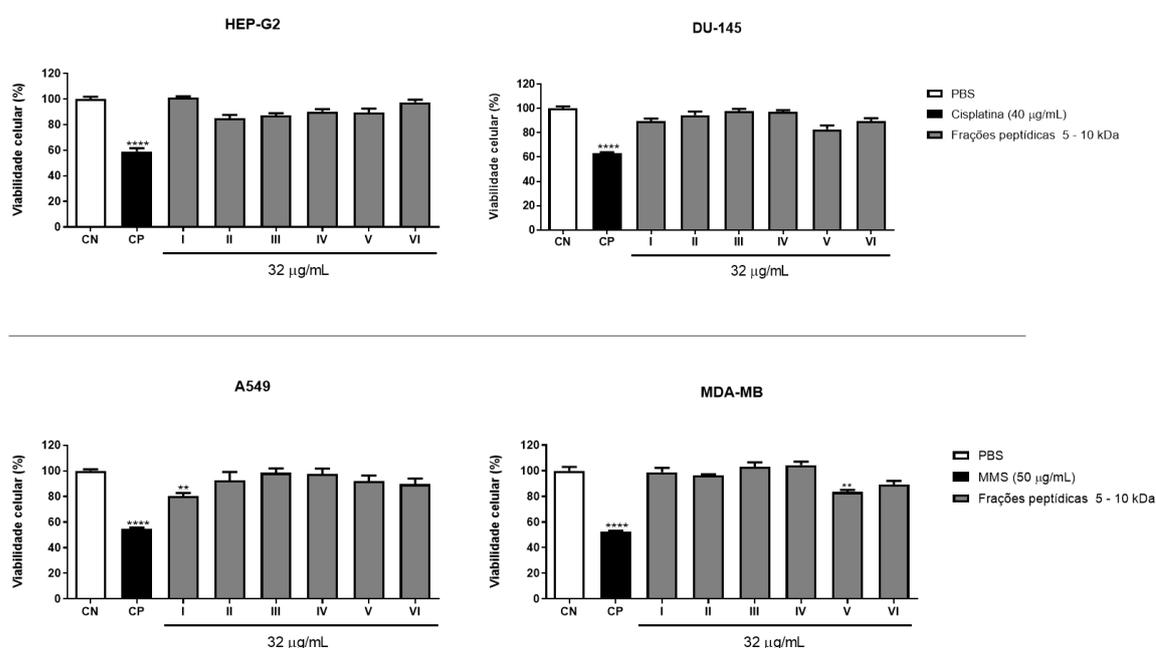
Na linhagem HepG2 verificou-se valores significativos de redução da viabilidade celular com as frações II ( $40,84 \pm 4,66\%$ ), III ( $80,64 \pm 6,34\%$ ) e IV ( $41,44 \pm 2,01\%$ ).

A linhagem DU-145 apresentou importantes índices de redução da viabilidade para as frações II ( $51,45 \pm 1,28\%$ ), III ( $56,11 \pm 1,78\%$ ) e IV ( $22,47 \pm 1,25\%$ ). A linhagem de câncer de pulmão A549, apresentou resultados significativos para as frações III ( $59,45 \pm 3,93\%$ ), IV ( $23,77 \pm 6,85\%$ ) e VI ( $16,39 \pm 2,42\%$ ), enquanto a de mama MDA-MB, induziu a redução da viabilidade celular apenas pelas frações II ( $19,84 \pm 3,69\%$ ) e III ( $76,64 \pm 5,73\%$ ).

#### 4.2.1.2. Screening da atividade das frações peptídicas de 5 a 10 kDa

A Figura 5 apresenta os resultados da avaliação da viabilidade celular pelas frações de compostos de 5 a 10 kDa pelo ensaio do MTT (item 3.2.3.1.).

**Figura 5** – Atividade citotóxica das frações com compostos de 5 a 10 kDa



Avaliação da citotoxicidade das frações obtidas em cromatografia de exclusão molecular, em cultura de células em microplaca ( $2 \times 10^4$  cél/poço), de linhagens de HepG2, DU-145, MDA-MB e A549, segundo o método da redução do MTT (item 3.2.3.1.). Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN), como controle positivo (CP) Cisplatina ( $40 \mu\text{g/mL}$ ) ou MMS ( $40 \mu\text{g/mL}$ ) e amostras na concentração de  $32 \mu\text{g/mL}$ . Os controles e amostras foram diluídos utilizando tampão PBS. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado os grupos tratados com frações vs controle. Fonte: Próprio autor.

Não foi observado valores significativos da redução da viabilidade celular para as linhagens HepG2 e DU-145. A linhagem de câncer de pulmão A549 apresentou resultados significativos para a Fração I ( $19,52 \pm 2,31\%$ ), enquanto a de mama MDA-MB, sofreu reduções no número de células viáveis apenas pela exposição à Fração V ( $16,53 \pm 3,37\%$ ).

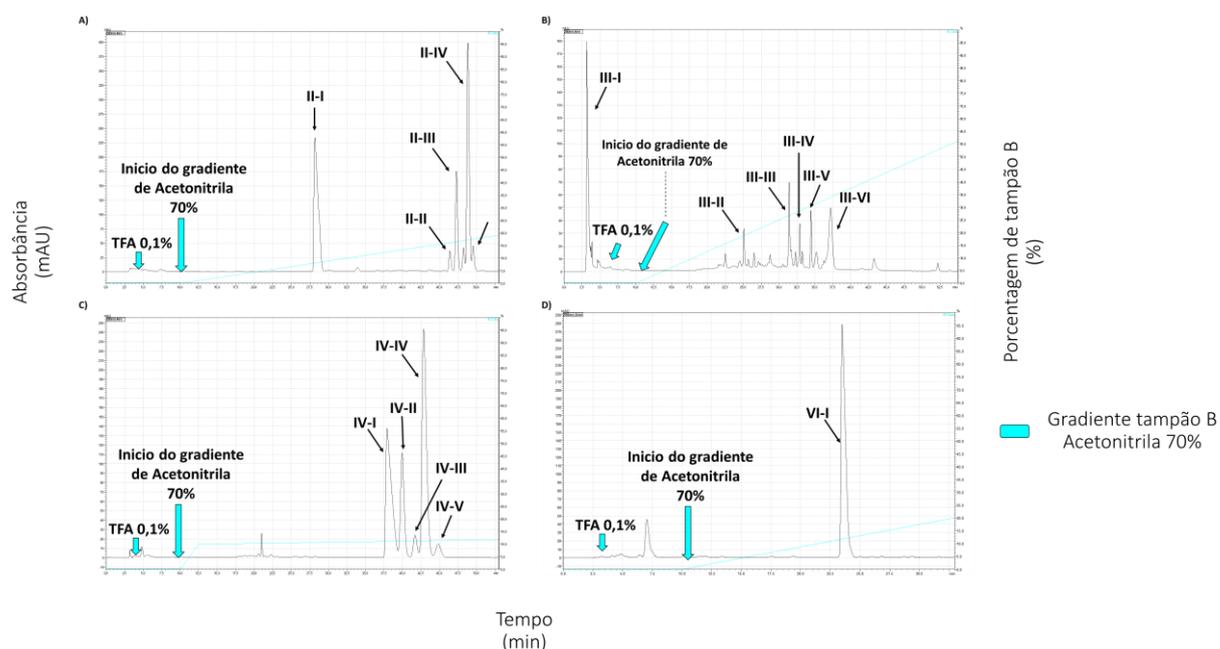
#### 4.2.2. Isolamento e identificação dos compostos com atividade citotóxica

As frações obtidas na etapa cromatográfica de exclusão molecular, e que demonstraram atividade citotóxica sob as linhagens celulares testadas (item 4.2.1.) tiveram seus componentes isolados através de cromatografia em coluna de fase reversa C18 em HPLC, em gradiente de concentração dos solventes A (TFA 0,1%) e B (acetonitrila 70%), e monitoramento da absorbância em comprimento de onda de 280 nm.

Devido à baixa atividade citotóxica observada nas frações de 5 – 10 kDa, e a expectativa segundo dados da literatura de que o potencial citotóxico de peptídeos de serpente está melhor correlacionado com moléculas de massa molecular inferior à 5kDa, a purificação das frações peptídicas foi executada apenas para as frações isoladas do ultrafiltrado em membrana de 5 kDa (MUNAWAR et al., 2011b; PÉREZ-PEINADO; DEFAUS, 2020).

A Figura 6 apresenta os cromatogramas das frações ativas de *B. jararacussu* (Js) sendo, Fração II (Fig. 6A), III (6B), IV (6C) e VI (6D), indicando os picos selecionados a como subfrações a serem investigadas, novamente pelo método do MTT.

**Figura 6** – Isolamento dos compostos das frações ativas

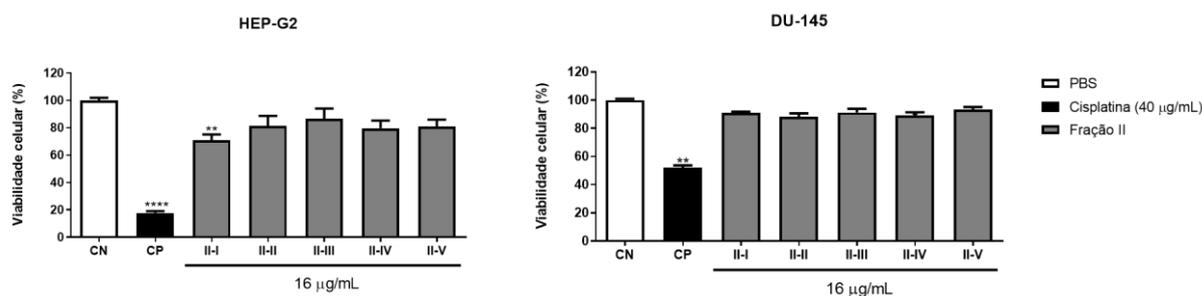


As frações com atividade citotóxica significativa no teste do MTT tiveram seus peptídeos isolados por meio de cromatografia de fase reversa em coluna C18, em gradiente de TFA 0,1% e Acetonitrila 70%. Em **A**) Isolamento dos peptídeos da Fração Js-II; **B**) Fração Js-III; **C**) Fração Js-IV; **D**) Fração Js-VI. O eixo *x* representa o tempo de corrida, em minutos, e *y*, a absorbância, medida em mAu. O gradiente de eluição utilizado foi específico para cada fração, sendo representado pela linha azul. Os eluentes isolados foram coletados de forma manual em volume variável, a depender da extensão dos picos. Fonte: Próprio autor.

#### 4.2.2.1. Fração II

O isolamento da fração II em cromatografia de fase reversa gerou 5 novas subfrações (Fig. 6A), as quais foram nomeadas com base na sua ordem de eluição. Estas são: II-I (eluída em 28 min), II-II (47 min); II-III (47,5 min); II-IV (48 min) e II-V (49 min). Estas subfrações foram testadas nas linhagens em que a fração mãe foi ativa, novamente pelo método do MTT, cujo o resultado está apresentado na Figura 7.

**Figura 7** – Atividade citotóxica das subfrações isoladas da fração Js-II



As células HepG2 e DU-145 ( $2 \times 10^4$  cél/poço) foram incubadas com  $16 \mu\text{g/mL}$  de cada subfração isolada da fração II da cromatografia de exclusão molecular, por cromatografia em fase reversa (Fig. 6). Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN) e cisplatina ( $40 \mu\text{g/mL}$ ) como controle positivo (CP). Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparado o grupo tratado com as amostras vs controle. Fonte: Próprio autor.

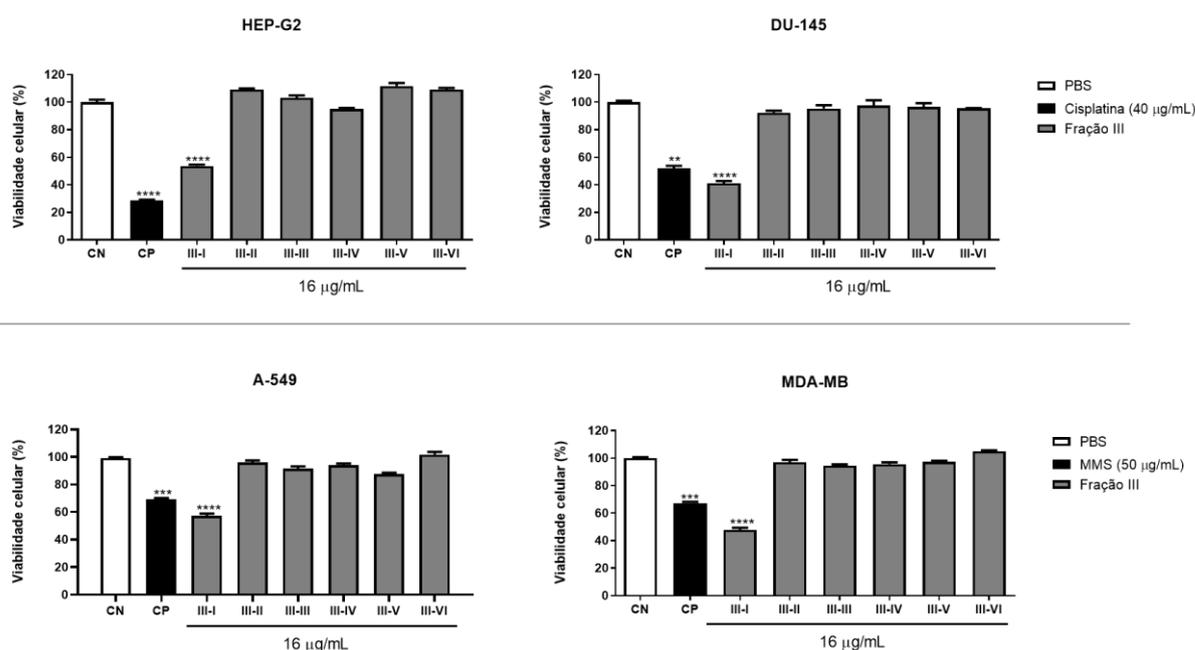
Em HepG2, apenas a subfração II-I foi capaz de reduzir a viabilidade celular, em níveis de  $24,07 \pm 2,18\%$ . Em DU-145, todas as frações apresentaram porcentagens de células viáveis semelhantes ao grupo controle negativo.

#### 4.2.2.2. Fração III

O isolamento da fração III gerou 6 novas subfrações, nomeadas: III-I (eluída em 3 min), III-II (25 min), III-III (31 min), III-IV (33 min), III-V (34 min) e III-VI (37 min), observados na Figura 6B.

Considerando que a fração III foi ativa em todas as linhagens tumorais, estas subfrações foram testadas novamente nas quatro linhagens, como apresentado na Figura 8 a seguir.

**Figura 8** – Atividade citotóxica das subfrações isoladas da fração Js-III



As células HepG2, DU-145, A549 e MDA-MB ( $2 \times 10^4$  cél/poço) foram incubadas com 16 µg/mL de cada subfração obtida da fração III, proveniente da cromatografia de exclusão molecular (Fig. 6). Foi utilizado tampão PBS como controle negativo, cisplatina (40 µg/mL) como controle positivo para as células HepG2 e DU-145, e MMS (50 µg/mL) para as células A549 e MDA-MB. Os controles e amostras foram diluídos com tampão PBS. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado o grupo tratado com as amostras vs controle. Fonte: Próprio autor.

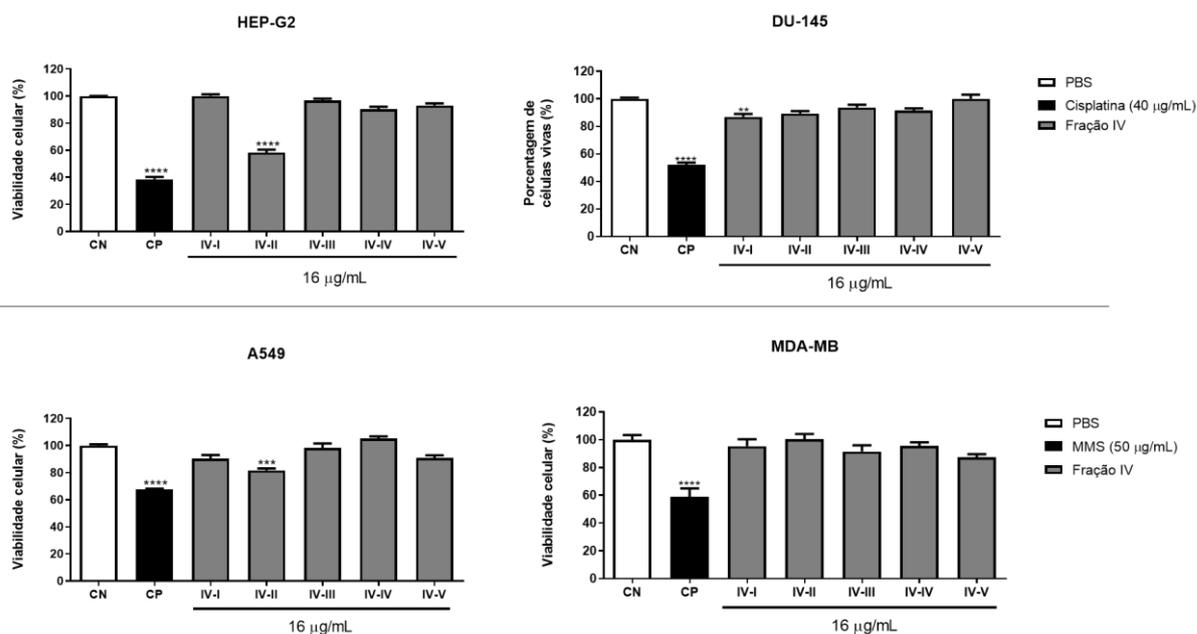
Para todas as linhagens, apenas a subfração III-I foi capaz de reduzir a viabilidade celular, tendo em HepG2 reduzido cerca de  $54,65 \pm 1,01\%$ ; DU-145 –  $69,84 \pm 1,57\%$ ; A549 –  $41,43 \pm 1,76\%$  e MDA-MB –  $52,28 \pm 1,51\%$ . Com isso, conclui-se que esta é a responsável pela ação citotóxica observada.

