



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

LUÍSA CARREGOSA SANTOS

**EFEITO ANTIMETASTÁTICO EM CÉLULAS DE CÂNCER
DE PULMÃO E ANTIANGIOGÊNICO DA PLA₂ Lys49 MJTX-
II, ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni***

LUÍSA CARREGOSA SANTOS

**EFEITO ANTIMETASTÁTICO EM CÉLULAS DE CÂNCER
DE PULMÃO E ANTIANGIOGÊNICO DA PLA₂ Lys49 MjTX-
II, ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Daiana Silva Lopes
Universidade Federal da Bahia – UFBA
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Patrícia Bianca Clissa
Instituto Butantan, São Paulo

S237

Santos, Luísa Carregosa.

Efeito antimetastático em células de câncer de pulmão e antiangiogênica da PLA2 Lys49 MjTX-II, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*. / -- Vitória da Conquista, 2021.

72 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Daiana Silva

Lopes. Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a.

Patrícia Bianca Clissa

Dissertação (Mestrado – Pós-Graduação em Biociências) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em
Saúde, 2021.

1. Neoplasias Pulmonares. 2. *Bothrops*. 3. Peçonha de

LUISA CARREGOSA SANTOS

**EFEITO ANTIMETASTÁTICO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO E
ANTIANGIOGÊNICO DA PLA₂ LYS49 MJTX-II, ISOLADA DA PEÇONHA DE
*BOTHROPS MOOJENI***

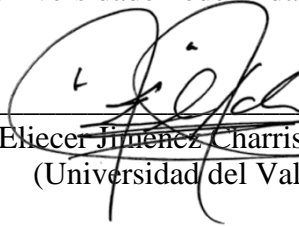
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, 03/12/2021.

Daiana Silva Lopes

Prof.^a. Dr.^a. Daiana Silva Lopes (Orientadora)
(Universidade Federal da Bahia)

Fabrcio Freire de Melo

Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Elicer Jimenez Charris (Examinador)
(Universidad del Valle)

À minha mãe, por estar sempre ao meu lado, pelo seu amor e por acreditar em mim, Vinícius e Thiago, pela ajuda, troca de conhecimentos e companheirismo, Daiana, por ser uma excelente orientadora, amiga e exemplo de profissional e Samuel, pela ajuda ensinamentos e parceria.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente, me concedendo forças, sendo a minha fortaleza e me guiando pelos caminhos certos.

Aos meus pais, Alana e Wildson, pela ajuda, por acreditarem em mim e no meu trabalho, sempre me apoiando e orientando. O que sou hoje é o reflexo de toda luta e amor concedidos a mim.

Ao meu tio Fabiano por toda ajuda e reconhecimento.

Ao meu irmão Eduardo, pela amizade, reconhecimento e por acreditar na profissional que sou e na carreira que seguirei.

Aos meus avós por todo amor.

Agradeço a toda a equipe de profissionais no Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS) (técnicos de laboratórios e administrativos, professores, profissionais dos serviços gerais e segurança), que contribuíram para a execução desta pesquisa.

Agradeço ao Professor Lucas, pela ajuda imensurável.

À Professora Veridiana pelas colaborações, confiança e por me permitir fazer parte de uma equipe composta por excelentes profissionais (professores e pesquisadores).

À Lorena, pelas colaborações e troca de conhecimentos.

A minha co-orientadora Patrícia, pelas colaborações, confiança, ensinamentos e paciência.

Agradeço imensamente ao Samuel, exemplo de profissional e pesquisador que tenho grande admiração, pela sua inteligência, força de vontade e determinação, paciência e humildade. Muito obrigada por tudo!

A minha orientadora Daiana, por todas as oportunidades, confiança, atenção, paciência, pelos ensinamentos, por acreditar em mim e me fazer uma pesquisadora melhor a cada dia. Quero tê-la sempre em minha vida.

Ao meu amigo e parceiro de pesquisa Leonardo, pela ajuda, companheirismo, pelos momentos divertidos, troca de conhecimentos e por estar sempre comigo. Amo trabalhar com você.

Ao meu melhor amigo e companheiro de laboratório Vinícius. Sua presença é mais do que importante para mim. Meu parceiro de pesquisa, que me acompanha em viagens, congressos e divide comigo o seu melhor. Obrigada por acreditar em mim, me incentivar, me passar segurança, compartilhar momentos bons das nossas vidas, realizar experimentos comigo e me fazer rir a todo momento, mesmo durante as dificuldades que enfrentamos. Tudo fica mais leve e divertido com a sua presença. Amo você.

Ao meu amigo e também companheiro de laboratório Thiago, pela ajuda, por estar sempre ao meu lado, acreditar em mim em todos os momentos, por me ensinar bioquímica todos os dias de experimentos e por ser uma pessoa tão maravilhosa. Admiro a sua dedicação e amor pela pesquisa e sei que sempre terei você como parceiro e amigo. Obrigada por me passar tanta tranquilidade, segurança e pelos momentos de descontração.

Aos demais amigos, que acreditam em mim, e torcem pela realização dos meus sonhos pessoais e profissionais. Obrigada por tudo!

Aos demais familiares que também contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional ao longo desta etapa, a qual me orgulho tanto.

Agradeço à Maria Manuela, pelos incentivos, por estar sempre ao meu lado, por acreditar e torcer por mim de uma forma tão positiva e doce.

Agradeço à Universidade Federal da Bahia (IMS), ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e todos que dele fazem parte, à Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto Butantan e todos os pesquisadores e profissionais que tornaram possível a execução desta pesquisa.

Aos meus professores e colegas de mestrado.

Às agências de fomento Capes, FAPESB, FAPEMIG.

RESUMO

O câncer de pulmão é o terceiro tipo mais comum de câncer no Brasil e está associado às altas taxas de incidência e de mortalidade, em consequência da agressividade sustentada pelos processos de angiogênese e metástase. Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado que as Fosfolipases A₂ (PLA₂) isoladas da peçonha de serpentes vêm sendo investigadas com o objetivo de desenvolver futuros fármacos para terapia contra o câncer. Neste trabalho objetivamos investigar pela primeira vez o efeito antimetastático e antiangiogênico da MjTX-II, uma PLA₂ isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* sobre células de câncer de pulmão e células endoteliais. A partir de ensaios de cultura celular *in vitro* e técnicas *ex vivo*, demonstramos que a PLA₂ atua sobre as células tumorais de câncer de pulmão A549, reduzindo sua viabilidade e inibindo processos fundamentais para seu crescimento e metástase, como adesão, migração, invasão e diminuição do citoesqueleto de actina sem interferir significadamente nas células de pulmão não tumorigênicas (BEAS-2B). Além disso, causou alterações no ciclo celular, levou à produção de espécies reativas de oxigênio, bem como modulou a expressão de genes pró e antiangiogênicos e diminuiu a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células endoteliais HUVECs. Por fim, a toxina também inibiu os processos de angiogênese *ex vivo* em modelo de anel de aorta. Concluímos, portanto, que a MjTX-II apresenta um efeito antimetastático e antiangiogênico *in vitro* e *ex vivo*, representando uma ferramenta biotecnológica para o estudo de neoplasias e uma molécula promissora como modelo farmacológico para terapia antitumoral.

Palavras-chave: PLA₂, peçonha de serpente, *Bothrops moojeni*, câncer de pulmão, metástase e angiogênese.

ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled cell division, which escapes the mechanisms of cell cycle control and apoptosis, invades other tissues, promoting angiogenesis and metastasis. Lung cancer is the third most common type of cancer in Brazil and is associated with high incidence and mortality rates, as a result of the aggressiveness sustained by the processes of angiogenesis and metastasis. In this context, several studies have shown that Phospholipases A₂ (PLA₂) isolated from snake venom have been investigated with the goal of developing future drugs for cancer therapy. In this work we aimed to investigate for the first time the antimetastatic and antiangiogenic effects of MjTX-II, a PLA₂ isolated from *Bothrops moojeni* venom on lung cancer cells and endothelial cells. From cell culture assays *in vitro* and *ex vivo* techniques, we demonstrated that PLA₂ acts on A549 lung cancer tumor cells, reducing their viability and inhibiting fundamental processes to their growth and metastasis, such as adhesion, migration, invasion, and decrease of the actin cytoskeleton without significantly interfering with non-tumorigenic lung cells (BEAS-2B). Furthermore, it caused alterations in the cell cycle, led to the production of reactive oxygen species, as well as modulated the expression of pro and anti-angiogenic genes and decreased the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in HUVECs endothelial cells. Finally, the toxin also inhibited angiogenesis processes *ex vivo* in an aortic ring model. We therefore conclude that MjTX-II exhibits an antimetastatic and antiangiogenic effect *in vitro* and *ex vivo*, representing a biotechnological tool for the study of neoplasms and a promising molecule as a pharmacological model for antitumor therapy.

