

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 Cezarette

**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^a Dr^a 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*

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).

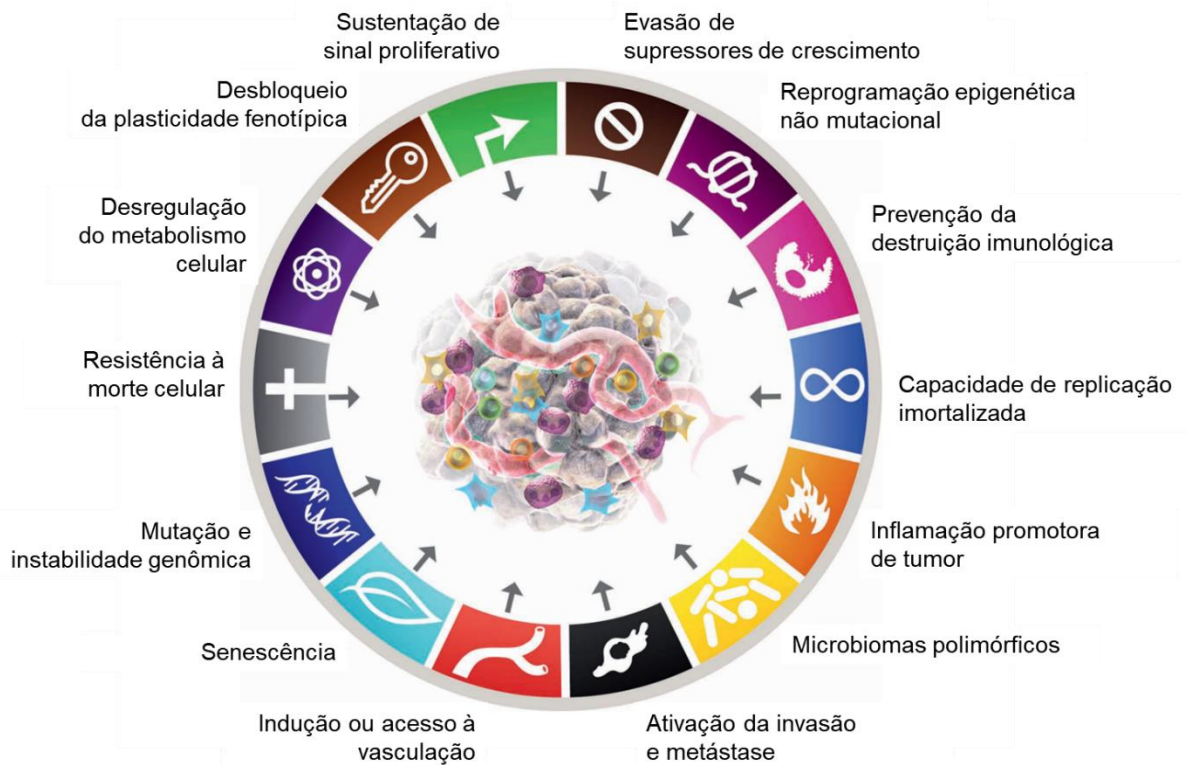
No Brasil, a incidência de novos casos no ano de 2020 foi determinada em 626,03 mil casos, sendo estes representativos de 50,52% de casos acometidos a mulheres e 49,47% para homens. Estes dados superam a estimativa de novos casos para o triênio de 2020-2022, onde se esperava a ocorrência de 600 mil novos 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 G₁, 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- α , 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 (ESCUDIER; 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: α e β . Existem 18 tipos de subunidades α , 8 tipos de subunidades β , 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 α_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, consequentemente, o desenvolvimento de novas moléculas, com alvos terapêuticos que abrangam 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 bradiginina (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 esfingomiéline, 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 IC₅₀ 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. lutzi* (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. lutzi*, 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 β estabilizadas por três ligações dissulfeto. As defensinas são ainda divididas em três grupos, com base no comprimento e emparelhamento de cisteínas: α , β e θ - 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 Na^+ e 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 β -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 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 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 β -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 waprininas 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 Waprininas 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 do 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 waprininas 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 waprininas. 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 waprininas 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 Waprininas 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 α e β 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 β , enquanto o aminoácido do N-terminal do motivo influencie a ligação com as subunidades α (LINO et. al., 2019). É observado para o motivo RGD uma alta afinidade por receptores $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$ 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 similares (*disintegrin-like*), mas que não devem ser confundidas, apesar da semelhança observada nas atividades biológicas.