### 4.2.2.3. Fração IV

A fração IV gerou 5 subfrações na cromatografia de fase reversa, aptas para testagem nas linhagens em que a fração foi ativa, as quais foram nomeadas como: IV-I (eluído em 37,5 min), IV-II (39 min), IV-III (41 min), IV-IV (43 min), IV-V (44 min) (Fig. 6C).

Na Figura 9 observa-se o resultado do ensaio de MTT para estas subfrações.

**Figura 9** – Atividade citotóxica das subfrações isoladas da fração Js-IV



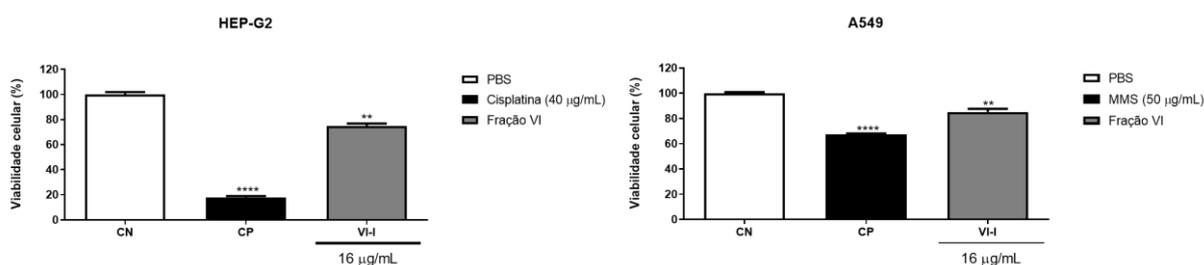
As células HepG2, DU-145, A549 e MDA-MB ( $2 \times 10^4$  cél/poço) foram incubadas com 16 µg/mL de cada subfração obtida da fração IV, proveniente da cromatografia de exclusão molecular (Fig. 6). Foi utilizado tampão PBS como controle negativo, cisplatina (40 µg/mL) como controle positivo para as células HepG2 e DU-145, e MMS (50 µg/mL) para as células A549 e MDA-MB. Os controles e amostras foram diluídos utilizando tampão PBS. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado o grupo tratado com peptídeos vs controle.

Em HepG2, apenas a subfração IV-II levou à redução da viabilidade celular ( $41,68 \pm 2,15\%$ ). Em DU-145 apenas Js IV-I ( $13,05 \pm 2,05\%$ ) apresentou este potencial. Em A549, apenas a subfração IV-II ( $19,25 \pm 1,44\%$ ) possuiu esta capacidade, enquanto em MDA-MB, nenhuma das amostras testadas demonstrou resultado sob a viabilidade celular significativamente distinto do grupo controle.

#### 4.2.2.4. Fração VI

Como observado na Figura 6D, para a fração VI foi identificado uma única subfração, denominada VI-I, e eluída em tempo de retenção de 24 min. Seu resultado no MTT está apresentado na Figura 10.

**Figura 10** – Atividade citotóxica das subfrações isoladas da fração Js-VI



As células HepG2 e A549 ( $2 \times 10^4$  cél/poço) foram incubadas com 16 µg/mL de cada peptídeo obtido da fração VI, proveniente da cromatografia de exclusão molecular. Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN); cisplatina (40 µg/mL) como controle positivo (CP) para as células HepG2, e MMS (50 µg/mL) para as células A549. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado o grupo tratado com peptídeos vs controle. Fonte: Próprio autor

A subfração Js VI-I foi testada apenas nas linhagens de tumor hepático e adenocarcinoma pulmonar, sendo capaz de reduzir a viabilidade de ambas as linhagens. Em HepG2, o número de células viáveis foi reduzido em cerca de  $25,16 \pm 1,99\%$ , em relação ao grupo controle, e em A549, a redução foi de aproximadamente  $14,80 \pm 2,46\%$ .

#### 4.2.2.5. Compostos citotóxicos e suas atividades nas linhagens tumorais

Os resultados obtidos na prospecção de compostos com atividade citotóxica nas linhagens tumorais, com as frações peptídicas ativas, foram agrupados na Tabela 2 para melhor compreensão dos dados.

**Tabela 2.** Resultados da prospecção da atividade citotóxica das frações peptídicas

		Hep G2	DU-145	A549	MDA-MB
Média da porcentagem de mortalidade em tratamento de 16 µg/mL por 24 horas					
Fração II	I	29.07	9.17		
	II	18.74	9.87		
	III	13.28	3.23	Fração inativa	Fração inativa
	IV	20.35	7.98		
	V	19.18	11.39		
Fração III	I	46.35	53.12	51.95	52.18
	II	-0.24	3.66	5.76	2.93
	III	-3.17	6.64	12.81	5.48
	IV	5.08	10.14	6.75	4.39
	V	-1.27	12.3	5.9	2.74
	VI	-1.19	5	-3.53	-5.51
Fração IV	I	-0.83	14.56	9.72	4.62
	II	41.67	16.5	18.25	-0.53
	III	3.32	1.98	1.75	8.59
	IV	9.64	5.73	-5.34	4.44
	V	6.53	9.05	9.20	12.53
Fração VI	I	25.17	Fração inativa	14.7963	Fração inativa

Fonte: Próprio autor.

A tabela destaca em verde, a média dos valores de cada amostra que foi capaz de reduzir a viabilidade das células e que foram considerados significantes em análise estatística; em preto, os valores de redução da viabilidade que não foram considerados estatisticamente significativos, e em vermelho, amostras cujos valores de viabilidade foram iguais ou maiores que a média das amostras controle.

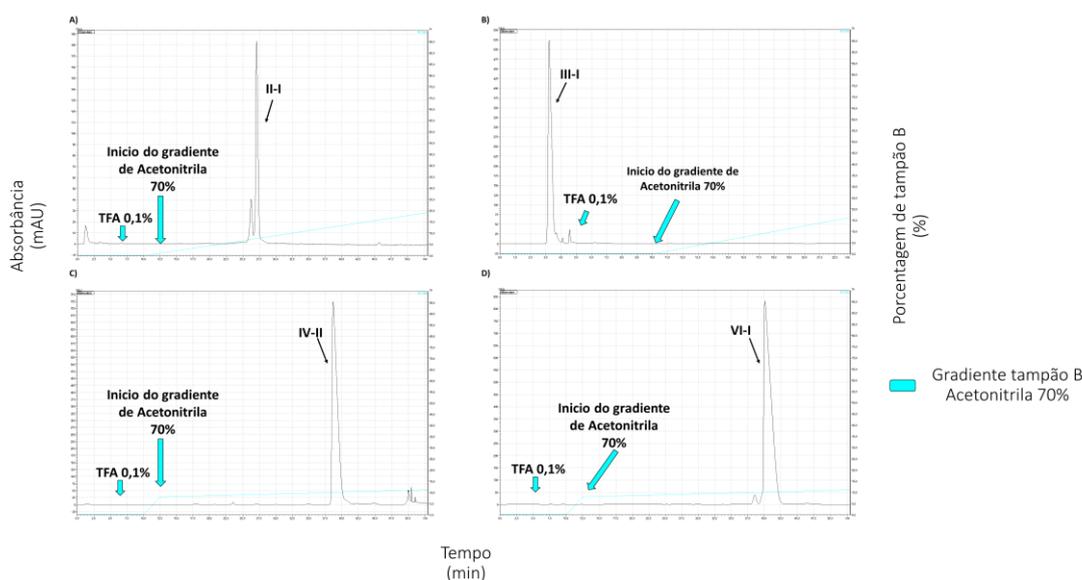
Como observado até agora, a peçonha bruta de *B. jararacussu* quando ultrafiltrada em membranas de 5 kDa e fracionada por cromatografia de exclusão molecular, se divide em 6 frações, onde apenas 4 possuem atividade citotóxica *in vitro* significativa quando testadas pelo método do MTT. Destas frações, apenas um composto em cada, foi capaz de induzir a redução da viabilidade celular, sendo a atividade de 3 destes (Js II-I, Js IV-II e Js VI-I) apenas para a linhagem de tumor hepático Hep-G2, e apenas um composto (Js III-I) foi capaz de reduzir a viabilidade das quatro linhagens tumorais testadas.

#### 4.2.2.6. Cromatografia das subfrações ativas

A fim de elucidar a ação dos compostos capazes de reduzir a viabilidade celular no ensaio de redução do MTT de forma significativa ( $\geq 15\%$ ), as subfrações Js II-I, III-I, IV-II e VI-I, foram novamente submetidos a uma cromatografia em coluna de fase reversa com poros de tamanho reduzido ( $5 \mu\text{m}$ , 2 mm ID x 25 cm, Phenomenex) garantindo o alto grau de pureza das amostras, efetividade do método de separação e confirmação da presença de um ou mais compostos, sendo esta etapa crucial para que a determinação das atividades e valores de  $\text{IC}_{50}$  sejam identificadas com precisão.

A Figura 11 apresenta os cromatogramas das 4 amostras ativas, sendo A) cromatograma da subfração Js II-I; B) Js III-I; C) Js IV-II e D) Js VI-I.

**Figura 11** – Cromatografia dos compostos com atividade citotóxica



Os compostos isolados com atividade citotóxica significativa no teste do MTT foram submetidos à uma nova cromatografia de fase reversa em coluna C18, como descrito no item 3.2.1.5. Em **A)** cromatograma da amostra Js II-I; **B)** III-I; **C)** IV-II; **D)** VI-I. O eixo  $x$  representa o tempo de corrida, e  $y$ , a absorbância, medida em mAu. O gradiente de eluição utilizado foi específico para cada fração, sendo representado pela linha azul. Os eluentes isolados foram coletados de forma manual em volume variável, dependente da extensão dos picos.

Fonte: Próprio autor

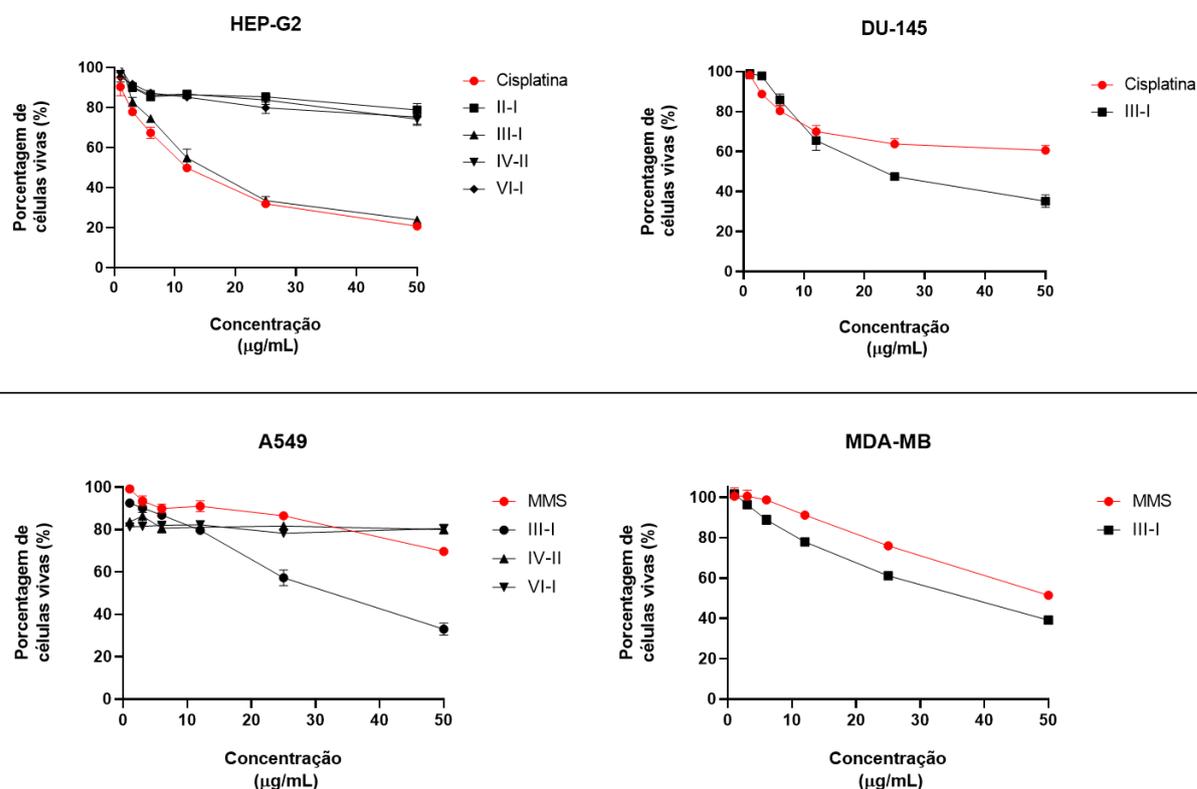
É possível notar que todas as amostras estão majoritariamente compostas por um único composto, de aspecto homogêneo e eluído sob o mesmo tempo de retenção observado na etapa anterior de purificação. Com isso, garantimos que as subfrações já se tratam de compostos isolados. Pequenas impurezas foram detectadas próximas aos picos de interesse, que quando comparadas aos cromatogramas das Frações mãe, percebe-se que se tratam dos picos adjacentes eluídos próximos ao pico de interesse.

### 4.2.3. Caracterização funcional dos compostos citotóxicos

#### 4.2.3.1. Elaboração de curvas Dose x Resposta e determinação do IC<sub>50</sub>

A curva dose resposta de cada amostra ativa e do controle positivo foi elaborada utilizando a faixa de concentração de 1 – 50 µg/mL, sobre as linhagens em que possuem atividade. Foram testados os compostos com atividade significativa em reduzir a viabilidade celular Js II-I, Js III-I, Js IV-I, Js IV-II e Js VI-I, como apresentado a seguir:

**Figura 12** – Curvas de dose x resposta dos compostos ativos nas linhagens testadas



As células HepG2, DU-145, A549 e MDA-MB ( $2 \times 10^4$  cél/poço) foram incubadas com diferentes concentrações (1 – 50 µg/mL) dos compostos isolados e da cisplatina (controle positivo) que apresentaram atividade citotóxica significativa. Foi utilizado tampão PBS como controle negativo e diluente das amostras e do controle positivo. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de dois experimentos independentes em triplicata (n = 6). Fonte: Próprio autor.

A Figura 12 evidencia que Js II-I, Js IV-II e Js VI-I não foram reprodutíveis na intensidade de sua atividade, sendo Js III-I, o único capaz de manter plena a sua atividade.

A análise estatística dos dados, pelo software GraphPad Prism 8, determinou o índice de concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>), para as amostras capazes de reduzir a viabilidade celular em ao menos 50%, incluindo os controles positivos.

Em HepG2, foram testados os 4 compostos ativos (Js II-I, III-I, IV-II e VI-I), porém, apenas a amostra Js III-I foi capaz de reduzir a viabilidade celular à pelo menos 50%, na faixa de concentração testada, inviabilizando o cálculo do IC<sub>50</sub> para os demais compostos. Neste caso, o Js III-I apresentou IC<sub>50</sub> de 10,53 µg/mL, valor inferior ao obtido para a cisplatina (11,69 µg/mL), demonstrando uma maior eficiência de nossa amostra em relação ao controle positivo.

O mesmo comportamento foi observado nas demais linhagens, onde Js III-I obteve um IC<sub>50</sub> de 12,26 µg/mL em DU-145, onde a cisplatina nem chegou a reduzir a viabilidade celular em 50%; 30,14 µg/mL em A549, e 36,44 µg/mL em MDA-MB, linhagens onde o controle positivo MMS também não foi capaz de ter seu IC<sub>50</sub> calculado, constatando que o composto III-I possui eficácia superior em reduzir a viabilidade das células em relação aos agentes antitumorais testados.

Os dados obtidos para as amostras controle corroboram com os achados da literatura, onde a cisplatina possui um IC<sub>50</sub>, em diferentes trabalhos, pertencente à faixa de concentração de 7 à 40 µg/mL na linhagem HepG2 (BOCCATO PAYOLLA et al., 2020), e na faixa de 20 à 80 µg/mL para DU-145 (ALTAF et al., 2019). O MMS é relatado como tendo valores de IC<sub>50</sub> entre 10 e 60 µg/mL em A549 (AYYANAAR et al., 2020), e de 30 à 80 µg/mL em MDA-MB (LEE et al., 2020).

A ausência da reprodutibilidade na atividade citotóxica das demais amostras pode ser um indicativo de uma influência em vias metabólicas ou relacionadas à tumorigenicidade, incapazes de serem detalhadas pelo método do MTT.

Considerando que este método tem como princípio avaliar indiretamente a modulação da viabilidade celular através da metabolização mitocondrial, o ensaio possui uma limitação em definir a origem da atividade observada. Para compreender de fato nosso resultado, planejamos a execução de análises de mecanismos de indução da morte celular, utilizando técnicas mais robustas e sensíveis, como a citometria de fluxo. Porém, uma vez que nos resultados observados, a linhagem HepG2 alvo de um maior número de compostos bioativos, e também a linhagem cujo a amostra de maior potencial citotóxico (Js III-I) apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub>, esta foi selecionada como linhagem padrão dos ensaios de investigação de mecanismo de ação.