Keywords: PLA₂, snake venom, *Bothrops moojeni*, lung cancer, metastasis and angiogenesis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Câncer de Pulmão	2
2.2 Tumorigênese	4
2.2.1 Metástase	6
2.2.2 Angiogênese Tumoral	8
2.3 Fosfolipases A ₂ (PLA ₂) de peçonha de serpentes	10
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
3.2.1 Efeito antimetastático	13
3.2.2 Efeito antianiogênico	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Obtenção da peçonha.....	14
4.2 Animais.....	14
4.3 Purificação da PLA ₂ MjTX-II	14
4.4 Cultura de células	15
4.5 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT em diferentes linhagens celulares	15
4.6 Ensaio de proliferação celular ou formação de colônias	16
4.7 Ensaio de mensuração de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)	16
4.8 Ensaio de ciclo celular	16
4.9 Ensaio de inibição da adesão celular	17
4.10 Ensaio de migração celular por Wound Healing	17
4.11 Ensaio de migração e invasão celular por Transwell	17
4.12 Ensaio de quantificação do citoesqueleto de F-actina	18
4.13 Ensaio de angiogênese <i>in vitro</i>	18
4.14 Dosagem de VEGF no sobrenadante de células HUVEC	18
4.15 Ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)	19
4.16 Ensaio de angiogênese <i>ex vivo</i>	20
4.17 Análises estatísticas	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 1	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1. Principais marcadores tumorais (Hallmarks of cancer)	5
---	---

Capítulo I

Figura 1. Purificação da PLA ₂ -Lys49 MjTX-II	37
Figura 2. Ensaio de viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT.....	38
Figura 3. Ensaio de proliferação celular.....	39
Figura 4. Ensaio de inibição da adesão celular.....	40
Figura 5. Ensaio de migração celular por Wound-Healing.	41
Figura 6. Ensaio de migração celular por Transwell.....	43
Figura 7. Inibição da invasão celular pela técnica de Transwell.....	44
Figura 8. Ensaio de quantificação dos níveis de F-actina	46
Figura 9. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT.....	48
Figura 10. Ensaio de proliferação celular.....	49
Figura 11. Ensaio de ciclo celular.	50
Figura 12. Ensaio de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).	51
Figura 13. Ensaio de inibição da adesão celular.....	52
Figura 14. Ensaio de Migração celular por Wound-Healing.....	53
Figura 15. Ensaio de Migração celular por Transwell	54
Figura 16. Ensaio de inibição da angiogênese <i>in vitro</i>	55
Figura 17. Dosagem de VEGF do sobrenadante de células HUVEC.....	55
Figura 18. Ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)	56
Figura 19. Ensaio de inibição da angiogênese <i>ex vivo</i>	57

LISTA DE TABELAS

Dissertação

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na qPCR	36
---	----

Capítulo I

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na qPCR	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µg – Micrograma

A549 - Células de câncer de pulmão

ADC – Adenocarcinoma

AdPLA – Fosfolipases A₂ adiposas

AMBIC – Tampão bicarbonato de amônio

Ang-1 - Angiopoetina 1

Ang-2 - Angiopoetina 2

ANGPT1 – Gene Angiopoetina 1

Asp49 – Aspartato49

ATCC - American Type Culture Collection

Bcl2 - B-cell lymphoma 2

Bcl-XL - B-cell lymphoma-extra large

BEAS-2B – Células de pulmão não tumorigênicas

bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico

BnSP-6 – Fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis*

BnSP-7 – Fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis*

BPB - *p*- bromofenacil

BthTX-I - Fosfolipase A₂ da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*

c-FLIP - FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein

Ca²⁺ - Íon cálcio

CAM - Membrana corioalantóide de galinha

CC-PLA2-1 Fosfolipase A₂ da peçonha de *Cerastes cerastes*

CC-PLA2-2 Fosfolipase A₂ da peçonha de *Cerastes cerastes*

CDH-1 - E-caderina

CO₂ - Dióxido de carbono

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

cPLA₂s - Fosfolipases A₂ citosólicas e cálcio dependentes

CrTX – Crotoxina

CTNNB1 - Catenin beta 1
DCF - 2', 7'-diclorofluoresceína
DTT - Ditionitrito
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNAc - Ácido desoxirribonucleico complementar
EMT - Transição epitelial para mesenquimal
GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto
FL - Flavonidina
H2DCF-DA - Peróxido de 2', 7'-diclorodihidrofloreceína diacetato
HBMECs - Células endoteliais microvasculares de cérebro humano
HCl - Ácido clorídrico
HMEC-1 - Células endoteliais
HUVEC - Células endoteliais do cordão umbilical humano
HT1080 - Células de fcosarcoma
IGR39 - Células de melanoma
iPLA_{2s} – Fosfolipases A₂ independentes de cálcio
JT - Jarastatina
K562-R – Célula de leucemia
K562-S - Célula de leucemia
KDR - Receptor do domínio de inserção da quinase
KDR-bp – Fosfolipase A₂ Lys49 homologa da peçonha de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*
LCLC - Carcinoma de células grandes do pulmão
Lys49 – Lisina49
LOX - Enzima de reticulação de matriz lisiloxidase
LPLA₂ – Fosfolipases A₂ lisossomais
M – Mol
m – massa
mA - Miliampampère
MDA-MB-231 - Células de câncer de mama
MEC – Matriz extra celular
MFI – Mediana da intensidade de fluorescência
mg - Miligrama
min – minuto

MjTX-II – Miotoxina I
MjTX-II – Miotoxina II
mM – Milimol
MMP2 - Metaloproteinases de matriz
MMP9 - Metaloproteinases de matriz
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difenil tetrazólio
MVL-PLA₂, Fosfolipases A₂ da peçonha de *Macrovipera lebetina*
ng – Nanograma
NH₄HCO₃ – Bicarbonato de amônio
NK – Células Natural Killer
nm – Nanômetros
NSCLC - Câncer de pulmão de células não pequenas
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAF-AH - Acetil- hidrolases do fator ativador de plaquetas
PBS - Tampão fosfato-salino
PI – Iodeto de propídeo
PIGF - Fator de crescimento da placenta
pH - Potencial hidrogeniônico
PLA₂ – Fosfolipase A₂
qPCR - Quantitative polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase quantitativa).
RNA – Ácido Ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RPMI - Roswell Park memorial Institute
rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal
SCLC - Câncer de pulmão de pequenas células
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis (Sulfato dodecil de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida)
SFB – Soro fetal Bovino
SK-MES-1 - Carcinoma escamoso de pulmão humano
SK-N-SH - Células de neuroblastoma humano
SPCA-1 - Adenocarcinoma de pulmão humano
sPLA_{2s} - Fosfolipases secretadas de baixo peso molecular

SqCC - Carcinoma de células escamosas
SFLT-1 - Soluble fms-like tyrosine kinase-1
SW480 - Células de câncer colorretal
Tek - Receptor tirosina quinase
Tie2 - Receptor tirosina quinase
TGF β - Fator de transformação do crescimento beta
Tris - (Hidroximetil)aminometano
TRITC - Isotiocianato de tetrametilrodamina B
TWIST1 - Twist Family BHLH Transcription Factor 1
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A - Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGF-B - Fator de crescimento endotelial vascular B
VEGF-C - Fator de crescimento endotelial vascular C
VEGF-D - Fator de crescimento endotelial vascular D
VEGF-E - Fator de crescimento endotelial vascular E
VEGF-F - Fator de crescimento endotelial vascular F
VEGFR1 – Receptor de VEGF 1

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, devido à sua alta incidência, prevalência, mortalidade e aos elevados custos do tratamento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a segunda principal causa de morte em todo o mundo apresentando crescentes taxas de incidência e mortalidade nos últimos anos (BRAY *et al.*, 2018). O câncer de pulmão é mundialmente a doença maligna mais comum e também umas das principais causas de mortalidade por câncer causando cerca de 1,8 milhões de mortes no ano de 2020 (SUNG, *et al.*, 2021). O câncer de pulmão possui alta mortalidade em consequência da agressividade sustentada pelos processos de angiogênese e metástase (INCA, 2018), decorrentes dos processos característicos de divisão descontrolada das células, as quais escapam dos sinais de inibição do crescimento, evadem dos mecanismos de apoptose e invadem tecidos, promovendo angiogênese e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; SORLIE *et al.*, 2006).