As desintegrinas similares não são peptídeos, mas sim proteínas, com cerca de 30 kDa, oriundas do processamento de metaloproteínases 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. 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 β -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 O₂ 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.

ENGEBRAATEN, 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** **Quimica 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.
- HANAHAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions** *Cancer Discovery*, 2022.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The hallmarks of cancer** *Cell*, 2000.
- HANAHAHAN, 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. Alphavbeta3 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 crotamine 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. Crotamine 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. Viperidins, 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>. 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 ¹³C-enriched proteins by homonuclear broadband ¹³C 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.

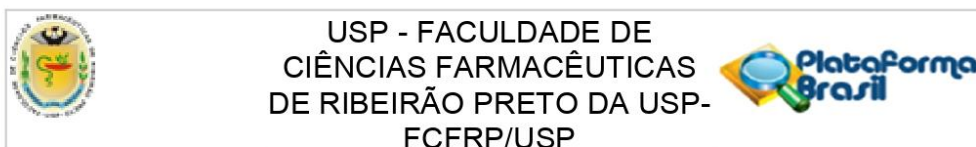
YOUSEFI, H. et al. **Understanding the role of integrins in breast cancer invasion, metastasis, angiogenesis, and drug resistance****Oncogene**, 2021.

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.



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

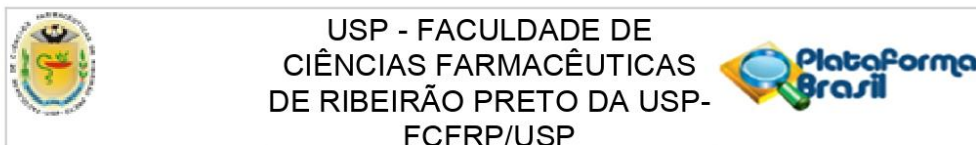
DADOS DO PARECER

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:

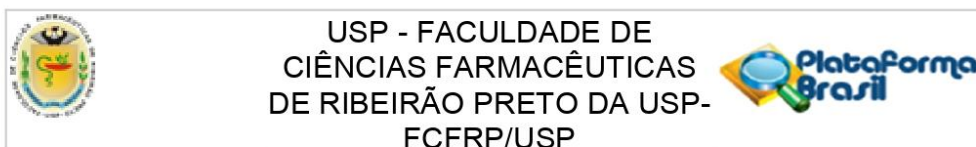
1. No TCLE:

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.

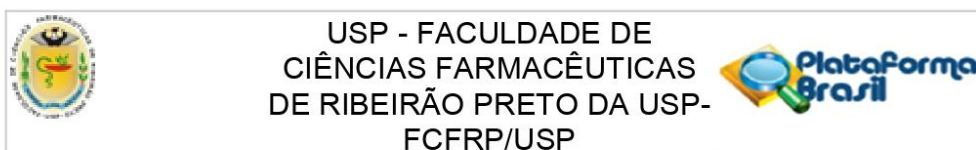
Resposta: "Os títulos foram uniformizados no projeto, no TCLE e na Plataforma Brasil. Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcrp.usp.br Fone: (16) 3315-4213 ou 3315-4216 Fax: (16) 3315-4892 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências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

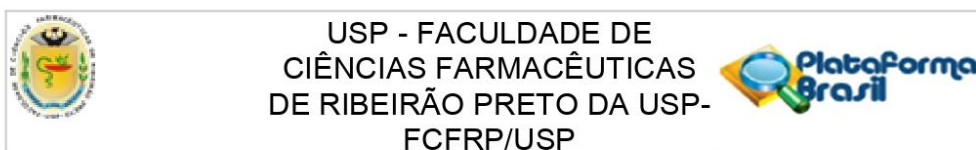
Resposta; “ A avaliação da citotoxicidade dos peptídeos com atividade antitumoral identificados através deste estudo exigirá o auxílio de voluntários apenas para a obtenção de células mononucleares de sangue periférico. Considerando que o objetivo deste estudo é avaliar se o peptídeo é citotóxico para 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.

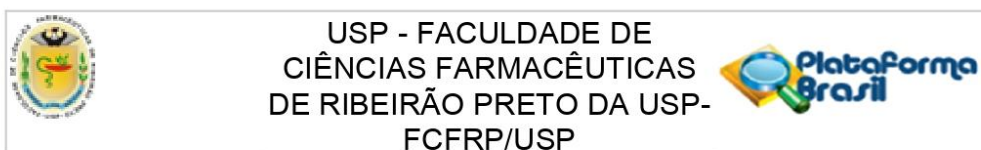
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