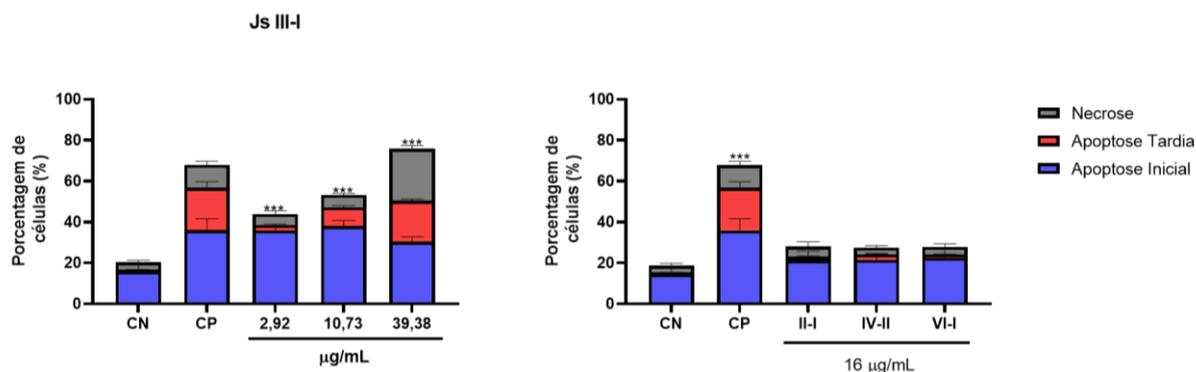
#### 4.2.3.2. Análise da indução de apoptose/necrose pelos compostos ativos

Para avaliar o mecanismo de ação dos compostos citotóxicos na redução da viabilidade celular, foram realizados experimentos por citometria de fluxo analisando as marcações de apoptose, pelo marcador Annexina V, conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), e necrose, pelo marcador iodeto de propídio.

A Annexina V é uma proteína da família das anexinas, moléculas caracterizadas pela capacidade de se ligarem à superfície de fosfolipídios (VAN ENGELAND et al., 1998), desta forma, apresenta afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana, expresso mediante estresse celular, que atua como sinal de reconhecimento de células apoptóticas para macrófagos (LANCEL et al., 2005). Embora fosse considerada como um dos pontos de não retorno da morte celular, esta não demonstra total especificidade, pois a expressão de fosfatidilserina, sem a ocorrência da permeabilidade da membrana, que possibilita a marcação nuclear, é um estresse celular passível de reversão (LEVINE; KROEMER, 2019), sendo adequado para a avaliação de morte/necrose o uso do marcador nuclear Iodeto de Propídio (PI), um agente intercalante de DNA, o qual, devido ao seu alto peso molecular, apenas consegue penetrar as células que apresentam mudanças na permeabilidade de sua membrana, característica observada no processo de necrose celular.

Estes fatos, portanto, levam à compreensão de quatro tipos de marcação nesta análise: *i.* As células apresentarem ausência de marcação, indicando que estão viáveis; *ii.* As células estarem marcadas com  $Anx^+PI^-$ , indicando um estágio de apoptose inicial, ainda reversível, pois não há aumento da permeabilidade da membrana; *iii.*  $Anx^+PI^+$ , se referindo a apoptose em estágio tardio, já irreversível; e *iv.*  $Anx^-PI^+$ , onde as células estarão em completo estado de necrose.

A análise destes parâmetros de marcação para nossos compostos com ação citotóxica ocorreu em citômetro de fluxo BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences) e os dados analisados pelo software FlowJo (BD Biosciences). A média dos resultados de três experimentos independentes, em triplicata para cada grupo experimental ( $n = 9$ ), está apresentada na Fig 13.

**Figura 13** – Análise dos níveis de apoptose/necrose em células HepG2 dos compostos ativos

As células HepG2 ( $1 \times 10^5$  cél/poço) foram incubadas com diferentes concentrações (2,92; 10,73; 39,8 µg/mL) do peptídeo ativo Js III-I, Js II-I, IV-II e VI-I (16 µg/mL), e cisplatina (11,69 µg/mL). Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN) e diluente das amostras, e do controle positivo cisplatina a 11,69 µg/mL (CP). O perfil de indução da morte celular foi avaliado sob os parâmetros de células em estágio de Apoptose Inicial, Apoptose Tardia e Necrose. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células (%)  $\pm$  EPM, representativos de dois experimentos independentes em triplicata (n = 9). Fonte: Próprio autor.

É possível observar que Js III-I é capaz de induzir a apoptose nas três concentrações avaliadas, tendo potencial para aumentar os níveis de morte celular por necrose a partir do aumento da concentração do peptídeo no meio. A concentração de 2,92 µg/mL induziu níveis de apoptose inicial igual à  $35,18 \pm 2,25\%$ ; apoptose tardia  $2,68 \pm 0,46\%$ ; necrose  $5,39 \pm 1,6\%$ . Tratamentos com Js III-I em 10,73 µg/mL induziram a apoptose inicial em  $38,06 \pm 2,71\%$ ; apoptose tardia em  $9,19 \pm 0,72\%$  e necrose  $5,94 \pm 0,85\%$ . A maior concentração avaliada, de 39,38 µg/mL, promoveu a apoptose inicial em  $30,29 \pm 2,39\%$ ; apoptose tardia  $20,16 \pm 0,78\%$  e necrose  $25,43 \pm 1,53\%$ .

Todos estes resultados apresentaram uma elevação significativa em relação aos níveis de morte celular observado para a amostra controle negativo (PBS – Apoptose inicial:  $15,77 \pm 3,81\%$ ; Apoptose tardia:  $0,95 \pm 0,08\%$  e Necrose:  $3,65 \pm 1\%$ ). Ainda, é possível observar que nenhuma das concentrações avaliadas da amostra III-I foram capazes de superar o efeito pró-apoptótico da Cisplatina (CP - Apoptose inicial:  $35,98 \pm 5,67\%$ ; Apoptose tardia:  $20,82 \pm 2,81\%$  e Necrose:  $11,08 \pm 1,81\%$ ).

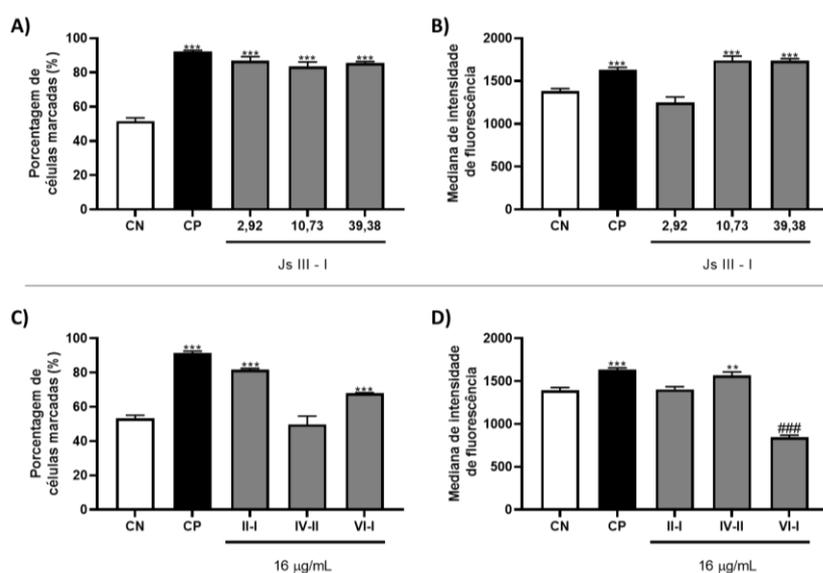
Os demais compostos capazes de reduzir a viabilidade celular na triagem pelo método do MTT, mas que não apresentaram atividade dose dependente foram avaliados quanto a indução de apoptose/necrose na mesma concentração utilizada nos experimentos de triagem (16 µg/mL). Como demonstrado na Figura 13, essas moléculas não apresentaram resultados estatisticamente significantes em relação ao grupo controle negativo (PBS).

### 4.2.3.3. Avaliação da indução de autofagia

A autofagia é o principal mecanismo catabólico celular e é desencadeado e regulado por genes relacionados à autofagia, normalmente em resposta à depleção de nutrientes no meio celular, levando à degradação de componentes citoplasmáticos e organelas em uma vesícula denominada autofagossomo. Por ser um dos principais mecanismos de morte celular programada, e consequentemente as moléculas capazes de induzir sua ativação apresentarem interesse biotecnológico como possível fármaco anticâncer, avaliamos a quantificação das vesículas autofágicas, em citometria de fluxo, utilizando o kit Autophagy Assay Kit (Sigma-Aldrich), sob as especificações do fabricante (item 3.2.3.4.).

A Figura 14 mostra o perfil de expressão dos autofagossomos em células expostas aos compostos citotóxicos, pelos parâmetros de Porcentagem de células marcadas (%) e Mediana de intensidade de fluorescência.

**Figura 14** – Avaliação da indução de autofagia em células HepG2 pelos compostos citotóxicos



As células HepG2 ( $1 \times 10^5$  cél/poço) foram incubadas com diferentes concentrações (2,92; 10,73; 39,8 µg/mL) do composto Js III-I, ou 16 µg/mL para Js II-I, IV-II e VI-I. Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN) e diluente das amostras, e meio de cultura DMEM incompleto como controle positivo (CP). Em **A)** A porcentagem de células marcadas pelo marcador de autofagossomo; **B)** A mediana de intensidade de fluorescência das células marcadas. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células marcadas (%) em unidades arbitrárias  $\pm$  EPM, respectivamente e os dados são representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). Fonte: Próprio autor.

Os resultados expressos na Figura 14A demonstram que o composto Js III-I induz aumento do número de células no processo de autofagia para todas as concentrações avaliadas (2,92  $\mu\text{g/mL}$  –  $86,83 \pm 2,35\%$ ; 10,73  $\mu\text{g/mL}$  –  $83,417 \pm 2,73\%$ ; 39,38  $\mu\text{g/mL}$  –  $85,53 \pm 0,85$  vs  $51,53 \pm 1,91\%$  do controle negativo CN). Porém, analisando os resultados de mediana de intensidade de fluorescência das marcações (Figura 14B), observamos que quando exposto às células na concentração de 2,92  $\mu\text{g/mL}$ , Js III-I é capaz de reduzir ligeiramente a quantidade de autofagossomos expressos ( $1248 \pm 65,39$  unidades arbitrárias), em relação ao observado no grupo controle negativo (CN -  $1383 \pm 29,81$ ). Quando exposto nas concentrações de 10,73  $\mu\text{g/mL}$  ( $1739 \pm 51,51$ ) e 39,38  $\mu\text{g/mL}$  ( $1736,75 \pm 23,82$ ), é capaz de potencializar a expressão dos mesmos, demonstrando ter uma ação dose-dependente.

Todos dentre os demais compostos avaliados, exceto Js IV-II ( $34,80 \pm 7,01\%$ ), são capazes de conduzir a formação de autofagossomos em um maior número de células, isto é, induzem o processo de autofagia (Figura 14C – Js II-I  $76,13 \pm 2,77\%$ ; Js VI-I  $80,15 \pm 5,43\%$  vs CN  $51,53 \pm 1,91\%$ ), porém, esta modulação, como observado pela mediana de intensidade de fluorescência em **14D**, ocorre em diferentes níveis e formas. Js II-I ( $1403,66 \pm 31,60$ ) apesar de conduzir um maior número de células à autofagia, não apresenta alterações na quantidade de autofagossomos que são produzidos em uma célula, diferentemente da amostra Js IV-II ( $1566,33 \pm 41,93$ ), a qual não altera a porcentagem de células marcadas, mas sim a quantidade de marcações em uma célula. Js VI-I ( $846,00 \pm 22,73$ ) por sua vez, aumenta a quantidade de células que produzem as vesículas autofágicas, mas estas células possuem menores quantidades de autofagossomos que as células do grupo controle ( $1383 \pm 29,81$ ).

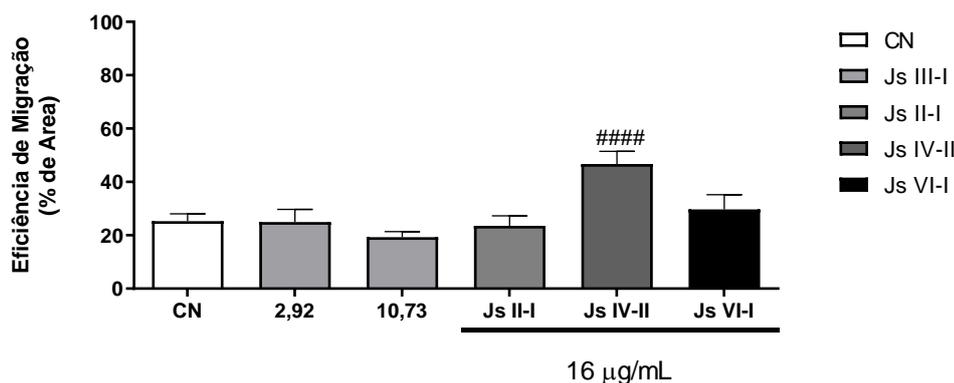
A literatura já tem como definição que compostos de baixa massa molecular da peçonha de serpentes, sobretudo os peptídeos, são capazes de induzir o processo de autofagia, tendo como alvos moleculares as vias AMPK e mTOR (MIRZAEI et al., 2021). Porém, as investigações envolvendo este mecanismo de morte celular programada e as moléculas encontradas nas peçonhas, ainda conta com um pequeno número de relatos na literatura, sendo considerada uma tendência emergente na área de Toxinologia (STRANSKY et al., 2018).

Neste aspecto, nossos resultados já impactam nossa área de conhecimento, trazendo com um caráter inédito, o isolamento de 4 compostos na peçonha de *B. jararacussu* capazes de potencializar a porcentagem de células em autofagia, bem como modular a produção de suas vesículas autofágicas.

#### 4.2.3.4. Ensaio de migração celular (*Wound Healing*) dos compostos citotóxicos

A Figura 15 apresenta a influência das moléculas isoladas a partir do filtrado de 5 kDa, com atividade citotóxica, na migração celular das células HepG2.

**Figura 15** – Influência dos compostos citotóxicos na migração celular de células HepG2



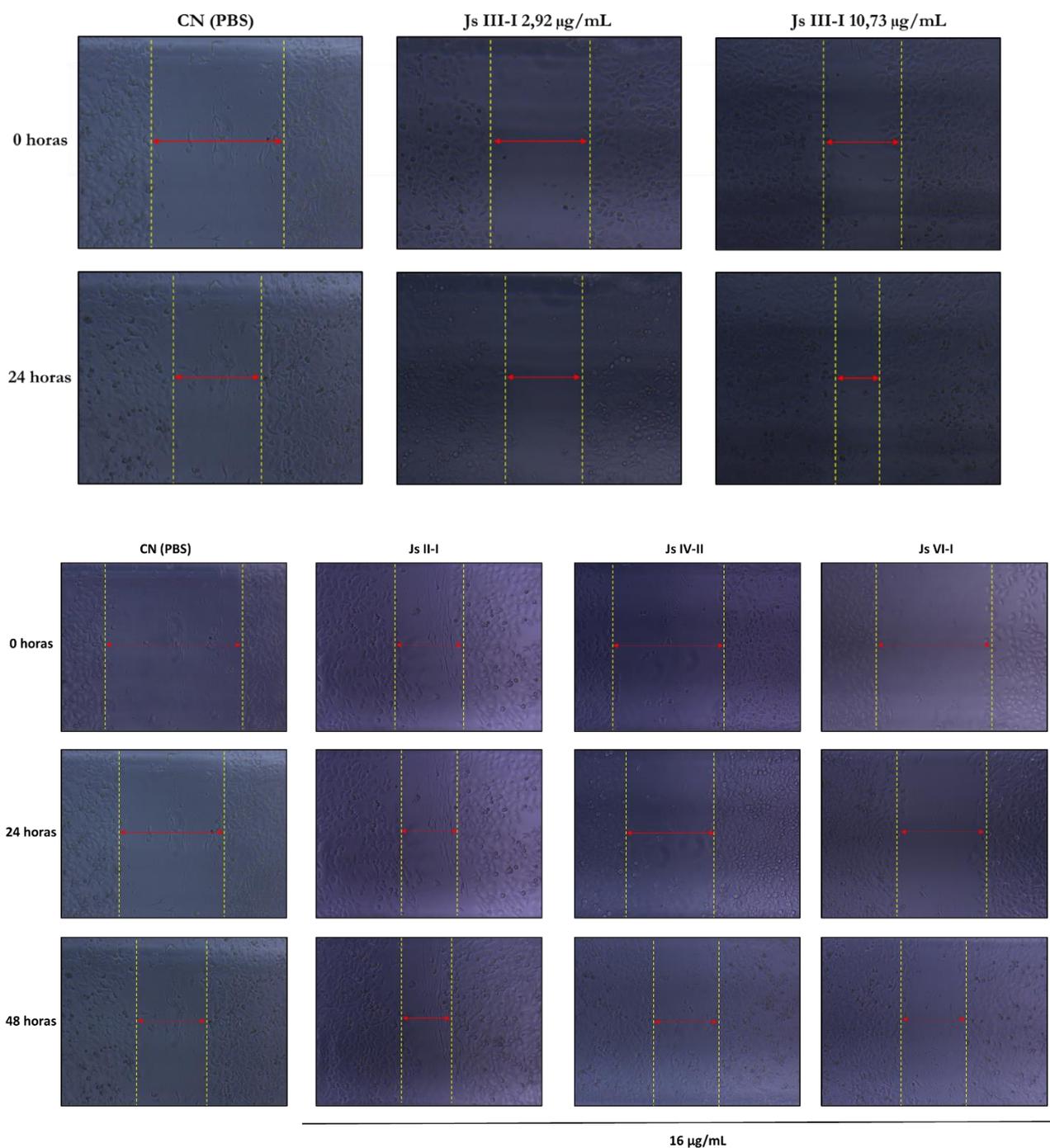
As células HepG2 ( $2 \times 10^4$  cél/poço) foram incubadas com 2,92 ou 10,73  $\mu\text{g/mL}$ , de Js III-I, ou com 16  $\mu\text{g/mL}$  de Js II-I, IV-II e VI-I. Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN). A Eficiência de Migração foi calculada em relação ao preenchimento da área da ranhura pelas células. Os resultados estão expressos em Porcentagem de área (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ).  
Fonte: Próprio autor.