O estabelecimento de uma rede de suprimento sanguíneo sustentado é importante para manter o crescimento celular, assim, os tumores possuem uma vascularização exacerbada quando comparada a tecidos normais, o que é fundamental para o desenvolvimento de neoplasias. Essa neovascularização resulta da formação de microvasos derivados de células endoteliais de capilares localizados ao redor das células tumorais, processo que está intimamente ligado ao crescimento tumoral e ao desenvolvimento de metástases. Além disso, sabe-se que células neoplásicas são capazes de secretar fatores de crescimento pró-angiogênicos, o que pode favorecer a metástase (PINHO, 2005).

Durante a última década houve um progresso no que se refere ao tratamento do câncer e novas terapias moleculares vêm sendo utilizadas. O Bevacizumab, por exemplo, fármaco utilizado na quimioterapia do câncer de pulmão, é um anticorpo monoclonal, que bloqueia a ação do VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), impedindo assim o crescimento de vasos sanguíneos no microambiente tumoral (PRESTA, 1997; RECK *et al.*, 2020; WAN *et al.*, 2019).

Estudos já demonstraram que diversos produtos de origem natural têm potencial para serem utilizados como ferramentas terapêuticas alternativas para o tratamento do câncer como, por exemplo, as fosfolipases A₂ isoladas das peçonhas de serpentes (PLA₂) (AZEVEDO *et al.*, 2016; BENATI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2015). O efeito antitumoral de PLA₂ isoladas de peçonhas de serpentes sobre diferentes tipos de câncer vem sendo

amplamente explorado, principalmente em células de câncer de mama (AZEVEDO *et al.*, 2019; BENATI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018), contudo, o efeito antimetástático e antiangiogênico dessa classe de toxinas sobre câncer de pulmão ainda precisa ser melhor investigado, uma vez que, não existem trabalhos que explorem esses efeitos nesse tipo celular.

Nesse contexto, o presente estudo abordará diferentes técnicas de cultura celular em modelos *in vitro* e *ex vivo* para avaliar, pela primeira vez, as ações antimetastáticas e antiangiogênicas da fosfolipase A₂ MjTX-II Lys-49, isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, em células de câncer de pulmão, células endoteliais, e em anéis aórticos de camundongo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de pulmão

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, devido à sua alta incidência, prevalência, mortalidade e aos elevados custos do tratamento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo apresentando crescentes taxas de incidência e mortalidade nos últimos anos (BRAY *et al.*, 2018). Em 2012, os cânceres mundialmente mais comuns em homens eram os de pulmão, com uma taxa de incidência de 1,2 milhões, seguido de próstata (1 milhão), colorretal (0,7 milhões), estômago (0,6 milhões) e fígado (0,5 milhões); enquanto que em mulheres, as maiores taxas de incidência foram observadas para o câncer de mama (1,6 milhões), colorretal (0,6 milhões), pulmão (0,6 milhões), colo do útero (0,5 milhões) e estômago (0,3 milhões) (FERLAY *et al.*, 2015).

De acordo com dados da OMS, 19.292.789 novos casos de câncer foram diagnosticados em todo o mundo no ano de 2020. O câncer de mama, responsável por 2,26 milhões de casos, representa o tipo de maior incidência, seguido do câncer de pulmão com 2,21 milhões de casos, cólon e reto (1,93 milhões de casos), próstata (1,41 milhões), pele do tipo não-melanoma (1,20 milhões) e estômago (1,09 milhões) em ambos os sexos. É relevante considerar que o câncer de pulmão, que acomete, em sua maioria, homens entre 50 e 70 anos de idade, tem se tornado um problema de saúde crescente também entre as mulheres. Devido à sua alta incidência, o câncer de pulmão é mundialmente a doença maligna mais comum e a principal causa de mortalidade por câncer causando cerca de 1,8 milhões de mortes no ano de 2020 em ambos os sexos (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, 592.212 novos casos de câncer foram diagnosticados em 2020, dentre os quais 40.409 (9,3%) representam o câncer de pulmão, terceiro tipo de maior incidência no país, atrás apenas do câncer de mama com 97.278 casos (16,4%), e do câncer de próstata com 88.492 casos (14,9%) (WHO, 2020). Em termos de mortalidade, o câncer de pulmão apresenta taxa crescente. Em 2015, a doença foi responsável por 26.498 mortes e em 2020 manteve-se ocupando o primeiro lugar no ranking com 35.160 mortes, apresentando uma alta taxa de letalidade diante dos 40.409 casos de câncer de pulmão diagnosticados nesse mesmo ano (INCA, 2021).

A incidência de casos de câncer depende de vários fatores causais, dentre eles, o tabagismo, consumo de álcool, obesidade, falta de atividade física e exposição à carcinógenos (WHITEMAN; WILSON, 2016). Doenças pulmonares preexistentes, exposição a substâncias danosas e histórico familiar da neoplasia também constituem fatores de risco para o desenvolvimento da doença, entretanto, o tabagismo é o principal fator podendo aumentar a probabilidade de 10 a 30 vezes (SHIELDS, 2002; WOLPAW, 1996). Destaca-se que a propensão à mortalidade devido ao câncer de pulmão no Brasil relaciona-se ao perfil epidemiológico de mortalidade associada com o tabaco (INCA, 2012).

A diminuição do tabagismo vem contribuindo para a diminuição do número de novos casos de câncer de pulmão, contudo o diagnóstico tardio ainda dificulta a sobrevivência desses pacientes. A taxa de sobrevivência do câncer de pulmão é maior nos estágios iniciais (56%), ou seja, momento no qual a doença mantém-se localizada. Com a progressão da doença, a taxa de sobrevivência relativa em cinco anos diminui para 18%. Entretanto, apenas 16% dos casos são diagnosticados em estágio inicial (INCA, 2021).

Os diferentes tipos de câncer de pulmão podem ser classificados em dois tipos histológicos principais: o câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) (HSIN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2013), responsável por mais de 80% da incidência do câncer, e o câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) (CHEN *et al.*, 2012), que representa 14% dos novos casos, sendo caracterizado por apresentar uma rápida disseminação e metástase precoce (BYERS; RUDIN, 2015).

No passado, o foco principal do diagnóstico clínico era fazer a distinção entre SCLC e NSCLC, no entanto, o advento do perfil molecular e a terapia direcionada renovaram o interesse em classificar o NSCLC em adenocarcinoma (ADC) e suas variantes, carcinoma de células escamosas (SqCC) e carcinoma de células grandes do pulmão (LCLC). Além disso, outros tipos, incluindo tumores do tipo glândula salivar, carcinomas sarcomatóides e outros,

representam uma pequena parte do total de casos de NSCLC. O ADC é normalmente encontrado nas áreas externas do pulmão e tende a crescer mais lentamente do que os outros tipos de câncer de pulmão, apresentando maiores chances de ser diagnosticado antes de se disseminar. SqCC está relacionado com o tabagismo e tende a ser encontrado na região central dos pulmões, próximo aos brônquios. O LCLC pode aparecer em qualquer parte do pulmão e tende a crescer e se disseminar rapidamente (RODRIGUEZ-CANALES *et al.*, 2016; TRAVIS *et al.*, 2015).

O SCLC normalmente apresenta-se como um tumor central em nódulo solitário, cujo diagnóstico é feito através de exames citológicos de escarro, broncoscopia, biópsia pulmonar, ou em alguns casos, biópsia por mediastinoscopia, toracotomia ou toracoscopia (INCA, 2002). Testes moleculares constituem ferramentas importantes para otimizar a terapia do câncer, entretanto, o acesso e a introdução dessa estratégia representam ainda, desafios a serem superados em vários países (de LIMA LOPES *et al.*, 2012).

Os tratamentos recomendados para o câncer de pulmão são a quimioterapia, radioterapia, cirurgia e tratamento com alvos específicos, a depender da classificação do câncer. O tratamento do câncer possui diversos efeitos colaterais e esses podem persistir no paciente mesmo após o término do tratamento (GEGECHKORI *et al.*, 2017) Assim, considera-se muito importante a presença de uma equipe multidisciplinar composta por profissionais de diferentes áreas para atender o paciente (INCA, 2021).

É notório que o câncer de pulmão é um grande desafio a ser enfrentado em todas as áreas da oncologia, desde a prevenção até as estratégias terapêuticas (ASSOUN *et al.*, 2017). Sabe-se que, o diagnóstico precoce do câncer diminui a possibilidade de metástase e assim, contribui para uma maior eficácia do tratamento, menor custo, maiores chances de sobrevivência e melhor qualidade de vida (WHO, 2018).

2.2 Tumorigênese

O câncer é uma doença que pode ser desencadeada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo, tais como, danos no reparo do DNA, inflamação, disfunções hormonais, pré-disposição genética, tabagismo, consumo excessivo de álcool, má alimentação, dentre outros (RONDEAU *et al.*, 2019). Uma vez estabelecido, o processo de carcinogênese pode ser dividido em pelo menos três estágios: iniciação, promoção e progressão. O primeiro estágio da carcinogênese, a iniciação, resulta de uma alteração

genética irreversível. O estágio de promoção não envolve mudanças na estrutura do DNA, mas sim na expressão do genoma mediada por interações promotor-receptor. O estágio final irreversível de progressão é caracterizado por instabilidade cariotípica e crescimento maligno das células (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PITOT, 1993; RONDEAU *et al.*, 2019).

As alterações genéticas e cromossômicas que ocorrem durante a iniciação, acumulam-se em uma célula, dando origem ao desenvolvimento tumoral. Tais alterações genéticas podem ocorrer em duas classes gênicas, denominadas genes reguladores do crescimento: os proto-oncogenes responsáveis pelo crescimento celular e os genes de supressão tumoral os quais atuam inibindo o crescimento celular. As células tumorais são hábeis em resistir à morte, uma vez que aumentam a expressão de reguladores antiapoptóticos e regulam negativamente fatores pro-apoptóticos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, as células cancerosas são capazes de evitar os supressores de crescimento, contornando os mecanismos de regulação negativa da proliferação celular. Sabe-se que, a inibição por contato célula-célula é um importante fator para suprimir a proliferação celular e manter a homeostase, entretanto, no câncer, esse mecanismo não ocorre (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Por fim, as células tumorais invadem outros tecidos, promovendo a angiogênese e metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; SORLIE *et al.*, 2006). A figura 1 descreve os principais marcadores tumorais, conhecidos como Marcadores do Câncer (Hallmarks of cancer) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

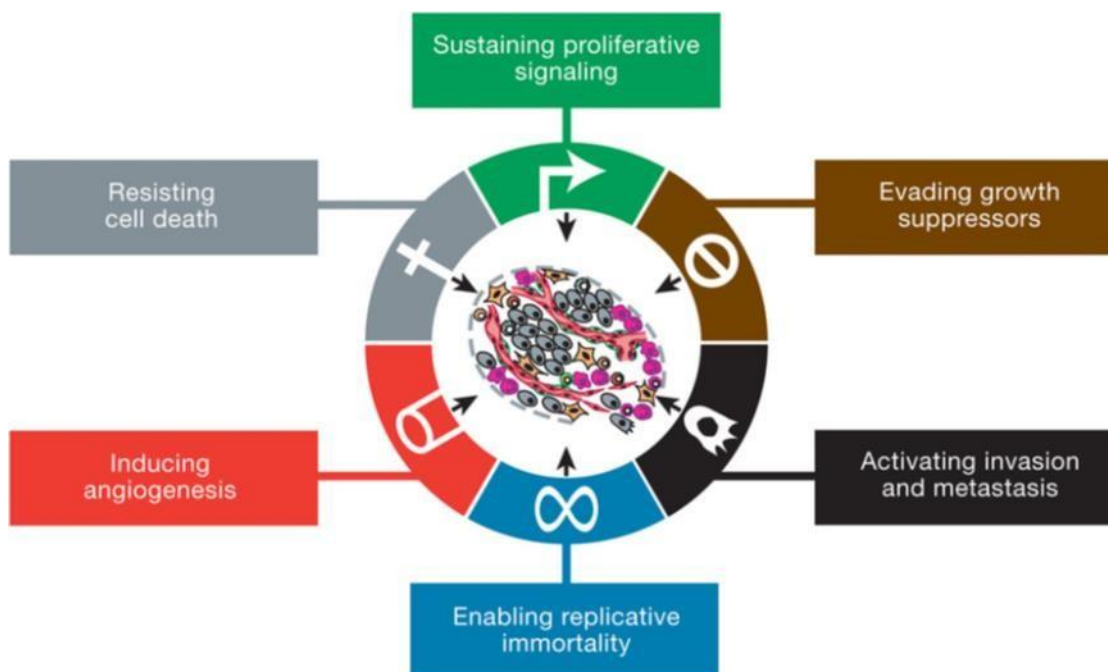


Figura 1. Principais marcadores tumorais, conhecidos como Marcadores do Câncer (Hallmarks of cancer). Quadro verde: Sinalização da proliferação; Quadro marrom: Evasão dos supressores de crescimento; Quadro

Preto: Ativação da invasão e metástase; Quadro azul: Imortalidade; Quadro vermelho: indução da angiogênese; Quadro cinza: resistência à morte celular. Fonte: HANAHAN e WEINBERG, 2011.

2.2.1 Metástase

Os tumores primários em geral não causam a morte do paciente (com exceção de alguns tipos, como câncer de pulmão e fígado). A maior parte da mortalidade relacionada aos tumores deve-se à complicações associadas à metástase, que é caracterizada como um conjunto de eventos relacionados, os quais, de maneira síncrona, permitem com que as células tumorais migrem e colonizem outros órgãos (MOLLOY; VAN'T VEER, 2008; TALMADGE; FIDLER, 2010).

O processo metastático é descrito como uma cascata de eventos inter-relacionados, processos concorrentes e parcialmente sobrepostos à medida que as células assumem novos fenótipos, como descrito a seguir: 1) Angiogênese - as células cancerígenas induzem o desenvolvimento de uma rede vascular (ou linfática). Os vasos fornecem nutrientes para o tumor crescer e uma rota de escape para as células tumorais entrarem na circulação. 2) Intravasamento - as células tumorais malignas devem se desprender das células vizinhas e da matriz, invadir a membrana basal capilar e migrar através da barreira endotelial para entrar na corrente sanguínea; acredita-se que a transição para o fenótipo mesenquimal ajude nesse processo migratório. 3) Sobrevivência: a maioria das células tumorais circulantes morrerá nas primeiras 24 horas por atrito ou citotoxicidade direta e lise por células Natural Killer (NK) em imunovigilância. Assim, as células tumorais ativadas por plaquetas adquirem um perfil de expressão gênica prometastática, que inclui a expressão intensificada de várias proteases, citocinas e fatores de crescimento que podem contribuir para a metástase (LABELLE; HYNES, 2012). Dessa forma, as plaquetas atuam não somente como um escudo físico para as células metastáticas, mas protegem as células tumorais nas horas iniciais após o intravasamento aumentando o extravasamento de células tumorais por meio das vias de transição para o fenótipo mesenquimal. 4) Extravasamento: acredita-se que as células tumorais transmigram através das junções interendoteliais para extravasar em órgãos distantes. 5) Formação de tumor secundário: as células tumorais malignas devem proliferar e induzir angiogênese para resultar em um tumor secundário clinicamente relevante (BIELENBERG; ZETTER, 2015; TALMADGE; FIDLER, 2010; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

O início da metástase não é simplesmente um evento autônomo da célula tumoral, mas é fortemente influenciado por complexos microambientes dos tecidos. Há muito se reconhece

que as interações entre as células cancerígenas, fibroblastos do estroma, células endoteliais, células do sistema imune, bem como as alterações na tensão de oxigênio do tecido e a arquitetura da matriz extracelular adjacente impactam profundamente a progressão tumoral (SUHAIL *et al.*, 2019). Assim, no câncer, o microambiente (nicho metastático) desempenha um papel importante de suporte a formação de metástases. O nicho pré-metastático pode ser induzido por citocinas e enzimas secretadas pelo tumor primário. Os principais componentes do nicho pré-metastático incluem as proteínas da matriz extracelular como fibronectina, células derivadas da medula óssea que expressam VEGFR1 (Receptor de VEGF 1), metaloproteinases de matriz (MMP2 e MMP9), enzima de reticulação de matriz lisiloxidase (LOX), quimiocinas, entre outras (BIELENBERG; ZETTER, 2015; LABELLE; HYNES, 2012). As enzimas proteolíticas extracelulares, serinoproteinases e metaloproteinases, têm sido implicadas na metástase do câncer e a ideia básica é que a liberação de enzimas proteolíticas em tumores facilita a invasão de células cancerosas no tecido normal circundante por decomposição de membranas basais e componentes da matrix extracelular (ACUFF *et al.*, 2006; MIGNATTI; RIFKIN, 1993).