Os resultados demonstram que não há diferença estatística entre nenhum grupo experimental (Js III-I 2,92  $\mu\text{g/mL}$  –  $24,99 \pm 4,74\%$ ; 10,73  $\mu\text{g/mL}$  –  $19,32 \pm 2,07\%$ ; Js II-I –  $23,57 \pm 3,74$ ; Js IV-II –  $46,74 \pm 4,72$ ; Js VI-I –  $29,72 \pm 5,4$ ), e o grupo controle ( $25,27 \pm 2,78\%$ ). Isto demonstra que nossos compostos citotóxicos não exercem nenhuma atividade capaz de reduzir a motilidade das células tumorais *in vitro*. Nota-se ainda, que Js IV-II, resultou em um aumento na eficiência de migração celular, mas não se tratando de uma atividade antitumoral, este potencial não foi extensamente explorado.

A amostra Js III-I, a qual foi testada em três diferentes concentrações em todas as análises do projeto, não pôde ser avaliada em sua maior concentração (39,38  $\mu\text{g/mL}$ ), devido ao seu caráter altamente citotóxico, que acabou por induzir a morte das células durante o ensaio.

A seguir, na Figura 16, estão apresentados um exemplar de imagem de cada grupo experimental avaliado neste ensaio:

**Figura 16** – Banco de imagens do ensaio de *Wound healing* com os compostos citotóxicos

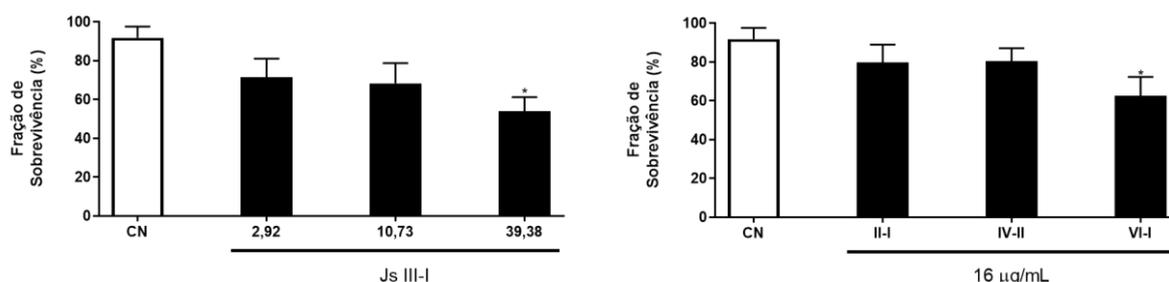


A influência dos compostos citotóxicos na migração celular de células HepG2 foi realizada pelo método do *Wound healing*, onde se avaliou a recuperação da área de uma ranhura na monocamada celular, destacada pelas barras vermelhas e tracejado amarelo, no tempo de 24 horas. Foram capturadas apenas 1 foto por poço. A área de migração das imagens foi avaliada pelo software ImageJ, totalizando a análise de 9 imagens por grupo experimental (n = 9). Fonte: Próprio autor.

#### 4.2.3.5. Avaliação da modulação da proliferação celular pelos compostos citotóxicos

O último mecanismo de ação capaz de alterar a tumorigenicidade, avaliado para estes compostos citotóxicos, foi o de modulação da proliferação celular, pelo ensaio de sobrevivência clonogênica. O resultado gráfico da análise está expresso na Figura 17.

**Figura 17** – Influência dos compostos citotóxicos na proliferação celular de células HepG2



As células HepG2 ( $2 \times 10^4$  cél/poço) foram incubadas com diferentes concentrações (2,92; 10,73; 39,8 µg/mL) de Js III-I, ou Js II-I, IV-II e VI-I (16 µg/mL). Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN). Após exposição, as células foram desaderidas e semeadas em placas de 6 poços na concentração de 150 cél/poço. Após 7 dias, o número de colônias viáveis foi avaliado por microscopia. Os resultados estão expressos em Fração de Sobrevivência (%)  $\pm$  EPM e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata (n = 6).

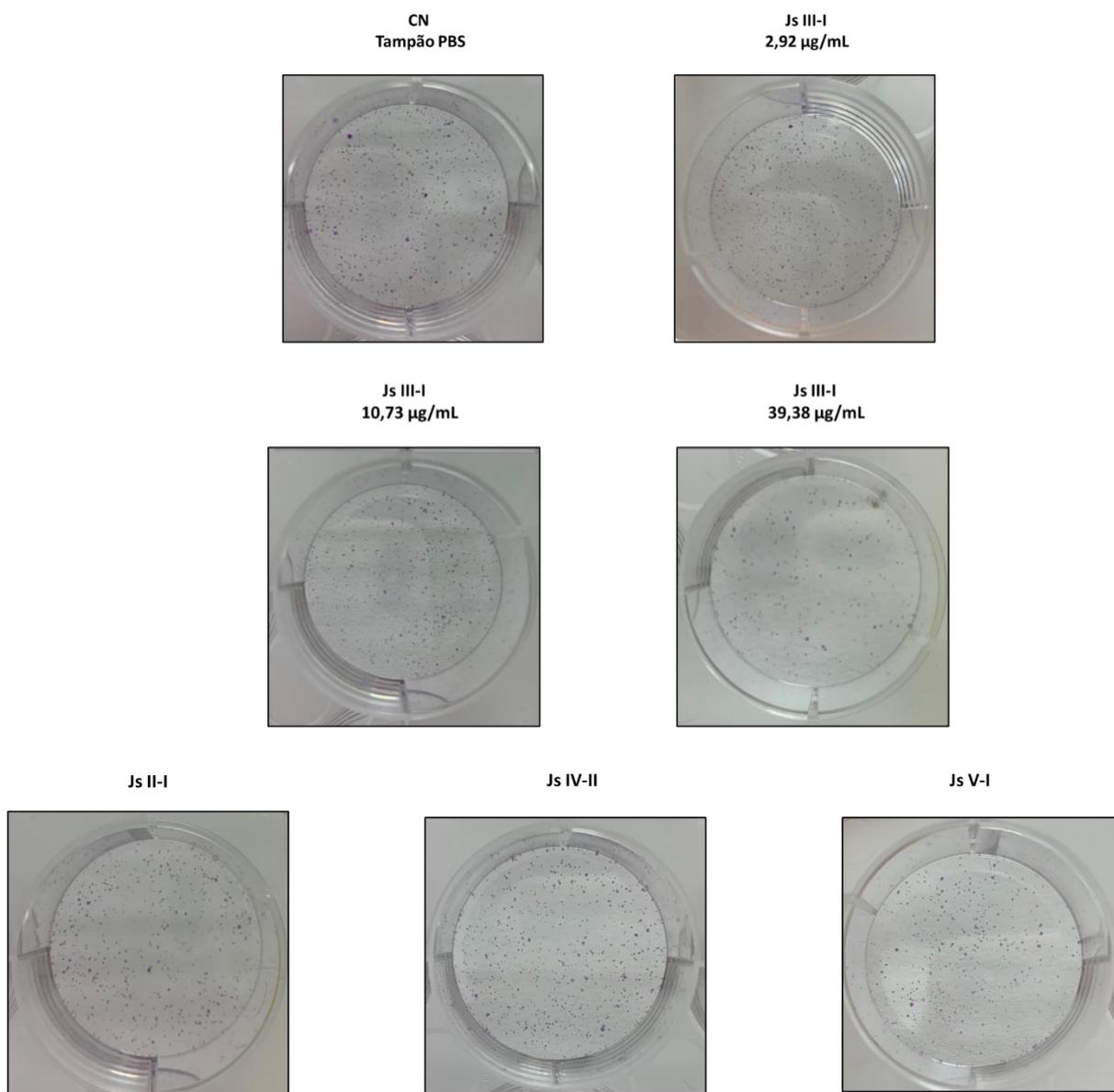
Os resultados evidenciam que Js III-I é capaz de reduzir a sobrevida das células HepG2 com o tratamento na concentração de 39,38 µg/mL ( $54,05 \pm 7,13\%$ ) em relação ao grupo controle ( $91,75 \pm 5,84\%$ ). As menores concentrações avaliadas para Js III-I, 2,92 ( $71,42 \pm 9,66\%$ ) e 10,73 µg/mL ( $68,26 \pm 10,45\%$ ) apesar de apresentarem tendência de diminuição da fração de sobrevivência, não apresentam resultados estatisticamente significantes.

Dentre as demais amostras, apenas Js VI-I ( $62,50 \pm 9,79\%$ ) foi capaz de alterar significativamente a sobrevida das células, reduzindo a porcentagem de células que sofreram o processo de proliferação após a exposição. Js II-I ( $79,60 \pm 9,25\%$ ) e Js IV-II ( $80,26 \pm 6,88\%$ ) apresentaram resultados semelhantes ao grupo CN ( $91,75 \pm 5,84\%$ ).

Os relatos na literatura acerca de compostos de baixa massa molecular de peçonhas de serpente, com ação antiproliferativa em ensaios de sobrevivência clonogênica ainda se apresentam muito escassos, sendo a Nubeina, um peptídeo isolado da peçonha de *Naja nubiae*, um dos únicos exemplos (ABDEL-GHANI et al., 2019). Este peptídeo, isolado a partir do fracionamento da peçonha em coluna Sephadex G50 e purificação em cromatografia de fase reversa, apresenta atividade citotóxica a linhagens tumorais de melanoma humano A375 e carcinoma ovariano A2780, com respectivos valores de  $IC_{50}$  no ensaio do MTT de 0,5 e 1,25 µM. Após sua exposição às células, até mesmo com valores inferiores ao seu  $IC_{50}$ , a Nubeina é capaz de reduzir significativamente a formação de novas colônias.

Consideramos que esta escassez de informações acerca do ensaio de sobrevivência clonogênica um importante ponto de inserção de novos estudos na área de Toxinologia. Buscamos pela realização deste experimento, não só melhor compreender a ação de nossos compostos, mas também contribuir exemplificando, como a seguir, a forma em que as imagens a serem analisadas foram obtidas:

**Figura 18** – Banco de imagens do ensaio de sobrevivência clonogênica com os compostos citotóxicos



A influência dos compostos citotóxicos na proliferação celular de células HepG2 foi realizada pelo método de Sobrevivência Clonogênica. Neste ensaio, através da fixação e coloração de células com o corante Giemsa, foi avaliado com microscópio ótico o número de colônias viáveis, isto é, que foram capazes de proliferar e possuíam valor superior a 50 células. Foram analisadas apenas 1 contagem por poço. Fonte: Próprio autor.

#### 4.2.4. Ensaios de toxicogenômica

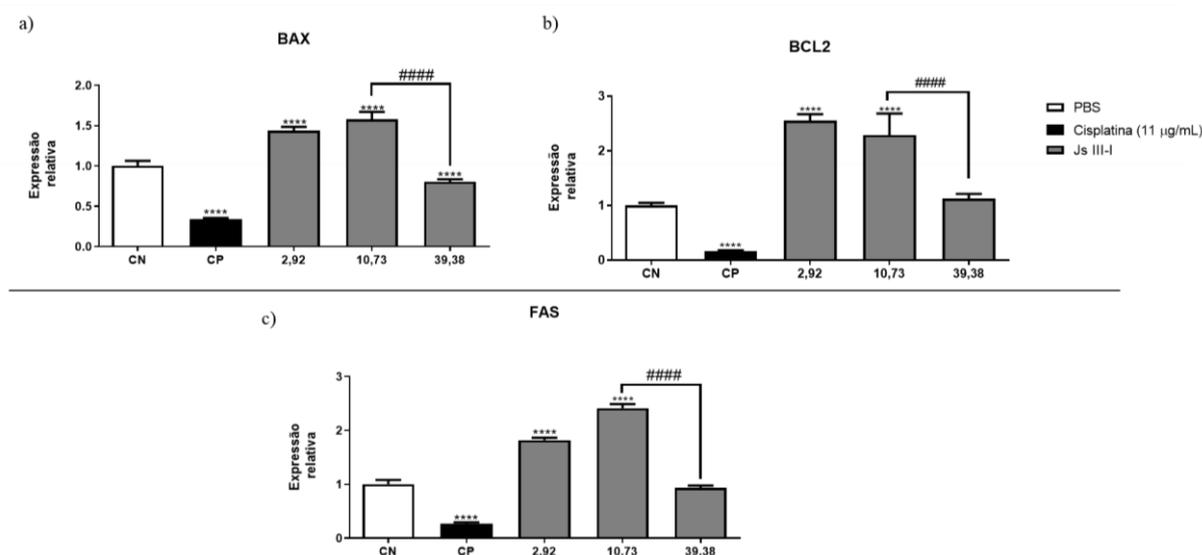
##### 4.2.4.1. Avaliação das vias gênicas de morte celular induzida por Js III-I

Para entender o mecanismo de ação do composto com maior potencial citotóxico, Js III-I (Fig. 13) foi avaliada a influência do referido composto nas vias gênicas de morte celular, através de ensaios toxicogenômicos (Fig. 19). Os compostos Js II-I, IV-II e VI-I não apresentaram resultado significativo de indução de apoptose ou necrose (Fig. 13),

Inicialmente, foram avaliadas as modulações causadas pelo agente nas principais vias gênicas de morte celular (BAX, BCL-2 e FAS), pela metodologia de RT-PCR, descrita no item 3.2.6.1.

A figura 19 apresenta o perfil de expressão dos principais genes pró-apoptóticos (BAX, BCL-2 e FAS), correlacionando a eficiência de amplificação do cDNA do gene alvo com a taxa de expressão do gene de referência, ACTB – Expressão Relativa.

**Figura 19** – Perfil de expressão dos genes FAS, BAX e BCL-2 por PCR em tempo real em HepG2



As células HepG2 foram tratadas com 2,92; 10,73 ou 39,38 µg/mL do composto citotóxico Js III-I. O cDNA destas células foi obtido e submetido à reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), avaliando o perfil de expressão dos principais genes envolvidos no processo de apoptose: a) BAX, b) BCL-2 e c) FAS. O gene da proteína β-actina (não apresentado) foi utilizado como gene de referência. Os resultados estão expressos pela média ± SD para dois experimentos independentes (n = 6). Fonte: Próprio autor.

Para o gene BAX, o controle positivo gerou expressão relativa de  $0,34 \pm 0,01$ , enquanto os grupos experimentais de Js III-I obtiveram:  $2,92 \mu\text{g/mL} - 1,44 \pm 0,04$ ;  $10,73 \mu\text{g/mL} - 1,57 \pm 0,09$ ;  $39,38 \mu\text{g/mL} - 0,81 \pm 0,03$ . Na análise de BCL-2: CP  $- 0,17 \pm 0,01$ ; Js III-I  $2,92 \mu\text{g/mL} - 2,55 \pm 0,12$ ;  $10,73 \mu\text{g/mL} - 2,29 \pm 0,39$ ;  $39,38 \mu\text{g/mL} - 1,13 \pm 0,08$ . E para o último gene avaliado, FAS: CP  $- 0,27 \pm 0,03$ ; Js III-I  $2,92 \mu\text{g/mL} - 1,82 \pm 0,05$ ;  $10,73 \mu\text{g/mL} - 2,41 \pm 0,08$ ;  $39,38 \mu\text{g/mL} - 0,93 \pm 0,05$ .

Observa-se que o perfil de expressão dos três genes foi semelhante, tendo um aumento expressivo para as células tratadas com Js III-I nas concentrações de  $2,92$  e  $10,73 \mu\text{g/mL}$ , enquanto em sua maior concentração ( $39,38 \mu\text{g/mL}$ ), e também para o controle positivo (Cisplatina  $11 \mu\text{g/mL}$ ), nota-se uma redução da expressão relativa dos genes alvo. Este evento é comum e denota ao que observamos no ensaio de apoptose x necrose (Fig. 13), quando expostas às concentrações mais brandas do composto bioativo, as células HepG2 passam a ativar o processo de apoptose, aumentando a expressão dos genes investigados. Quando na maior concentração testada, ou expostas ao controle positivo, a porcentagem de células em necrose cresce exponencialmente, causando uma morte abrupta e impedindo a expressão dos genes relacionados à morte celular programada.

Outras toxinas estudadas por nosso grupo de pesquisa demonstraram induzir o mesmo perfil de expressão gênica em células tumorais, porém, estes relatos se referem a proteínas. A MjTX-I, uma fosfolipase A2 isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, apresenta a capacidade de exercer citotoxicidade seletiva contra células de linhagem tumoral leucêmicas, com baixa toxicidade para células não tumorais. Quando avaliada a expressão dos genes relacionados às vias de morte celular para as células expostas a  $6,25 \mu\text{g/mL}$  dessa toxina, foi possível notar uma supregulação dos genes BAX e BCL-2, mas, ao serem expostas à uma concentração de  $12,5 \mu\text{g/mL}$ , observamos a redução dos níveis de BAX e BCL-2, inferior até mesmo em relação aos níveis do grupo controle (BENATI et al., 2018).

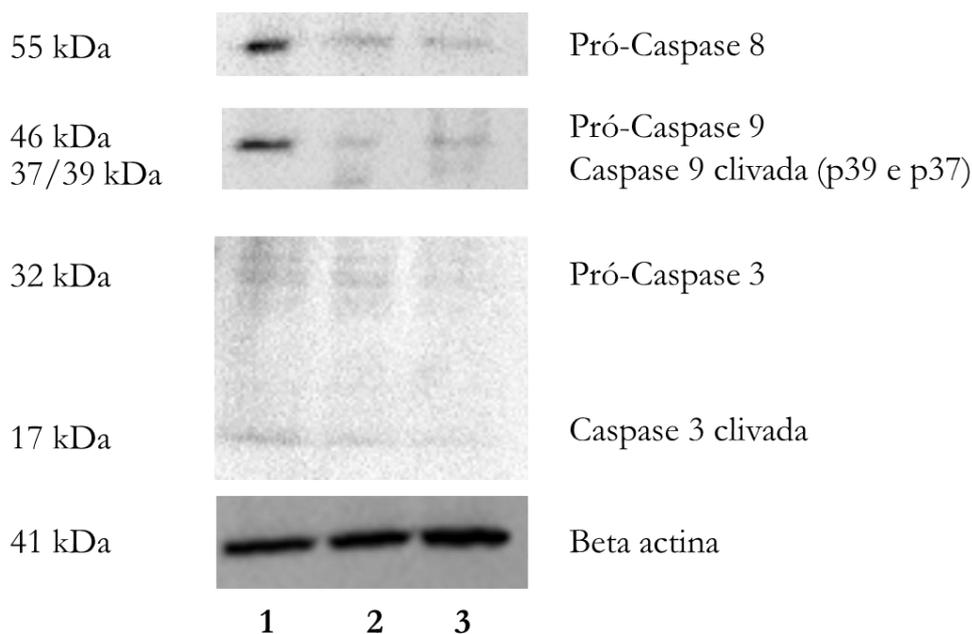
Outras moléculas de baixa massa molecular apresentaram ação similar ao nosso composto. O peptídeo NN-32, uma cardiotoxina com ação citotóxica evidenciada pelos métodos do MTT e Anx/PI, isolada da peçonha de *Naja naja*, também foi capaz de modular a expressão de BAX e BCL-2 em células HepG2, contribuindo para a promoção da apoptose, a partir de uma exposição a  $3 \mu\text{g/mL}$ , durante o tempo de 12 horas (DAS et al., 2011).

Em suma, os achados demonstram que Js III-I modulou tanto os genes pró como anti-apoptóticos na linhagem de hepatocarcinoma, em uma ação que dependeu da dose empregada no tratamento das células. Em combinação com resultados a seguir, serão de extrema importância para o reconhecimento da via de apoptose induzida pelo composto.

#### 4.2.4.2. Detecção da expressão proteica por *Western blot*

Foram investigadas a modulação na expressão das principais enzimas responsáveis pela efetuação do processo de apoptose, as caspases 3, 8 e 9, pela técnica de *Western blot*, segundo (COSTA et al., 2017). Os resultados obtidos na análise são apresentados na Figura 20.

**Figura 20** – Perfil de expressão das caspases 3, 8 e 9 das células HepG2 por *Western blot*



As células HepG2 foram tratadas com 2,92; 10,73 ou 39,38  $\mu\text{g/mL}$  do composto citotóxico Js III-I. Após a lise celular, o conteúdo proteico foi obtido e submetido ao Western blot para detecção das principais enzimas envolvidas nas vias apoptóticas (Caspases 3, 8 e 9). Em 1) Tampão PBS, 2) Cisplatina 11  $\mu\text{g/mL}$  e 3) Js III-I 10,73  $\mu\text{g/mL}$ . A revelação da imunorreatividade foi realizada por quimiluminescência com tempo de exposição de 60 segundos. Fonte: Próprio autor.

O tratamento das células Hep-G2 com diferentes concentrações de Js III-I estimulou a ativação das Caspases 3 e 9, sendo possível identificar na Figura 20 suas formas zimogênicas e clivadas. A Pró-Caspase 8, embora apareça em menor concentração em relação ao grupo da pista 1 (células tratadas com tampão PBS), não foi detectada em sua forma ativada, demonstrando que o peptídeo Js III-I não atua de modo a induzir a via apoptótica desta enzima. O mesmo resultado foi observado para o controle positivo cisplatina, com a ativação das caspases 3 e 9, e redução relativa da pró-caspase 8 em relação ao grupo controle.

As caspases são proenzimas citosólicas, pertencentes à família das Cisteína proteases, as quais em sua forma ativa tem a capacidade de catalisar a ativação de outras caspases, gerando uma cascata de sinalização que culmina na ativação da apoptose. Dentre estas enzimas, há uma classificação segundo a atividade que elas desempenham na via apoptótica. As caspases-8 e 9, por exemplo, são classificadas como Iniciadoras, por darem início à sinalização das vias extrínseca e intrínseca, respectivamente, enquanto, as caspase-3, que se encontra distal ao início da cascata, é classificada como efetora.

A caspase-3 é ativada pela clivagem proteolítica promovida pela caspase-9, devido a isso, está associada à via intrínseca de apoptose. Porém, em sua função, é responsável por ativar também a enzima caspase-8.

Confrontando essas informações com nossos dados, consideramos que Js III-I atue induzindo a morte celular pela ativação da via intrínseca de apoptose, uma vez que observamos no *western blot* a presença da caspase iniciadora desta via (Caspase 9) em sua forma clivada. Embora seja possível ver uma redução dos níveis de pró-caspase 8, indicando a ativação da via extrínseca de apoptose, em relação à amostra controle, não foi possível observar em nossos resultados a forma clivada da referida enzima, levando-nos a acreditar, que caso haja a ativação desta enzima, ocorre de forma inferior às outras caspases avaliadas, provavelmente, por ação da Caspase-3 ativada.

Estes dados se correlacionam com o observado no ensaio de RT-PCR, pois o balanço entre a expressão de proteínas BAX e BCL-2, é o que regula a via de apoptose intrínseca (WESTABY et al., 2022).

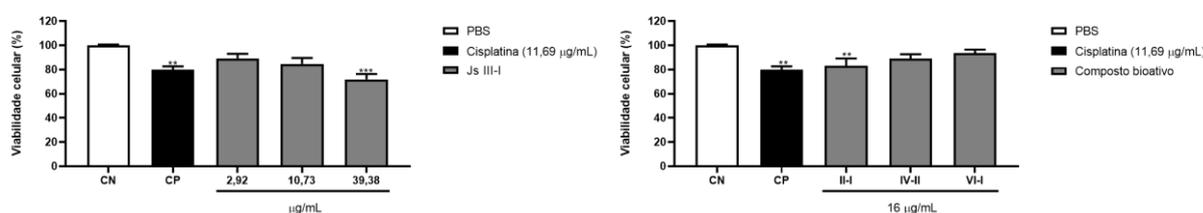
A expressão do gene FAS, que por sua vez, está mais relacionada à via extrínseca de apoptose, também foi encontrada elevada após o tratamento com Js III-I, mas não impactou diretamente o resultado observado no *western blot*. O gene Fas é codificante de um receptor de membrana homônimo, responsável por interagir com moléculas da família do fator de necrose tumoral (TNF), e a partir de tais interações, se trimerizar com domínio de morte (FADD) e a enzima caspase-8, formando o complexo indutor da via extrínseca de apoptose. Quando não acompanhada do aumento na expressão de caspase-8, a literatura explica que a ativação do gene FAS deve ter sido impulsionada pelo estresse oxidativo causado própria via intrínseca de apoptose (DENNING et al., 2002; ZACKS et al., 2004). Porém, esta explicação é apenas teórica, e a elucidação desta regulação gênica para o composto analisado deveria ocorrer pela realização de novos experimentos, traçando diferentes concentrações e tempos de tratamento de Js III-I, e avaliando a liberação de espécies reativas de oxigênio, o que não fazia parte de nosso objetivo inicial, mas, será realizado posteriormente.

### 4.3. Avaliação da toxicidade dos compostos ativos

#### 4.3.1. Atividade citotóxica dos compostos ativos sobre células normais (PBMC)

Foi utilizado o método do MTT para a avaliação da toxicidade dos peptídeos em PBMC, sob as mesmas condições utilizadas para as células de linhagem tumoral (item 3.2.3.1). A Cisplatina foi utilizada como controle positivo na concentração de  $IC_{50}$  da linhagem de tumor hepático HepG2 ( $11,69 \mu\text{g/mL}$ ). Os resultados estão expressos em porcentagem de células viáveis na Figura 21.

**Figura 21** – Atividade citotóxica dos compostos ativos, em células normais (PBMC)



Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos ativos em PBMC ( $2 \times 10^4$  cél/poço) segundo o método do MTT. Foi utilizado tampão PBS como controle negativo (CN) e cisplatina ( $11,69 \mu\text{g/mL}$ ) como controle positivo (CP). Os controles e amostras foram diluídos utilizando tampão PBS. Os resultados estão expressos em Porcentagem de células vivas (%)  $\pm$  EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata ( $n = 9$ ). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado o grupo tratado com peptídeos vs controle. Fonte: Próprio autor.

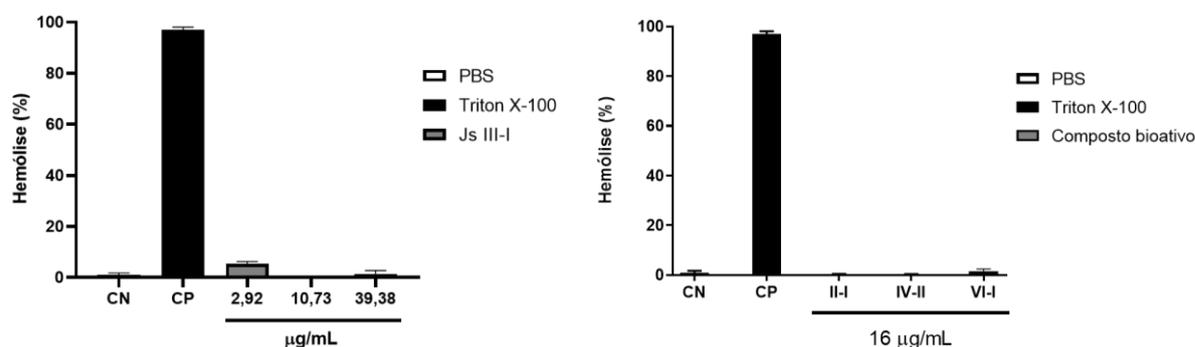
A indução de morte celular foi observada para Js II-I ( $16,76 \pm 6,03\%$ ) e Js III-I ( $28,1 \pm 4,41\%$ ), apenas na concentração de  $39,38 \mu\text{g/mL}$  ( $28,1 \pm 4,04\%$ ). A Cisplatina obteve citotoxicidade significativa, levando à redução da viabilidade de  $19,99 \pm 2,66\%$  das células.

Os valores observados garantem uma baixa toxicidade dos compostos avaliados às células saudáveis, uma vez que sua ação sob as células tumorais na mesma concentração induz a morte massiva da cultura. Os resultados desempenhados pelo controle positivo (Cisplatina) correspondem aos achados da literatura, uma vez que sua faixa de  $IC_{50}$  para as células de sangue periférico, no ensaio do MTT, exibe valores na faixa de  $30$  a  $120 \mu\text{g/mL}$ , à depender do tipo de cisplatina empregada no ensaio (uso científico ou de uso comercial) (ELLAHIQUI; PRASHAR; GÓMEZ-RUIZ, 2017; HAVELEK et al., 2012).

### 4.3.2. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica permite uma avaliação preliminar da toxicidade dos compostos bioativos em estudo frente aos eritrócitos. Este ensaio seguiu o protocolo descrito por DEIBLER et al., (1959), onde a atividade hemolítica dos compostos bioativos foi determinada por meio da leitura de absorvância (A) da hemoglobina liberada pelas hemácias tratadas, em comprimento de onda de 405 nm, utilizando leitor de microplaca (BioTek, modelo Epoch).

**Figura 22** – Atividade hemolítica dos compostos bioativos



Avaliação da atividade hemolítica dos peptídeos ativos foi realizada em microplaca, utilizando 100 µL de uma suspensão de hemácias 1% (v/v). O tensoativo Triton X-100 1% (v/v) foi utilizado como controle positivo (CP). Os controles e amostras foram diluídos utilizando tampão PBS. Os resultados estão expressos em Porcentagem de Hemólise (%) ± EPM, representativos de três experimentos independentes em triplicata (n = 9). A análise estatística foi realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 quando comparado o grupo tratado com peptídeos vs controle. Fonte: Próprio autor.

Como apresentado na Figura 22, o composto Js III-I foi avaliado em três diferentes concentrações, já as demais moléculas (Js II-I, IV-II e VI-I) foram testadas na concentração de 16 µg/mL.

Js III-I induziu porcentagens de hemólise iguais a  $5,30 \pm 0,95\%$ , na concentração de 2,92 µg/mL;  $0,02 \pm 0,01\%$  para 10,73 µg/mL; e  $1,35 \pm 1,12\%$  para 39,38 µg/mL. Js II-I foi capaz de induzir  $0,237 \pm 0,85\%$ ; Js IV-II  $0,21 \pm 0,17\%$ ; e Js VI-I  $1,56 \pm 0,86\%$ .

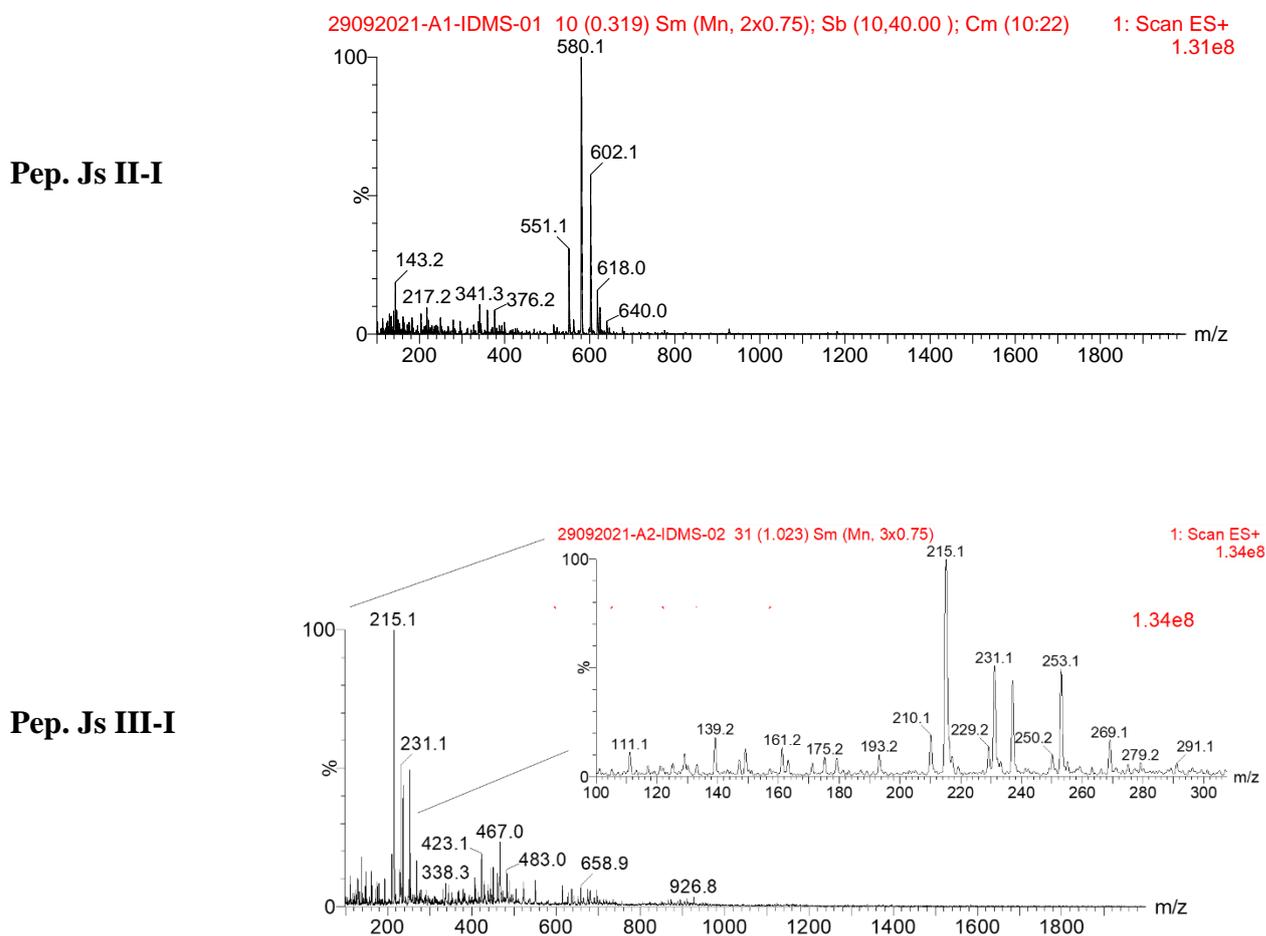
Desta forma, observamos que nenhum dos compostos isolados, com ação antitumoral, apresentam atividade hemolítica, nas concentrações avaliadas. Este é um importante achado, pois a literatura informa que a atividade de permeabilização de membrana por peptídeos de serpente, sobretudo os pertencentes às famílias catiônicas, está intimamente ligada à atividade hemolítica. Uma vez que nossos resultados não apresentam atividade hemolítica, podemos inferir que nossos compostos não compartilham das características desta classe de moléculas citotóxicas.