O processo de adesão célula-célula, considerado como tendo um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da integridade das estruturas epiteliais, sofre várias modificações durante o processo de tumorigênese e metástase. Durante a metástase, ocorre a perda de adesividade célula-célula, que é o principal fenômeno responsável pelas propriedades invasivas de um tumor. A aquisição desse fenótipo de perda de adesão célula-célula, juntamente com o remodelamento do citoesqueleto de actina, é acompanhada por uma diminuição da expressão de marcadores epiteliais (como E-caderina), aumento da expressão de marcadores como vimentina e fibronectina, entre outras profundas mudanças na sinalização celular e na expressão gênica que permitem as células epiteliais adquirir um fenótipo mesenquimal em um processo denominado transição epitelial para mesenquimal (EMT) (LAMOUILLE *et al.*, 2014; THIERY *et al.*, 2002). Durante esses estágios iniciais do desenvolvimento do tumor, as células tumorais que foram submetidas a EMT podem invadir a matriz local e os vasos sanguíneos sendo transportadas na circulação. Sendo assim, o processo de angiogênese é extremamente importante para o estabelecimento da metástase (BIELENBERG; ZETTER, 2015).

2.2.2 Angiogênese tumoral

O estabelecimento de uma rede de suprimento sanguíneo sustentado é importante para manter o crescimento celular. Assim, os tumores, possuem uma vascularização exacerbada quando comparada a tecidos normais, o que é fundamental para o desenvolvimento de neoplasias. Essa vascularização resulta da formação de microvasos derivados de células endoteliais de capilares localizados ao redor das células tumorais, sendo essa proliferação vascular local chamada de angiogênese tumoral (FOLKMAN, 1971, PINHO, 2005). Assim, as células cancerígenas secretam uma série de fatores pró-angiogênicos responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos que irão suprir as necessidades do tumor (DECAUSSIN *et al.*, 1999; NIETHAMMER *et al.*, 2002; YEN *et al.*, 2000) fornecendo nutriente e oxigênio, dentre outros fatores (POPPER, 2016). Além disso, a hipóxia induz positivamente a expressão de muitos fatores de crescimento pró-angiogênicos nas células tumorais. Destaca-se também que muitas células dentro do microambiente tumoral, como os fibroblastos e macrófagos, podem secretar fatores pró-angiogênicos que causam aumento da vascularização (BIELENBERG *et al.*, 2015).

Durante a angiogênese há o envolvimento de diversas proteínas e fatores estimulantes que contribuem e facilitam a neovascularização, resultando na estimulação tumoral (PINHO, 2005), como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (AKBULUT *et al.*, 2002; STRAUME; AKSLEN, 2002; POON *et al.*, 2001) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BROLL *et al.*, 2001; CASCINU *et al.*, 2000; CHIN *et al.*, 2003; CUBU *et al.*, 2004) que demonstra ação mitogênica (PINHO, 2005). Além disso, alterações genéticas contribuem para uma desregulação da expressão de fatores pró e antiangiogênicos, o que facilita o desenvolvimento de novos vasos (KERBEL, 2000).

Resumidamente, o processo de angiogênese tumoral segue as etapas sequenciais: 1) células tumorais liberam fatores de crescimento, como VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) e FGF (Fator de crescimento de fibroblasto), para atrair células endoteliais em direção à massa tumoral; 2) células endoteliais (e outras células) secretam enzimas para degradar as proteínas da membrana basal da vênula capilar ou pós-capilar; 3) células endoteliais (células de ponta) começam a migrar ou brotar em direção à fonte do estimulante; 4) célula endotelial continua a migrar e as células atrás da célula da ponta principal, chamadas de células-tronco, proliferam e se alinham; 5) células endoteliais alinhadas então se transformam e criam um lúmen ou tubo no centro do vaso recém-formado; 6) o sangue é perfundido no lúmen do novo broto. Normalmente, os novos capilares se enrolam e se interconectam para criar um plexo dentro do tumor (BIELENBERG; ZETTER, 2015).

A angiogênese tumoral está intimamente ligada a progressão tumoral, e ao

desenvolvimento de metástases, sendo estas mais frequentes após a neovascularização devido a uma maior facilidade de migração por meio da circulação sanguínea. Além disso, sabe-se que células neoplásicas são hábeis em secretar fatores de crescimento angiogênico, o que favorece a metástase (PINHO, 2005). Os neovasos não apenas fornecem nutrientes para o crescimento do tumor, mas também fornecem uma rota de fuga para as células tumorais entrarem na circulação. Em geral, quanto maior o tumor e quanto mais densidade vascular dentro do tumor, maior a chance de fuga de uma célula tumoral (BIELENBERG *et al.*, 2015).

Durante a última década houve um progresso no que se refere ao tratamento do câncer e novas terapias moleculares vêm sendo utilizadas. O Bevacizumab, por exemplo, fármaco utilizado na quimioterapia do câncer de pulmão, é um anticorpo monoclonal, que bloqueia a ação do VEGF, ou seja, impede o crescimento de vasos sanguíneos que alimentam tumores malignos (PRESTA, 1997; RECK *et al.*, 2020; WAN *et al.*, 2019).

O VEGF é um fator de crescimento angiogênico ligado a heparina de alta especificidade às células endoteliais (FERRARA; HENZEL, 1989; GOSPODAROWICZ *et al.*, 1989), sendo o principal fator regulador da angiogênese (NEUFELD *et al.*, 1999). Cinco subtipos de VEGF já foram identificados em mamíferos, sendo eles, o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o PlGF (fator de crescimento da placenta) (FERRARA, 2004; YAMAZAKI; MORITA, 2006). Além disso, fontes exógenas de VEGF foram relatadas, como VEGF viral (VEGF-E) e o de peçonha de serpente (VEGF-F) (MEYER *et al.*, 1999; OGAWA *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 2004; WISE *et al.*, 1999; YAMAZAKI *et al.*, 2003).

O VEGF pode se ligar a diferentes receptores, como os receptores tirosina quinases (receptor de VEGF 1) e os KDR (receptor do domínio de inserção da quinase ou receptor de VEGF 2). Ao se ligarem a esses receptores nas superfícies de células endoteliais vasculares, induzem uma série de eventos que culminam na angiogênese (FERRARA 2004; OLSSON *et al.*, 2006). O VEGF contribui com a angiogênese e desenvolvimento do tumor induzindo a permeabilização vascular e formação de fenestrações dos vasos sanguíneos. Além disso, permite a formação de organelas vesículo-vacuolares que contribuem para o extravasamento de proteínas do sangue, que fornece, após processos de formação de um gel de fibrina extravascular, uma matriz que sustenta o crescimento de células endoteliais e células tumorais, bem como o desenvolvimento do tumor (DVORAK *et al.*, 1992; DVORAK *et al.*, 1996).