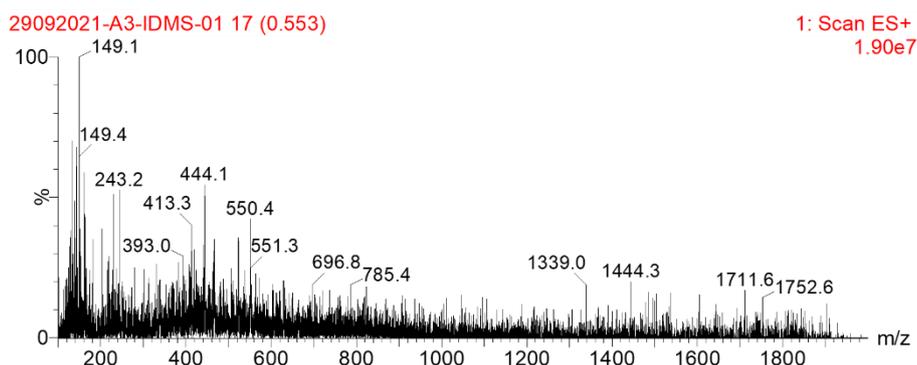
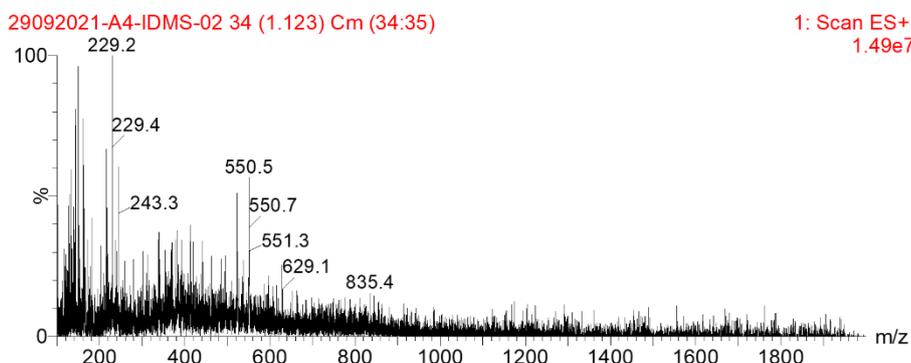
#### 4.4. Caracterização estrutural dos compostos bioativos

##### 4.4.1. Espectrometria de Massas (ESI-MS)

A Figura 23 apresenta os espectros de massas das amostras ativas citotóxicas. Esta técnica foi selecionada em relação a espectrometria do tipo MALDI-TOF para as moléculas isoladas a partir da ultrafiltração em membrana de 5 kDa, uma vez que já se esperava que estes compostos possuísem uma massa molecular que pudesse cair na região da matriz do MALDI.

**Figura 23** – Espectros de massas dos compostos ativos no modo ESI<sup>+</sup>



**Pep. Js IV-II****Pep. Js VI-I**

Os espectros de massas dos compostos citotóxicos foram obtidos através da inserção direta das amostras na fonte de ionização do tipo *electrospray*, em modo positivo. Na imagem são representadas a massa intacta dos compostos. O eixo x representa a relação massa/carga ( $m/z$ ), e y, a intensidade, medida em porcentagem (%).  
Fonte: Autor próprio.

Para Js II-I, observamos a presença de um composto majoritário com relação *massa/carga* de 580,1, e dois compostos de 551,1 e 602,1  $m/z$ . O composto Js III-I apresenta sinal com  $m/z$  de 215,1; e sinais de  $m/z$  231,1 e 253,1, referentes ao íon 215 adutos aos íons metálicos sódio ( $[215+\text{Na}]^+$ ) e potássio( $[215+\text{K}]^+$ ). Há também para esta amostra, a ocorrência de sinais de menor intensidade na região de 400  $m/z$ , que correspondem à dímeros da molécula 215 ( $[2M + \text{H}]^+$ ;  $[2M + \text{Na}]^+$ ; e  $[2M + \text{K}]^+$ ). As amostras Js IV-II e Js VI-I apresentaram baixa ionização, reduzindo a razão sinal/ruído do espectro, contudo, é possível observar a presença majoritária de compostos de 149,1  $m/z$  e 229,2  $m/z$ , para as respectivas amostras.

A baixa concentração dos íons detectados impediu a realização das análises de espectrometria em tandem (MS/MS) para todos os compostos detectados, sendo possível realizar as análises apenas para as amostras Js II-I e Js III-I.

Os espectros de MS/MS foram suprimidos a fim de se preservar a estrutura das moléculas detectadas, uma vez que nossa caracterização estrutural não foi completamente elucidada. Os espectros referentes às amostras Js II-I, nos possibilitam inferir aspectos importantes sobre a estrutura e origem do composto. Devido ao padrão de fragmentação da amostra, podemos concluir que se trata de um peptídeo, o qual, a presença dos sinais indicados de dissociação do dipeptídeo Prolina-Prolina, em 213  $m/z$ , indicativo de que este pertencente à classe dos Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPPs) (Tashima et. al., 2012).

Menin e colaboradores (2008) caracterizaram a identificação de marcadores de BPPs via espectrometria de massas em fontes ionizadoras do tipo *electrospray*. Este estudo utilizou a peçonha de *Bothrops moojeni* e detectou que a fragmentação de BPPs, por dissociação induzida por colisão durante a análise de espectrometria de massa em tandem por eletrospray (ESI-MS/MS), gera um sinal predominante em  $m/z$  213,1 correspondente ao íon y do fragmento Prolina-Prolina terminal. Além disso, há a ocorrência de sinais em  $m/z$  226,1 e 240,1 que correspondem aos íons b do N-terminal pGlu-Asn e pGlu-Lys, respectivamente, sequências observadas com frequência na estrutura desta classe de peptídeos.

A análise em tandem da amostra Js III-I apresenta a fragmentação dos íons 215, 231 e 253,1, e devido ao padrão de quebra, nos permite confirmar que se trata da mesma molécula em diferentes estados de ionização (isto é, ionizadas por um próton ou íons metálicos). Com isso, o principal espectro de MS/MS a ser analisado foi o do íon com  $m/z$  215.

Sua fragmentação gerou cerca de 12 sinais, todos com massas moleculares de número ímpar. Sabe-se, pela chamada Regra do Nitrogênio, que nas técnicas de espectrometria de massas do tipo ESI, uma molécula só terá massa ímpar se ela tiver número par de átomos de nitrogênio em sua estrutura. Essa regra é derivada do fato de que para os elementos químicos mais comuns em compostos orgânicos neutros (hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, silício, fósforo, enxofre e halogênios), elementos com massas nominais pares formam números pares de ligações covalentes, enquanto elementos com massas nominais ímpares formam números ímpares de ligações covalentes, com exceção do nitrogênio, que tem uma massa nominal (ou inteira) de 14, mas tem uma valência de 3 (GROSS, 2017).

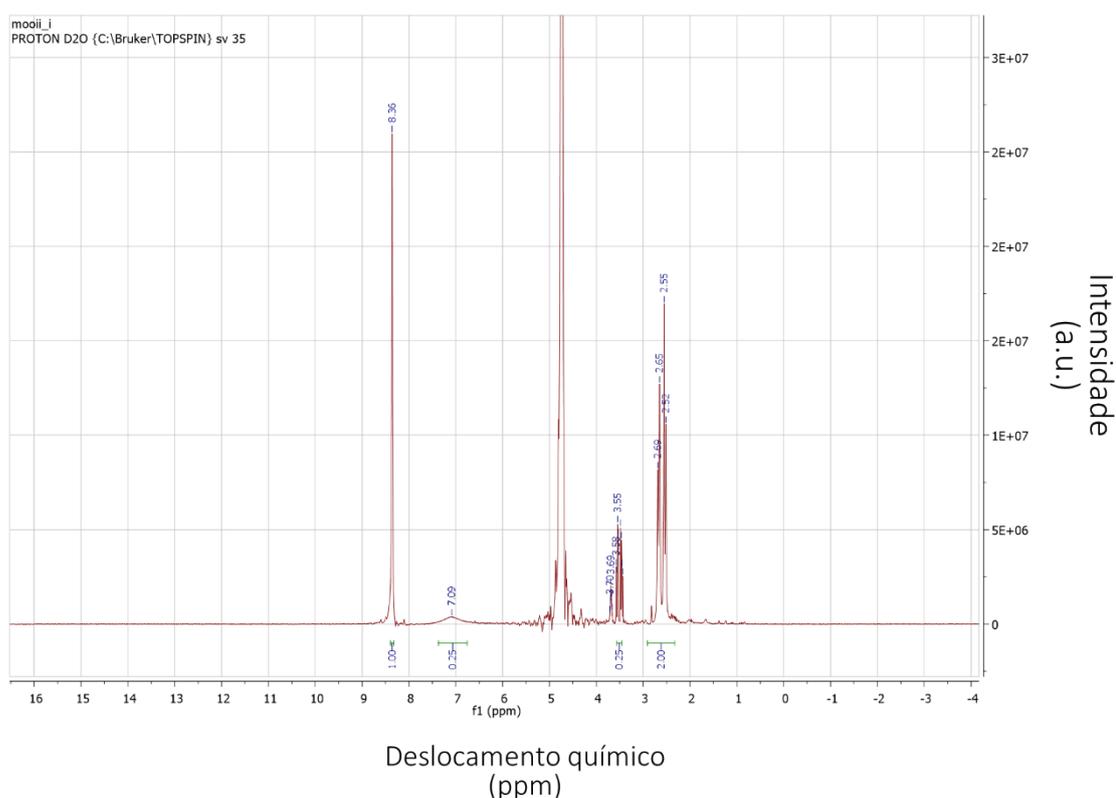
Esta é uma importante conclusão que tiramos do espectro da amostra Js III-I, uma vez que apenas observando o espectro, não foi possível definirmos à que classe molecular este composto pertence, mas captamos informações valiosas sobre a presença de um número de átomos ímpares de nitrogênio em sua estrutura, que foi elucidada por técnicas complementares, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

#### 4.4.2. Ressonância magnética nuclear (RMN)

A identificação estrutural da molécula citotóxica Js III-I foi complementada por ensaios de RMN, utilizando técnicas 1D ( $^1\text{H}$  e APT). O espectro de RMN foi obtido em espectrômetro Bruker Avance DRX 500 FT (Karlshure, Germany), operando em 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ , e utilizando 1 mg do composto isolado, solubilizado em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

A Figura 24 apresenta o espectro de hidrogênio da amostra, analisado com o auxílio do software MestReNova (MestReLab).

**Figura 24** – Espectro  $^1\text{H}$  de RMN do composto citotóxico Js III-I

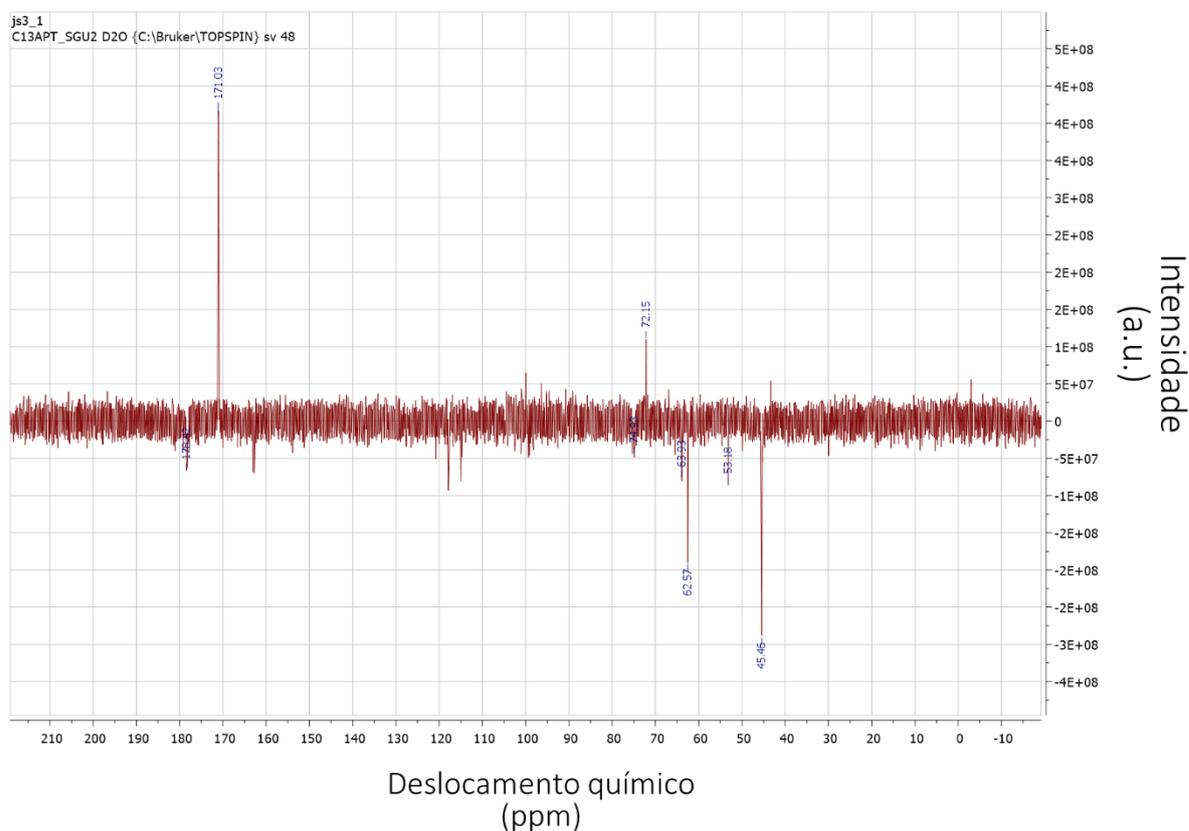


Espectro  $^1\text{H}$  de RMN de Js III-I. O eixo x representa o deslocamento químico (ppm), e y, a intensidade, medida em unidades arbitrárias. Fonte: Próprio autor.

Observa-se no espectro, a presença de 4 sinais próprios do composto e 1 sinal do solvente, com deslocamento químico ( $\delta$ ) igual à 4,79. O analito apresenta um singleto na região de  $\delta$  8,44, de possível correspondência a um grupamento ácido carboxílico; um singleto largo de  $\delta$  7,15, característico da presença de  $-\text{OH}$  e/ou  $-\text{NH}$ ; e dois duplos dupletos na região de  $\delta$  2,71-2,59, referentes à hidrogênios adjacentes à carbonos não hidrogenados. Os sinais apresentados no espectro H estão na proporção de 4:1:1:8 (Singleto : Singleto largo : Duplo duplete : Duplo duplete).

A seguir, espectro APT, referente à detecção de tipos de  $^{13}\text{C}$  na amostra.

**Figura 25** – Espectro  $^{13}\text{C}$ -APT de RMN do composto citotóxico Js III-I

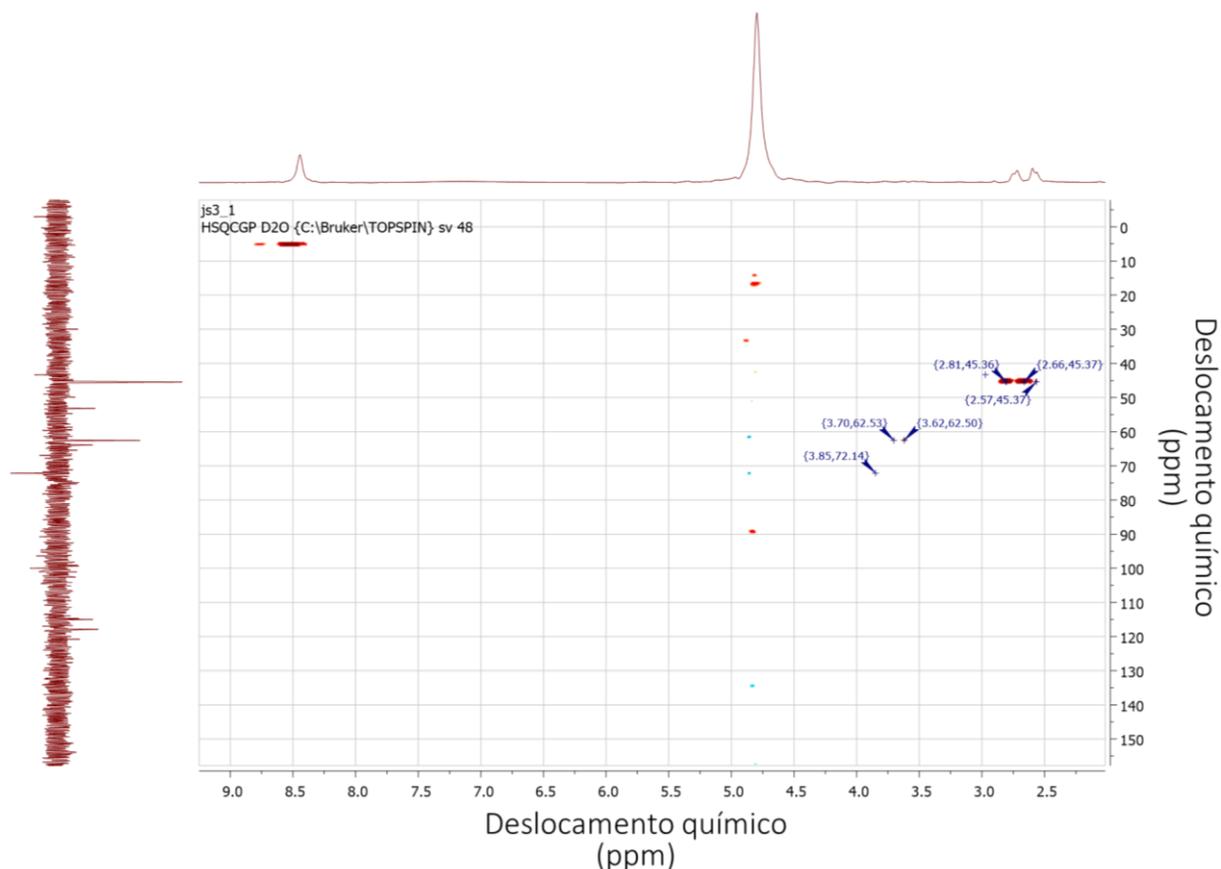


Espectro APT- $^{13}\text{C}$  de RMN de Js III-I. O eixo x representa o deslocamento químico (ppm), e y, a intensidade, medida em unidades arbitrárias. Fonte: Próprio autor.

Este espectro evidencia a presença de 8 tipos de carbonos. Nesta técnica, o valor do sinal (positivo ou negativo) é capaz de informar a quantidade de ligações estabelecidas pelo átomo responsável pelo sinal, sendo os sinais positivos equivalentes a carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ) ou metínicos ( $\text{CH}$ ), enquanto sinais negativos correspondem a carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) ou não-hidrogenados ( $\text{C}$ ). Os deslocamentos químicos destes sinais são iguais a  $\delta$  178,3 ( $\text{C}$ );  $\delta$  171,0 ( $\text{CH}_3$ );  $\delta$  74,0 ( $\text{CH}_2$ );  $\delta$  72,1 ( $\text{CH}$ );  $\delta$  63,9 ( $\text{C}$ );  $\delta$  62,6 ( $\text{CH}_2$ );  $\delta$  53,2 ( $\text{C}$ ); e  $\delta$  45,5 ( $\text{CH}_2$ ). Os quadrupletos na região de deslocamento químico  $\delta$  162,27 + 112-120 ppm são característicos de ácido trifluoroacético, podendo haver um residual em nossa amostra, visto que este está presente no solvente da fase móvel na cromatografia em fase reversa.