Nesse sentido, a inibição da angiogênese tumoral pode representar uma estratégia benéfica para o tratamento do câncer (MARSON *et al.*, 2001; da SILVA *et al.*, 2005; da SILVA *et al.*, 2006). Assim, estudos têm sido realizados a fim de verificar moléculas com potencial antiangiogênico que possam ser utilizados futuramente como ferramentas terapêuticas (DHANANJAYA; SIVASHANKARI, 2015; KESSENTINI-ZOUARI *et al.*, 2010; POLLONI *et al.*, 2021). Dessa forma, há a necessidade de se estudar novas moléculas que

tenham como alvo inibir esse importante processo para o desenvolvimento tumoral que possui implicações na metástase. Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado que as toxinas de peçonhas de serpentes vêm sendo investigadas com o objetivo de desenvolver futuros fármacos para terapia contra o câncer (CHERNYSHENKO *et al.*, 2017; de OLIVEIRA GUIMARÃES *et al.*, 2017; IZIDORO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2018) As toxinas de peçonha de serpentes apresentam atividades biológicas não somente em relação à capacidade de tais moléculas em reduzir a proliferação tumoral, mas também outros processos cruciais para o desenvolvimento do câncer, como metástase e angiogênese. Dentre essas moléculas, estão as metaloproteases, lectinas, L-aminoácido oxidase e as fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de serpentes (PLA₂) (AZEVEDO *et al.*, 2016; GEBRIM *et al.*, 2009; KLEIN *et al.*, 2011; NOLTE *et al.*, 2012; VYAS *et al.*, 2013; ZAINAL ABIDIN *et al.*, 2018).

2.3 Fosfolipases A₂ (PLA₂) de peçonha de serpentes

A família das fosfolipases (EC 3.1.) é abundantemente encontrada na natureza, sendo representada por enzimas hidrolases, importantes para o metabolismo e funções de fosfolipídios, lipídios da membrana, sinalização, digestão, composição da membrana, inflamação, dentre outros processos ((BURKE; DENNIS, 2009A). De acordo com o sítio de clivagem, as fosfolipases classificam-se em quatro famílias principais (A, B, C e D) (ALOULOU *et al.*, 2012; FILKIN *et al.*, 2020), sendo as fosfolipases A₂ (PLA₂) o grupo mais abundante e estudado (BURKE; DENNIS, 2009a; FILKIN *et al.*, 2020).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) compreendem um amplo grupo de enzimas que atuam no metabolismo de lipídeos e possuem grande interesse médico, uma vez que estão envolvidas em uma série de doenças inflamatórias em humanos, além de atuarem nos envenenamentos ofídicos (GARCIA-DENEGRI *et al.*, 2010). As PLA₂ são caracterizadas pela hidrólise de fosfolipídeos especificamente na ligação sn-2, de modo a convertê-los em ácidos graxos e lisofosfolipídeos (BALSINDE *et al.*, 1999; DENNIS, 1994). Os ácidos graxos liberados, como por exemplo, o ácido araquidônico pode gerar eicosanóides, como prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que estão relacionados a ocorrência de vários eventos, tais como patologias, inflamação, ativação de plaquetas, dentre outros. Já os lisofosfolipídeos estão associados a sinalização celular (BURKE; DENNIS, 2009a; GUTIERREZ; LOMONTE, 2013).

As PLA₂ classificam-se em 16 grupos e seis categorias de acordo com a composição, peso molecular, sítios ativos, necessidade de íons para realização de suas funções, dentre outros critérios, sendo elas, as citosólicas e cálcio dependentes (cPLA₂s), as independentes de cálcio (iPLA₂s), as acetil- hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), as lisossomais (LPLA₂), as adiposas (AdPLA) e as fosfolipases secretadas de baixo peso molecular (sPLA₂s) (BURKE; DENNIS, 2009a; BURKE; DENNIS, 2009b; DENNIS *et al.*, 2011; DUNCAN *et*

al., 2008). As PLA₂s secretadas (sPLA₂s) necessitam de cálcio para a atividade catalítica (DENNIS et al., 2011; SCHALOSKE; DENNIS, 2006;) e encontram-se divididas 17 grupos (A, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII and XIV) (BURKE; DENNIS, 2009a; FILKIN *et al.*, 2020).

As PLA₂ de peçonhas de serpentes da família Viperidae correspondem ao grupo II das fosfolipases secretadas (BURKE; DENNIS, 2009b), que por sua vez se dividem em dois grupos, as enzimaticamente ativas e as inativas (CASAIS-E-SILVA *et al.*, 2016; LOMONTE; RANGEL, 2012). Essa subdivisão engloba fosfolipases que diferem quanto à mudança do aminoácido aspartato por lisina na posição 49 da cadeia polipeptídica, sendo as PLA₂ cataliticamente ativas, as Asp49 e as cataliticamente inativas as Lys49. Essa mudança de aminoácido resulta na perda da função enzimática das Lys49, uma vez que o aspartato é fundamental para a ligação com o Ca²⁺, íon importante para a função da enzima (ARNI; WARD, 1996).

As PLA₂s de peçonha de serpentes (svPLA₂) podem apresentar ação neurotóxica, miotóxica, cardiotoxica, atividade hipotensiva, capacidade hemolítica e edematogênica, bem como ação anticoagulante e efeitos na agregação plaquetária (ANDRILAO-ESCARSO *et al.*, 2000; ANDRILAO-ESCARSO *et al.*, 2002; BRAUD, BON, WISNER, 2000; GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1997; KINI, 2005; KINI; EVANS, 1989; ROSENBERG, 1990; SOARES *et al.*, 2004; VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

O efeito biológico das svPLA₂ cataliticamente inativas (Lys49) está associado à região C-terminal da molécula (115-129), local composto por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos (GEBRIM *et al.*, 2009; NÚÑEZ *et al.*, 2001). Outros mecanismos de ação e atividades moleculares podem estar envolvidos nos efeitos dessas toxinas, de maneira a complementar ou até mesmo potencializar seus efeitos, causadores de danos à membrana celular devido à interação com alguns aceptores aniônicos (LOMONTE *et al.*, 2003; STABELI *et al.*, 2006).

Apesar dessas complicações decorrentes do envenenamento, as PLA₂ de peçonhas de serpentes podem ser utilizadas como ferramentas terapêuticas, pois possuem grande potencial biológico ao exibirem ações antiparasitárias (GRABNER *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2021), antivirais (CECILIO *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2020) antitumorais (SILVA *et al.*, 2015) e antiangiogênicas (POLLONI *et al.*, 2021).

Em trabalho realizado por Azevedo e colaboradores em 2016 foi possível verificar a ação da BnSP-6, uma PLA₂ Lys49 de peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, na morte de células de câncer de mama, assim como a inibição da adesão e migração, processos importantes para a progressão e metástase do tumor. Essa mesma proteína possui ainda, efeitos genotóxicos sobre as mesmas células tumorais (AZEVEDO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

A BthTX-I, PLA₂ presente na peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, também

demonstrou ser um alvo promissor nesse campo de pesquisa, uma vez que foi capaz de reduzir a viabilidade de linhagens celulares, como leucemia promielocítica, carcinoma hepatocelular humano, feocromocitoma murino e melanoma murino, bem como causou alteração no ciclo celular das mesmas (SILVA *et al.*, 2015). Outro exemplo de PLA₂ estudada é a MjTX-II, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, que possui ação antitumoral sobre células de câncer de mama, leucemia e tumor de Erlich (STÁBELI *et al.*, 2006). Estudos recentes realizados por Benati e colaboradores em 2018 evidenciaram ainda que, outra PLA₂, a MjTX-I, também isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, possui ação citotóxica, afetando a viabilidade das células de leucemia (BENATI *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos antimetastáticos e antiangiogênicos da PLA₂-Lys49 MjTX-II, isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* em modelos *in vitro* e *ex vivo*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Efeito antimetastático

- Purificar a PLA₂ Lys49 MjTX-II a partir da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*;
- Avaliar a viabilidade e proliferação celular utilizando as células de câncer de pulmão (A549) e células de pulmão não tumorigênicas (BEAS-2B) tratadas com a MjTX-II;
- Investigar o efeito na MjTX-II nos processos de adesão, migração, invasão celular, e citoesqueleto de actina das células A549 e BEAS-2B.

3.2.2 Efeito antiangiogênico

- Avaliar a viabilidade, proliferação e o ciclo de células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVECs) tratadas com a PLA₂ Lys49 MjTX-II;
- Avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio utilizando a linhagem HUVEC;
- Investigar o efeito da toxina na adesão e migração de HUVECs;
- Avaliar a ação antiangiogênica da MjTX-II em modelo *in vitro* em Matrigel utilizando HUVEC;
- Investigar a influência da toxina nos níveis de VEGF liberados pelas HUVECs e a modulação da expressão gênica de VEGF-A, ANGPT1 (angiopoetina 1) e SFLT-1 (Soluble fms-like tyrosine kinase-1);
- Avaliar a ação antigangiogênica da MjTX-II em modelo *ex vivo* por meio do ensaio de anel de aorta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da peçonha

As peçonhas de serpentes *Bothrops moojeni* foram obtidas de espécimes mantidas no Instituto Butantan, possuindo o cadastro de acesso ao Patrimônio Genético nº A2C2534.

4.2 Animais

Os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira (Protocolo 083/2020) e estão em acordo com os princípios éticos de experimentação animal aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados oito camundongos machos de 16 semanas de idade da linhagem BALB/c (20-30 g) mantidos em condições padrões de temperatura 25°C, umidade relativa do ar de 60-65%, ciclo de 12 horas de luz/noite, dieta e água *ad libitum*.

4.3 Purificação da PLA₂ MjTX-II

A MjTX-II foi purificada a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*, segundo o método descrito por Soares e colaboradores, 2004, com modificações. Dessa forma, 50mg da peçonha bruta e liofilizada foi diluída em 2,5mL de solução tampão (NH₄HCO₃ – AMBIC – Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 7,8) e centrifugada a 14000g por 5 min com o sobrenadante sendo aplicado em coluna Mono QTM 5/50 GL trocadora de ânions, utilizando um fluxo de 0,75mL/min no sistema AKTA (GE). Para equilíbrio do sistema antes da aplicação da amostra foi realizada uma passagem de 15 min do tampão A (AMBIC 0,05M) em um fluxo constante de 0,5mL/min, em seguida passou-se o tampão B (AMBIC 0,5M) em fluxo constante de 0,5mL/min e por fim mais 15 min no tampão A no mesmo fluxo. A fase eluente utilizada foi um gradiente de concentração de 0 a 100% de AMBIC 0,5M, com a cromatografia realizada em um fluxo constante de 1mL/min, sendo coletadas frações de 1mL e absorbância monitorada a 280nm. Cada fração obtida foi submetida a uma leitura de dosagem de proteínas totais no Nanovue PlusTM Spectrophotometer (GE), onde 2µl de AMBIC 0,05M foi utilizado como branco, o mesmo volume de amostra foi utilizado para leitura, e a um gel SDS-PAGE para separação das proteínas segundo o seu peso molecular. Ao final deste processo as amostras foram separadas em cinco pools, sendo referentes aos primeiros 5 tubos coletados.

As cinco primeiras frações coletadas na cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q foram recromatografadas em uma nova coluna (HiTrap CM FF) trocadora de cátion, onde 2mL de cada amostra foram aplicados em um fluxo de 1mL/min, utilizando o sistema AKTA (GE). Para equilíbrio do sistema antes da aplicação da amostra foi realizada uma passagem de 15 min do tampão A (AMBIC 0,05M) em um fluxo constante de 1mL/min, em seguida passou-se o tampão B (AMBIC 0,5M) em fluxo de 1mL/min e por fim mais 15 minutos no tampão A no mesmo fluxo. A fase eluente utilizada foi um gradiente de concentração de 0 a 100% de AMBIC 0,5M, com a cromatografia realizada em um fluxo constante de 2mL/min, sendo coletadas frações de 1mL e absorvância monitorada a 280nm. Cada fração obtida foi submetida a uma leitura de dosagem de proteínas totais no Nanovue Plus™ Spectrophotometer (GE), onde 2µl de AMBIC 0,05M foi utilizado como branco, o mesmo volume de amostra foi utilizado para leitura, e a um gel SDS-PAGE para separação das proteínas segundo o seu peso molecular. Ao final deste processo as amostras foram separadas em quatro pools referentes a cada pico. A eletroforese em condições desnaturantes (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli, 1970 para verificar a homogeneidade das amostras contendo a PLA₂ MjTX-II.

4.4 Cultura de células

Os efeitos antimetastáticos e antiangiogênicos induzidos pela MjTX-II foram avaliados em diferentes linhagens celulares, sendo o câncer de pulmão humano de células não pequenas (NSCLC- do inglês non-small cell lung cancer) (A549) e as células de pulmão não tumorigênicas (BEAS-2B) utilizadas para avaliar a atividade antitumoral/antimetastática, e as células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVECs) requeridas para verificar os efeitos antiangiogênicos. Todas as linhagens foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂, em meio de cultura celular RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 2mM de piruvato de sódio, 1mM de aminoácidos não essenciais, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina.

4.5 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT em diferentes linhagens celulares

Para avaliar a citotoxicidade, o ensaio de MTT foi realizado de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017, onde as células A549, BEAS-2B e HUVEC, foram semeadas a 3x10⁴ células por poço em microplacas de 96 poços. Após 24h, adicionou-se meio de cultura contendo o tratamento com a MjTX-II nas concentrações de 80µg/mL, 40µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL, 5µg/mL, 2,5µg/mL, 1,25µg/mL e 0,625 µg/mL, e no grupo controle foi adicionado meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24h. Em seguida ao tratamento, a solução de MTT (MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo) (5mg/mL, 10µL/poço) foi aplicada e após 3h em incubadora, 100µL/poço de PBS contendo 10% de SDS

e 0,01M de HCl foi adicionado, mantendo a cultura a 37°C e 5% de CO₂ por 18h. A leitura da absorvância foi feita através do espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços a 570nm. Os resultados foram analisados em porcentagem de viabilidade, onde o controle positivo de viabilidade foi considerado 100%.

4.6 Ensaio de proliferação celular ou formação de colônias

O ensaio de formação de colônias foi realizado conforme descrito por Franken e colaboradores, 2006 com modificações. Células das linhagens A549, BEAS-2B e HUVEC (3×10^4 células/poço) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24h a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida ocorreu o tratamento com a MjTX-II nas concentrações de (40µg/mL, 20µg/mL e 10µg/mL) ou meio de cultura (grupo controle) por 24h. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e transferidas (100 células/poço) para placas de 6 poços, sendo mantidas em meio de cultura por duas semanas a 37°C em 5% de CO₂, momento em que ocorreu a remoção do meio, lavagem das células com PBS, fixação das mesmas com metanol gelado por 10 min, seguida da coloração com Panotic Kit (Laborclin, Brasil). As colônias formadas por mais de 50 células foram quantificadas e fotografadas.

4.7 Ensaio de mensuração de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)

Para avaliar o efeito da MjTX-II sobre a formação de espécies reativas de oxigênio intracelular, foi realizado o ensaio ROS dependente de peróxido de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) (Invitrogen | catálogo número: D399) para formar o composto fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), de acordo com Teixeira e colaboradores, 2020 com modificações. Resumidamente, células HUVEC foram plaqueadas a 1×10^5 células/poço, tratadas com 40µg/mL, 20µg/mL e 10µg/mL da MjTX-II ou meio (grupo controle) após 24h, e em seguida ao tratamento, as células foram marcadas com sonda ROS e Iodeto de Propídeo. O resultado foi mensurado através da intensidade da fluorescência DCF detectada imediatamente usando um citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter, Estados Unidos) e o software FlowJo (versão 7.6.3). Os dados foram apresentados como mediana da intensidade de fluorescência (MFI), e porcentagem de células positivas para determinado marcador.

4.8 Ensaio de ciclo celular

O ensaio de ciclo celular foi realizado de acordo com Polloni e colaboradores, 2021. Resumidamente, 2×10^5 células/poço da linhagem HUVEC foram plaqueadas em microplacas de 24 poços e após 24h, foram incubadas com a MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) ou meio de cultura (grupo controle) por mais 24h a 37°C com 5% CO₂. Em seguida, as células

foram lavadas com PBS, colhidas e fixadas em etanol 70% gelado overnight a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com RNase A (100µg/mL) (Sigma, Brasil) e iodeto de propídio (PI) (10µg/mL) (Sigma, Brasil) por 45 min a 37°C. A determinação do conteúdo de DNA foi realizada pelo citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter, Estados Unidos) e o software FlowJo (versão 7.6.3). Os dados obtidos foram analisados usando Software FlowJo (versão 7.6.3).