Para a melhor compreensão de como os sinais dos espectros de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  estão correlacionados, foi executada uma análise de RMN 2D do tipo HSQC (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*), como demonstrado a seguir:

**Figura 26** – Espectro HSQC de RMN do composto citotóxico Js III-I



Espectro HSQC de RMN de Js III-I. O eixo x representa o deslocamento químico (ppm) dos sinais observados no espectro de  $^1\text{H}$ , e y, o deslocamento químico (ppm) dos sinais observados no espectro de  $^{13}\text{C}$ . Destacado no próprio espectro, em vermelho, os sinais correlatos com indicação de seus valores de  $\delta$  na cor azul. Fonte: Próprio autor.

O experimento HSQC é um experimento de duas dimensões que apresenta as correlações entre os núcleos envolvidos que estão distantes por uma ligação química, com isto, é possível correlacionar a qual carbono do espectro  $^{13}\text{C}$ , um determinado hidrogênio observado no espectro  $^1\text{H}$  está ligado (VUISTER; BAX, 1992). Dentre os 8 sinais observados no espectro de carbono, apenas três demonstraram estar ligados à hidrogênios, sendo:  $\delta$  45,46, outrora caracterizado como  $\text{CH}_2$ , com os hidrogênios de  $\delta$  2,81 e 2,66 ppm;  $\delta$  62,57, também do tipo  $\text{CH}_2$ , com os hidrogênios  $\delta$  3,62 e 3,70; e o carbono CH, de  $\delta$  72,14, com o hidrogênio  $\delta$  3,85 ppm. Foram observadas correlações entre carbono/hidrogênio para o sinal de  $^1\text{H}$  de  $\delta$  8,49, o que se espera que seja relacionado ao carbono de  $\delta$  178,34 ppm, porém, como o equipamento não foi capaz analisar esta faixa de deslocamento químico, é possível que tenha ocorrido um deslocamento deste sinal. Estes resultados foram essenciais para a confirmação dos tipos de carbonos observados no espectro de APT.

Todos os dados obtidos nas análises de ressonância magnética nuclear foram computados na tabela a seguir, se desenvolvendo a busca pelos respectivos grupos funcionais em manuais de interpretação de técnicas espectroscópicas de acordo com os estudos de PAVIA et al., 2015, e SILVERSTEIN, 2005.

**Tabela 3** – Sinais observados nos espectros de RMN

<sup>13</sup> C δ (ppm)	APT	<sup>13</sup> C Possível grupo	HSQC - <sup>1</sup> H δ (ppm) / <i>J</i>	<sup>1</sup> H Possível grupo
45,45	CH <sub>2</sub>	R-CH <sub>2</sub> -R	2,73 d / 15,2 Hz	R-NR-CH <sub>2</sub> -R
53,18	C	R <sub>3</sub> -C-O/N	-	R-C-O-
62,57	CH <sub>2</sub>	R <sub>3</sub> -C-O/N	3,66 dd / 11,8 e 6,9 Hz	R-CO-O-CH <sub>2</sub> -R RO-CH <sub>2</sub> -R
63,93	C	R <sub>3</sub> -C-O/N	-	R-CO-O-CH <sub>2</sub> -R RO-CH <sub>2</sub> -R
72,15	CH	R <sub>2</sub> -CH-O/N	3,85 dd / 11,8 e 4,3 Hz	R-CO-O-CH-R
74,93	C	R <sub>3</sub> -C-O/N	-	-
171,03	CH	N/O-CO-H	8,49 s	N/O-CO-H
178,28	C	R-CO-OR	-	R-CO-O-R

Análise dos sinais observados nos espectros de RMN. A coluna <sup>13</sup>C representa os sinais observados nos espectros de carbono, distribuídos segundo seu deslocamento químico (δ). APT representa o tipo de carbono; HSQC - os sinais de <sup>1</sup>H correlatos ao espectro de <sup>13</sup>C, segundo seu deslocamento químico, forma do sinal e constante de acoplamento (*J*), com escala em Hertz (Hz). As demais colunas apresentam os possíveis grupamentos funcionais destes sinais. Abreviações: s – singlete, d- duplete, dd – duplo duplete. Fonte: Próprio autor.

Estes resultados são valiosos para compreendermos o perfil químico de nossa amostra, já podendo inferir uma estrutura com o grupamento funcional R-COO-R', presença de hidroxilas e/ou aminas, rica em diferentes tipos de carbonos, mas com poucas espécies de hidrogênio, indicativos da presença de um centro estereogênico. Entretanto, o conhecimento destas características moleculares não se mostra o suficiente para a determinação da estrutura exata do composto, sendo necessária a execução de técnicas mais específicas de ressonância 2D, como HMBC e COSY, para obtenção de uma estrutura fidedigna ao composto.

Buscamos compreender junto à literatura se os espectros obtidos apresentavam semelhanças às classes de compostos de baixa massa molecular da peçonha de serpentes, porém identificamos que a aplicação de técnicas de RMN na Toxinologia ainda é pouco explorada devido à complexidade de sinais que estariam presentes em um espectro, mas ainda assim, se mostram valiosas em elucidar pequenas moléculas orgânicas ou peptídeo, cuja natureza é altamente flexível e dificulta a realização de estudos de cristalografia (MUNAWAR et al., 2018).

## 5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no presente projeto podemos concluir que:

- O projeto desenvolveu uma metodologia simples, eficaz e sensível para o isolamento de compostos de baixa massa molecular da peçonha de serpentes, com atividade antitumoral, utilizando a peçonha de *Bothrops jararacussu*;
- Com essa metodologia foram isolados e purificados os seguintes compostos bioativos, com baixa massa molecular:
  - Js II-I, Js IV-II e Js VI-I, capazes de reduzir a viabilidade celular *in vitro* de células de linhagem de tumor hepático HepG2;
  - Js III-I, capaz de reduzir a viabilidade celular de diferentes tipos de linhagem tumoral, a saber: tumor hepático HepG2, de próstata DU-145, pulmão A549 e mama MDA-MB;
- Os estudos acerca do mecanismo de redução da viabilidade celular desempenhado pelos compostos Js II-I, Js IV-II e Js VI-I, demonstraram que estes são capazes de induzir a ativação do processo de morte celular por autofagia. Esta redução da viabilidade celular foi específica para células de linhagem tumoral, não tendo sido observado resultados significativos de redução da viabilidade celular em células mononucleares de sangue periférico, ou lise de hemácias. O trabalho buscou ainda elucidar a estrutura destas substâncias, por espectrometria de massas, porém apenas evidenciamos que Js II-I é um peptídeo, com massa molecular igual à 580 Da. Js IV-II e Js VI-I não foram caracterizados, pois apresentaram baixa ionização quando submetidos à fonte de *eletronspray*. Novos estudos estruturais serão realizados a fim de se caracterizar a estrutura destes compostos, uma vez que os três apresentam relevante potencial para estudo de novos fármacos antitumorais;
- Js III-I demonstrou atividade citotóxica superior aos conhecidos agentes antitumorais cisplatina e MMS, em todas as linhagens tumorais avaliadas. Em HepG2, a linhagem celular definida como padrão para nossos estudos de caracterização funcional, o composto bioativo apresentou IC50 igual à 10,73 µg/mL, enquanto a Cisplatina obteve 11,69 µg/mL. Os resultados sugerem que seu mecanismo de ação para a indução de morte celular, é a apoptose, iniciada através da via intrínseca de apoptose, tendo sido observado aumento na expressão das caspases 3 e 9. Além deste potencial, Js III-I também é capaz de influenciar a ativação da autofagia, promovendo um aumento na expressão das vesículas autofágicas (autofagossomos). Sua citotoxicidade foi seletiva às células tumorais, não sendo observado efeitos nocivos

significativos às células normais humanas (PBMC e hemácias). Sua análise estrutural foi realizada por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, onde evidenciamos que o composto é uma pequena molécula orgânica, com massa molecular de 214 Da. Alguns de seus grupos funcionais foram identificados, porém, a estrutura da molécula ainda necessita ser validada. A execução de novas análises, como técnicas de RMN 2D, poderão elucidar no futuro a estrutura exata deste composto, que apresenta importante potencial biotecnológico;

Portanto, o presente trabalho traz resultados inéditos e impactantes, com a identificação de quatro novos compostos com potencial utilização em estudos para o desenvolvimento de novos fármacos, gera novos conhecimentos quanto aos estudos de compostos de baixa massa molecular em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* bem como, padroniza uma nova metodologia que otimiza o isolamento e a caracterização, funcional e estrutural destes compostos.

## **6. Sugestões para trabalhos futuros**

Os dados obtidos neste estudo abrem perspectivas para o desenvolvimento de novos projetos de pesquisa, que irão concluir as caracterizações estruturais, e produzir através da síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) análogos sintéticos dos compostos de maior potencial biotecnológico de nosso estudo. A produção destes sintéticos será de suma importância para ampliar o conhecimento acerca de suas atividades anticâncer e relações de estrutura  $\times$  função. Espera-se ao término destes estudos contribuir para a otimização das atuais terapias anticâncer, abrindo perspectivas e reflexos para a população e para o grupo de estudo em que está inserido.

## 7. Bibliografia

- ABDEL-GHANI, L. M. et al. Cytotoxicity of Nubein6.8 peptide isolated from the snake venom of *Naja nubiae* on melanoma and ovarian carcinoma cell lines. **Toxicon**, v. 168, p. 22–31, 1 out. 2019.
- ACHKAR, I. W. et al. **Cisplatin based therapy: The role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway** **Journal of Translational Medicine**, 2018.
- ACUNHA, T.; NARDINI, V.; FACCIOLI, L. H. A lipidomics approach reveals new insights into *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops moojeni* snake venoms. **Archives of Toxicology**, 2021.
- AKHTAR, B. et al. Mechanistic insights of snake venom disintegrins in cancer treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 899, p. 174022, maio 2021.
- ALDAY-PAREJO, B.; STUPP, R.; RÜEGG, C. **Are integrins still practicable targets for anti-cancer therapy?** **Cancers**, 2019.
- ALMEIDA, J. R. et al. Snake Venom Peptides and Low Mass Proteins: Molecular Tools and Therapeutic Agents. **Current Medicinal Chemistry**, 2017.
- ALTAF, M. et al. Potent in vitro and in vivo anticancer activity of new bipyridine and bipyrimidine gold (III) dithiocarbamate derivatives. **Cancers**, 2019.
- AMORIM, F. G. et al. New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland. **Toxicon**, 2017.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. [s.l: s.n.].
- ARMBRECHT, L. et al. Characterisation of anticancer peptides at the single-cell level. **Lab on a Chip**, 2017.
- ATA, R.; ANTONESCU, C. N. **Integrins and cell metabolism: An intimate relationship impacting cancer** **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.
- AYYANAAR, S. et al. Iron oxide nanoparticle core-shell magnetic microspheres: Applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2020.
- BACHMANN, M. et al. Cell adhesion by integrins. **Physiological Reviews**, 2019.
- BENATI, R. B. et al. Cytotoxic and pro-apoptotic action of MjTX-I, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, towards leukemic cells. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 2018.
- BERMAN, H. M. et al. **The Protein Data Bank** **Nucleic Acids Research**, 2000.
- BI, X. et al. Investigation of the role of tryptophan residues in cationic antimicrobial peptides to determine the mechanism of antimicrobial action. **Journal of Applied Microbiology**, 2013.

BOCCATO PAYOLLA, F. et al. Estudos in vitro da Atividade Antitumoral de Complexos de Vanádio com Ácidos Órotico e Glutâmico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2020.

BOLAND, P.; WU, J. **Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Beyond sorafenib** *Chinese Clinical Oncology*, 2018.

BRASIL. **Estimativa 2020 incidencia de cancer no brasil** Instituto Nacional de Cancer, 2019.

BRUNELLE, J. L.; GREEN, R. Coomassie blue staining. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.].

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: Novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, 2003.

CHAN, Y. S. et al. **Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016.

CHEN, W. et al. Structure-activity relationships of a snake cathelicidin-related peptide, BF-15. **Peptides**, 2011.

CHONG, H. P.; TAN, K. Y.; TAN, C. H. Cytotoxicity of Snake Venoms and Cytotoxins From Two Southeast Asian Cobras (*Naja sumatrana*, *Naja kaouthia*): Exploration of Anticancer Potential, Selectivity, and Cell Death Mechanism. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 2020.

CINTRA, A. C. O.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **Journal of Protein Chemistry**, 1990.

CORREA, P. G.; OGUIURA, N. Phylogenetic analysis of  $\beta$ -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes. **Toxicon**, 2013.

CORY, S.; HUANG, D. C. S.; ADAMS, J. M. **The Bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis** *Oncogene*, 2003.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, 2010.

COSTA, T. R. et al. CR-LAAO, an L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* venom, as a potential tool for developing novel immunotherapeutic strategies against cancer. **Scientific Reports**, 2017.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. **Inflammation and cancer** *Nature*, 2002.

DA SILVA CALDEIRA, C. A. et al. Antimicrobial peptidomes of *Bothrops atrox* and *Bothrops jararacussu* snake venoms. **Amino Acids**, 2021.

DANILUCCI, T. M. et al. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin  $\alpha v \beta 3$  and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Communication and Signaling**, 2019.

DAS, T. et al. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. **Toxicon**, 2011.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, 2005.

DE BARROS, E. et al. **Snake venom cathelicidins as natural antimicrobial peptides***Frontiers in Pharmacology*, 2019.

DE MATTOS PEREIRA, L. et al. In-depth transcriptome reveals the potential biotechnological application of bothrops jararaca venom gland. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 2020.

DEIBLER, G. E. et al. Use of Triton X-100 as a hemolytic agent in the spectrophotometric measurement of blood O<sub>2</sub> saturation. **Journal of Applied Physiology**, 1959.

DEMATEI, A. et al. **Mechanistic Insights into the Leishmanicidal and Bactericidal Activities of Batroxicidin, a Cathelicidin-Related Peptide from a South American Viper (Bothrops atrox)***Journal of Natural Products*, 2021.

DENNING, T. L. et al. Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 2002.

DOS SANTOS, P. K. et al. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein, attenuates alpha2beta1 integrin and VEGF receptor 2 signaling resulting in angiogenesis inhibition. **Biochimie**, 2020.

ELLAHIOUI, Y.; PRASHAR, S.; GÓMEZ-RUIZ, S. **Anticancer applications and recent investigations of metallodrugs based on gallium, tin and titanium***Inorganics*, 2017.

ENGBRAATEN, O.; VOLLAN, H. K. M.; BØRRESEN-DALE, A. L. **Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets***American Journal of Pathology*, 2013.

ESCUDIER, B.; WORDEN, F.; KUDO, M. **Sorafenib: key lessons from over 10 years of experience***Expert Review of Anticancer Therapy*, 2019.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, 2015.

FERREIRA, L. A. F. et al. Isolation: Analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from bothrops neuwiedi venom. **Journal of Protein Chemistry**, 1998.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of Bradykinin-Potentiating Peptides from Bothrops jararaca Venom. **Biochemistry**, 1970.

FRANCHI, L. P. et al. **Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono***Química Nova*, 2012.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **Journal of Biomedical Science**, 2009.

- GARCIA, J. et al. **Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook** *Cancer Treatment Reviews*, 2020.
- GLUKHOV, E. et al. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.
- GOMES, A. et al. Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian Journal of Experimental Biology**, 2010.
- GROSS, J. H. Nitrogen rule. In: **Mass Spectrometry**. [s.l: s.n.].
- GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. **Integrin signalling during tumour progression** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004.
- HAMIDI, H.; IVASKA, J. **Every step of the way: Integrins in cancer progression and metastasis** *Nature Reviews Cancer*, 2018.
- HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions** *Cancer Discovery*, 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The hallmarks of cancer** *Cell*, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation** *Cell*, 2011.
- HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies** *Nature Biotechnology*, 2006.
- HAUACHE, O. M. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2001.
- HAVELEK, R. et al. Differences in Vanadocene Dichloride and Cisplatin Effect on MOLT-4 Leukemia and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Medicinal Chemistry**, 2012.
- HAYASHI, M. A. F.; CAMARGO, A. C. M. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, 2005.
- HUANG, T. F. et al. Trigramin: A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **Journal of Biological Chemistry**, 1987.
- IANZER, D. et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, 2004.
- INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. [s.l: s.n.].
- JAYSON, G. C. et al. **Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions** *The Lancet*, 2016.
- KAISER, J.; COUZIN-FRANKEL, J. Cancer immunotherapy sweeps Nobel for medicine. **Science**, 2018.

- KECHAGIA, J. Z.; IVASKA, J.; ROCA-CUSACHS, P. **Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment***Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019.
- KERKIS, A. et al. Crostamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **The FASEB Journal**, 2004.
- KING, G. F. **Venoms as a platform for human drugs: Translating toxins into therapeutics***Expert Opinion on Biological Therapy*, 2011.
- KROCK, B. L.; SKULI, N.; SIMON, M. C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. **Genes and Cancer**, 2011.
- LABI, V.; ERLACHER, M. **How cell death shapes cancer***Cell Death and Disease*, 2015.
- LANCEL, S. et al. Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats. **Critical Care Medicine**, 2005.
- LEE, K. J. et al. Exploiting DNA repair defects in triple negative breast cancer to improve cell killing. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, 2020.
- LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. **Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy***Developmental Cell*, 2004.
- LEVINE, B.; KROEMER, G. **Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective***Cell*, 2019.
- LI, L.; HUANG, J.; LIN, Y. **Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future***Toxins*, 2018.
- LI, W. et al. Binding of MMP-9-degraded fibronectin to  $\beta 6$  integrin promotes invasion via the FAK-Src-related Erk1/2 and PI3K/Akt/Smad-1/5/8 pathways in breast cancer. **Oncology Reports**, 2015.
- LIN, S. R.; CHANG, L. S.; CHANG, K. L. Separation and structure-function studies of Taiwan cobra cardiotoxins. **Journal of Protein Chemistry**, 2002.
- LINO, R. L. B. et al. Alpha $\nu$ beta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2019.
- MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F.; KESSLER, H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 2011.
- MELLO, C. P. et al. Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. **Toxicon**, 2017.
- MENIN, L. et al. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. **Toxicon**, 2008.
- MERSCH-SUNDERMANN, V. et al. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, 2014

- MIRANDA, R. R.; SILVA, T. D.; FORONES, N. M. High-resolution melting for detecting KRAS mutations in colorectal cancer. **Biomedical Reports**, 2019.
- MIRZAEI, S. et al. **Venom peptides in cancer therapy: An updated review on cellular and molecular aspects** *Pharmacological Research*, 2021.
- MOLINA, J. R.; ADJEI, A. A. The Ras/Raf/MAPK Pathway. **Journal of Thoracic Oncology**, 2006.
- MORAIS, K. L. P. et al. Proline rich-oligopeptides: Diverse mechanisms for antihypertensive action. **Peptides**, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983.
- MUNAWAR, A. et al. Venom peptide analysis of *Vipera ammodytes meridionalis* (Viperinae) and *Bothrops jararacussu* (Crotalinae) demonstrates subfamily-specificity of the peptidome in the family Viperidae. **Molecular BioSystems**, 2011a.
- MUNAWAR, A. et al. Venom peptide analysis of *Vipera ammodytes meridionalis* (Viperinae) and *Bothrops jararacussu* (Crotalinae) demonstrates subfamily-specificity of the peptidome in the family Viperidae. **Molecular BioSystems**, 2011b.
- MUNAWAR, A. et al. **Snake venom peptides: Tools of biodiscovery** *Toxins*, 2018.
- MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2007.
- MURAYAMA, N. et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1997.
- NAIR, D. G. et al. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. **Biochemical Journal**, 2007.
- NASCIMENTO, F. D. et al. The natural cell-penetrating peptide crodamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. **Molecular Pharmaceutics**, 2012.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action** *Trends in Biotechnology*, 2011.
- PARK, E. J. et al. **Integrin-Ligand Interactions in Inflammation, Cancer, and Metabolic Disease: Insights Into the Multifaceted Roles of an Emerging Ligand Irisin** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020.
- PAVIA, D. L. et al. **Introduction Spectroscopy**. [s.l: s.n.].
- PAWSON, T. Protein modules and signalling networks. **Nature**, 1995.
- PEREIRA, A. et al. Crodamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. **Expert**

**Opinion on Investigational Drugs**, 2011.

PÉREZ-PEINADO, C.; DEFAUS, S.; ANDREU, D. **Hitchhiking with nature: Snake venom peptides to fight cancer and superbugs***Toxins*, 2020.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. **Apoptosis: A target for anticancer therapy***International Journal of Molecular Sciences*, 2018.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Structural and Biological Characterization of Two Crotamine Isoforms IV-2 and IV-3 Isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* Venom. **The Protein Journal**, 2009.

RÁDIS-BAPTISTA, G. Viperacidins, Snake Venom Cathelicidin-Related Peptides, in the Milieu of Reptilian Antimicrobial Polypeptides. In: **Snake Venoms**. [s.l: s.n.].

SÁNCHEZ, E. E. et al. Colombistatin: A disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Archives of Toxicology**, 2009.

SARIN, N. et al. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. **PLoS ONE**, 2017.

SCARBOROUGH, R. M. et al. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. **Journal of Biological Chemistry**, 1993.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, 1987.

SCHNEIDER, R. et al. Functional and mutational analysis after radiation and cetuximab treatment on prostate carcinoma cell line DU145. **Radiation Oncology**, 2021.

SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C. **The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms***Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 2017.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. et al. **Snake venom disintegrins and cell migration***Toxins**Molecular Diversity Preservation International*, , 29 nov. 2010. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/toxins](http://www.mdpi.com/journal/toxins)>. Acesso em: 10 maio. 2021

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds 7ed 2005 - Silverstein, Webster & Kiemle.pdf***Microchemical Journal*, 2005.

SOUSA, L. F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2013.

STEINKELLNER, H. et al. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 1998.

STRANSKY, S. et al. In vitro assessment of cytotoxic activities of *Lachesis muta muta* snake

venom. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2018.

SUHAIL, Y. et al. Cell Systems Review Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2021.

SUNTRAVAT, M. et al. **Erratum to: Gene expression profiling of the venom gland from the Venezuelan mapanare (Bothrops colombiensis) using expressed sequence tags (ESTs) [BMC Molecular Biol, (2016), 17, 7]****BMC Molecular Biology**, 2016a.

SUNTRAVAT, M. et al. Expression, purification, and analysis of three recombinant ECD disintegrins (r-colombistatins) from P-III class snake venom metalloproteinases affecting platelet aggregation and SK-MEL-28 cell adhesion. **Toxicon**, 2016b.

TASIMA, L. J. et al. Crotonamine in *Crotalus durissus*: Distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 2020.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. **A review and database of snake venom proteomes****Toxins**, 2017.

TORRES, A. M. et al. Identification of a Novel Family of Proteins in Snake Venoms. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.

VALIATTI, F. B. et al. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2011.

VAN ENGELAND, M. et al. **Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure****Cytometry**, 1998.

VILLAR-BRIONES, A.; AIRD, S. D. Organic and peptidyl constituents of snake venoms: The picture is vastly more complex than we imagined. **Toxins**, 2018.

VUISTER, G. W.; BAX, A. Resolution enhancement and spectral editing of uniformly <sup>13</sup>C-enriched proteins by homonuclear broadband <sup>13</sup>C decoupling. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, 1992.

WAHEED, H.; MOIN, S. F.; CHOUDHARY, M. I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, 2017.

WANG, Y. et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. **PLoS ONE**, 2008.

WESTABY, D. et al. **Targeting the intrinsic apoptosis pathway: A window of opportunity for prostate cancer****Cancers**, 2022.

WHITE, E. Autophagy and p53. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016.

YIP, K. W.; REED, J. C. **Bcl-2 family proteins and cancer****Oncogene**, 2008.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: Cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2013.

YOUSEFI, H. et al. **Understanding the role of integrins in breast cancer invasion, metastasis, angiogenesis, and drug resistance** *Oncogene*, 2021.

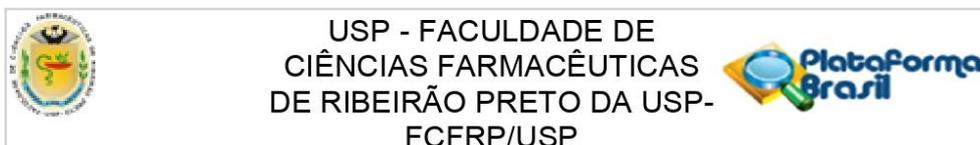
YUN, C. W.; LEE, S. H. **The roles of autophagy in cancer** *International Journal of Molecular Sciences*, 2018.

ZACKS, D. N. et al. FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 2004.

ZASLOFF, M. **Antimicrobial peptides of multicellular organisms** *Nature*, 2002.

ZHANG, X. et al. **Targeting anti-apoptotic BCL-2 family proteins for cancer treatment** *Future Medicinal Chemistry*, 2020.

**ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Isolamento e caracterização funcional e estrutural de peptídeos antitumorais de peçonhas de serpentes do gênero Bothrops em linhagens leucêmicas

**Pesquisador:** GABRIEL NEVES CEZARETTE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 40741720.1.0000.5403

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

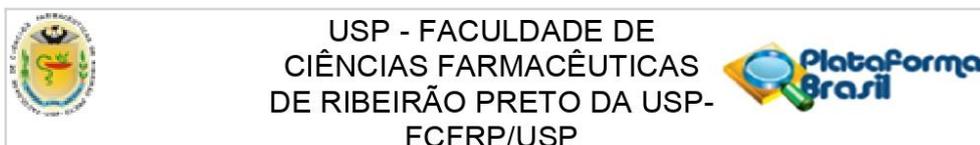
### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.684.196

#### Apresentação do Projeto:

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos, geralmente de origem desconhecida, que tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. Com vista a avaliar novas terapias alternativas para o tratamento dessa doença que acomete milhares de indivíduos todos os anos, o presente projeto visa avaliar a atividade antitumoral de peptídeos isolados de peçonha de serpentes do gênero Bothrops. As peçonhas de serpentes são ricas "bibliotecas" de moléculas bioativas com potencial para tratamento de distúrbios fisiológicos. Dentre esses compostos, destacam-se os peptídeos que são funcional e estruturalmente bem caracterizados, apresentando elevada seletividade e especificidade aos receptores celulares humanos, o que oferece vantagens significativas na terapêutica do câncer. Assim, as amostras de peçonhas de serpentes do gênero Bothrops serão filtradas em Vivaspin, seguida de cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de fase reversa em HPLC, a fim de isolar os peptídeos bioativos. As frações e os peptídeos obtidos serão testados com a linhagem celular de monócitos derivados do sangue periférico de um paciente com leucemia monocítica aguda (THP-1), um tipo de LMA (M5), e uma linhagem promieloblástica derivada do sangue periférico de uma paciente com leucemia promielocítica aguda (HL-60), um outro tipo de LMA (M3). A atividade citotóxica será avaliada através do método colorimétrico do metiltetrazolium (MTT) e, a partir dos resultados

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@cfcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.684.196

obtidos, será selecionado um peptídeo nativo bioativo com potencial biotecnológico o qual, será caracterizado estrutural e funcionalmente in vitro. Os resultados obtidos no presente projeto buscam compreender a relação estrutura-função dos peptídeos das peçonhas em sistemas biológicos, contribuindo para o desenvolvimento de novos medicamentos com potencial aplicação terapêutica no tratamento da leucemia.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos são claros e bem definidos. Consistem em isolar e caracterizar funcional e estruturalmente pelo menos um peptídeo com atividade antitumoral de serpentes do gênero "Bothrops".

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores, quanto aos riscos inerentes à pesquisa, o material utilizado será descartável, não havendo risco de contaminação. O único desconforto desta coleta está apenas relacionado com a picada da agulha para tirar o sangue. Raramente, pode aparecer um hematoma no local onde foi dada a picada da agulha, mas que não trará problemas ao participante.

Os benefícios da pesquisa não foram mencionados nem no projeto, nem no TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é atual e relevante e contempla metodologia consagrada na literatura.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória foram revistos pelos autores e apresentam-se satisfatoriamente elaborados.

**Recomendações:**

Recomendamos que o supervisor do aluno de iniciação científica seja o docente, e que o mestrando apenas colabore com a supervisão do aluno de graduação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Respostas às Pendências:

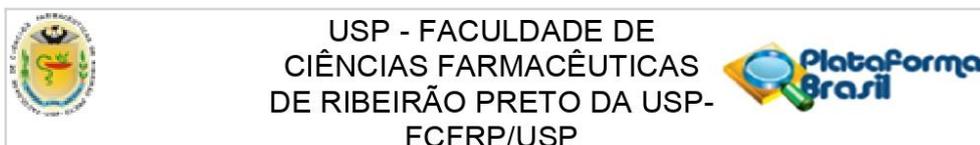
1. No TCLE:

a) Substituir a palavra sujeito, por participante da pesquisa;

Resposta: "A palavra foi substituída como solicitado".

Pendência atendida.

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.684.196

b) Inserir a frase: "Como participante da pesquisa, você tem a garantia de ser indenizado por eventuais danos decorrentes da sua participação na pesquisa, conforme a lei vigente";

Resposta: "A frase foi inserida como solicitado".

Pendência atendida.

c) Informar um telefone de contato permanente do pesquisador, fora do horário comercial.

Resposta: "Foi adicionado o telefone celular do pesquisador responsável".

Pendência atendida.

d) Colocar a seguinte frase: "Em caso de dúvidas éticas, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, no endereço Avenida do Café, s/n, Campus Universitário, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto/SP ou pelo telefone (16) 3315-4213, de segunda à sexta-feira, em dias úteis, das 8h00 às 12h00. O CEP é um órgão de caráter consultivo, normativo, deliberativo e educativo, com instituído de defender os interesses dos sujeitos da pesquisa e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões ético-científicos".

Resposta: "A frase foi inserida como solicitado".

Pendência atendida.

2. Solicita-se uniformizar o título da pesquisa no projeto, no TCLE e na Plataforma Brasil, deixando somente o título público, que inclui as células leucêmicas.

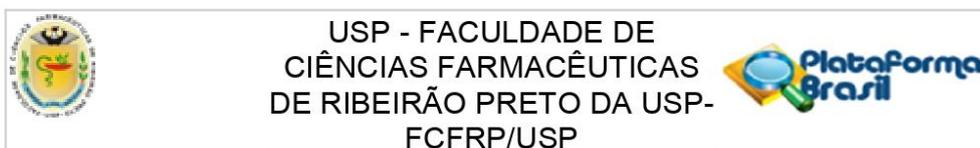
Resposta: "Os títulos foram uniformizados no projeto, no TCLE e na Plataforma Brasil. Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcrp.usp.br Fone: (16) 3315-4213 ou 3315-4216 Fax: (16) 3315-4892 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto".

Pendência atendida.

3. Solicita-se esclarecimentos se são projetos diferentes ou se o pesquisador está propondo um novo projeto e irá desistir do projeto anterior que está em análise.

Resposta: "São projetos diferentes e isso pode ser constatado pelo conteúdo de cada um deles. O presente projeto corresponde ao projeto de iniciação científica da aluna Gabriela de Oliveira Almeida, que terá a participação do mestrando Gabriel Neves Cezarette como supervisor dos

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.684.196

experimentos. As semelhanças dos dois projetos se devem a eles pertencerem a um projeto maior desenvolvido em nosso laboratório, que visa a identificação de novos peptídeos com atividade antitumoral, mas somente se assemelham quanto às metodologias empregadas, pois os projetos terão como alvo peptídeos de diferentes espécies de serpente em linhagens celulares distintas”.

Pendência respondida satisfatoriamente. Não obstante, estranha-se a designação de um mestrando como supervisor de um projeto de iniciação científica. Recomendamos que o supervisor seja o docente, e que o mestrando apenas colabore com a supervisão do aluno de graduação.

4. Esclarecer a estratégia/metodologia utilizada que levaram a concluir que apenas 4 participantes serão suficientes para avaliar os efeitos de citotoxicidade dos peptídeos a ser estudados.

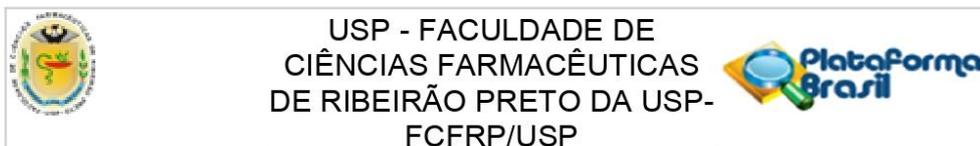
Resposta; “ A avaliação da citotoxicidade dos peptídeos com atividade antitumoral identificados através deste estudo exigirá o auxílio de voluntários apenas para a obtenção de células mononucleares de sangue periférico. Considerando que o objetivo deste estudo é avaliar se o peptídeo é citotóxico para as células normais, utilizando uma metodologia simples e que necessitará uma baixa concentração de células extraídas, julgamos não ser necessário um grande número de pacientes, e por experiências em projetos anteriores, definimos a quantidade de 4 voluntários mínima para execução dos experimentos. Este número reduzido facilitará nossa busca por voluntários e na organização para coleta do sangue, sobretudo neste período de incertezas pela pandemia do corona vírus”.

Pendência atendida.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 209ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório parcial e o final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha”. O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrfp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.684.196

não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE. Cabe ao pesquisador responsável manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

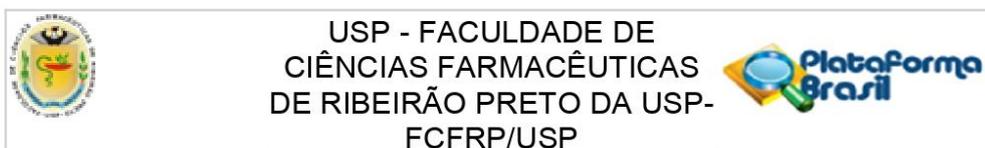
**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1675654.pdf	16/12/2020 16:08:14		Aceito
Outros	Carta_de_correcao_de_pendencias_Gabriela_Almeida.pdf	16/12/2020 16:07:55	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gabriela_Almeida_versao_2.pdf	16/12/2020 16:07:40	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao_2.pdf	16/12/2020 16:07:28	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Gabriela.pdf	04/12/2020 09:32:12	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Outros	Informacoes_relativas_ao_sujeito_da_pesquisa.pdf	03/12/2020 13:53:48	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Informacoes_relativas_ao_desenvolvimento_da_pesquisa.pdf	03/12/2020 13:53:02	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Outros	Declaracao_de_ciencia.pdf	03/12/2020 13:52:31	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_infraestrutura.pdf	03/12/2020 13:50:22	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Orçamento	Orcamento_Financeiro.pdf	03/12/2020 13:47:39	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/12/2020 13:47:05	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gabriela_Almeida.pdf	03/12/2020 13:46:53	GABRIEL NEVES CEZARETTE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrfp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.684.196

**Necessita Apreciação da CONEP:**  
Não

RIBEIRAO PRETO, 30 de Abril de 2021

---

**Assinado por:**  
**Cleni Mara Marzocchi Machado**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrfp.usp.br