4.9 Ensaio de inibição da adesão celular

A fim de avaliar a inibição da adesão induzida pela MjTX-II, foi realizado o ensaio de inibição da adesão celular de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017. De maneira geral, células A549, BEAS-2B e HUVEC foram pré incubadas com MjTX-II (40µg/mL, 20µg/mL e 10µg/mL) ou meio (grupo controle) por 30min a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, as células (3×10^4) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 2h a 37°C em estufade CO₂. As células que não aderiram foram removidas com PBS 1x, e as células aderidas foram mensuradas pelo método de MTT, como descrito no item como descrito no item 4.6.

4.10 Ensaio de migração celular por Wound Healing

A inibição da migração celular horizontal foi avaliada pelo método de cicatrização de feridas de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017. Resumidamente, as células A549, BEAS-2B e HUVEC foram plaqueadas a 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços e após 24h, uma a ferida na monocamada (com ponteira de 10µL) foi realizada para criar uma área sem células, as quais mantiveram-se em incubadora por 2h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e tratadas com a MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) ou meio de cultura (grupo controle) por 24h. O resultado foi visualizado em microscópio óptico invertido (aumento de 10x) e fotografado (tempos de 0h e 24h) para quantificação em porcentagem (considerando o fechamento da ferida do grupo controle como 100%).

4.11 Ensaio de migração e invasão celular por Transwell

Para avaliar a inibição da migração e invasão celular, foi utilizada a câmara Transwell com membrana de 8µm de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017. As células A549, BEAS-2B e HUVEC foram pré-incubadas com a MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) por 30 min a 37°C e 5% CO₂ em meio de cultura sem SFB. Após a incubação, 7×10^4 célula/poço foram semeadas na parte superior da câmara dos insertos e no compartimento inferior foi adicionado meio com 10% de SFB como quimioatrativo para as células. Nos grupos controle negativo, a camada inferior foi preenchida com meio de cultura sem soro fetal bovino. No ensaio de invasão celular, utilizando as células A549 e BEAS-2B, os insertos de cultura celular foram

previamente revestidos com Matrigel (Corning® Matrigel® Matrix, USA) diluído na razão 1:10 (Matrigel:PBS) com meio sem SFB (overnight), antes das células serem semeadas. As células mantiveram-se a 37°C com 5% de CO₂ por 24h. Em seguida à incubação, as células não migrantes ou invasoras foram removidas da câmara com auxílio de um cotonete. As migradas ou invadidas foram coradas com Panotic Kit (Laborclin, Brasil), fotografadas e quantificadas considerando o número de células migradas ou invadidas do grupo controle como 100%.

4.12 Ensaio de quantificação do citoesqueleto de F-actina

A quantificação dos níveis de F-actina foi realizada de acordo com Teixeira e colaboradores, 2017. Células das linhagens A549 e BEAS-2B foram plaqueadas a 2×10^4 células/poço em lamínulas circulares 13 mm em microplacas de 24 poços e tratadas com a MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) por 24h. Em seguida, as células foram fixadas em formaldeído (4%) seguidas de três lavagens com PBS. Para coloração foi utilizado o isotiocianato de tetrametilrodamina B (TRITC) conjugado à faloidina diluída 1: 500 em PBS + saponina (0,01%). Posteriormente, os resultados de intensidade de fluorescência foram analisados (considerando a intensidade de fluorescência do controle como 100%) e as imagens digitais foram analisadas usando microscopia de fluorescência confocal, software de microscopia de fluorescência (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha) e as áreas de uma única célula foram medidas manualmente definindo um alto limite no software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

4.13 Ensaio de angiogênese *in vitro*

Para avaliar a angiogênese *in vitro* foi realizado o ensaio de verificação da formação de vasos em Matrigel segundo Gimenes e colaboradores, 2017. Resumidamente, 5×10^5 células/poços da linhagem HUVEC foi pré-incubada com 40µg/mL, 20µg/mL e 10µg/mL da MjTX-II ou meio (grupo controle) suplementado com bFGF(10ng/mL) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços revestidas com 50µl de Matrigel (Corning Matrigel Matrix, EUA), sendo mantidas a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO₂. Após 18h, os resultados foram fotografados em microscópio óptico invertido com e feita a quantificação dos vasos. O sobrenadante foi coletado para dosagem de VEGF em ensaio seguinte.

4.14 Dosagem de VEGF no sobrenadante de células HUVEC

Para quantificar os níveis de VEGF foi utilizado o sobrenadante das células HUVEC obtidos após o ensaio da formação de vasos *in vitro*, utilizando a MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL

e 40µg/mL). A dosagem foi realizada utilizando um Kit CBA para proteínas celulares (BD – EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, uma curva padrão foi construída com diferentes concentrações de VEGF conhecidas (2500, 1250, 625, 312,5, 156, 80, 40, 20 e 10 pg/mL), posteriormente adicionou-se 25µL do Mix de Beads (Diluent Beads e Capture Beads). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1h em temperatura ambiente e em seguida adicionados 25µL do Mix PE Detection Reagent, sendo então incubado por mais 2h em temperatura ambiente. Após esta incubação as amostras foram lavadas com 500µL de Wash Buffer e centrifugadas a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi então retirado e o pellet formado ressuspenso em 300µL de Wash Buffer. As amostras foram submetidas ao citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter, Estados Unidos), e os dados gerados foram analisados pelo software FlowJo (versão 7.6.3). A partir dos dados gerados pela curva de concentrações conhecidas do VEGF, foi calculada uma curva padrão, a qual permitiu a determinação da concentração de VEGF, expressa em pg/mL, presente no sobrenadante oriundo das diferentes concentrações experimentais.

4.15 Ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

Células da linhagem HUVEC foram plaqueadas a $3,5 \times 10^5$ células/poço em microplacas de 24 poços, tratadas com a MjTX-II (40µg/mL), meio de cultura com VEGF (controle positivo) ou meio de cultura sem VEGF (controle negativo) por 24h, sendo mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Após o tratamento, o RNA total das culturas foi extraído por meio do kit RNeasy Microarray (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do processo de extração, o RNA foi tratado com RNase-Free DNase (Qiagen, EUA) para digestão de possíveis fragmentos contaminantes de ácido desoxirribonucleico (DNA). A concentração (ng/µL) e pureza (A260:A230 e A260:A280) do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA). O cDNA foi sintetizado com 2µg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystem, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de expressão dos genes VEGFA, Angiopietina 1 e SFlt-1 foram quantificados por PCR em tempo real utilizando o sistema Power Up™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) a partir das amostras de cDNA na concentração de 100ng/µL. Os dados foram normalizados utilizando GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) como controle endógeno da reação e todos os procedimentos foram realizados em triplicata e sistema StepOne Plus (Applied Biosystem, EUA) foi utilizado para termociclagem, conforme descrito: um ciclo de 50°C por 2 min, um ciclo de 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 40 ciclos de 60°C por 1 min e a curva de melting (15 a 95°C, 1 min a 60°C, 15 s a 95°C). As sequências específicas dos primers para os genes na análise do PCR em tempo real foram obtidas na literatura e os

anelamentos testados pela ferramenta BLAST do NCBI (Tabela 1). A partir da obtenção dos resultados de Ct (cycle threshold) fornecidos pelo termociclador, calculou-se a expressão relativa (fold- change) por meio do método comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em função do grupo tratado apenas com o meio de cultura (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na qPCR.

Gene	Sequência 5' - 3'	Referência
VEGFA	Forward: AGGGCAGAATCATCACGAAGT	(SUN; LI; LI, 2016)
	Reverse: AGGGTCTCGATTGGATGGCA	
ANGIOPOIETINA-1	Forward: GGCAGTACAATGACAGTTTC	(SUN; LI; LI, 2016)
	Reverse: CTTTGTGCTTTCATAATCGC	
SFLT-1	Forward: AGGGGAAGAAATCCTCCAGA	(HUI et al., 2019)
	Reverse: CAACAAACACAGAGAAGG	
GAPDH	Forward: CGAGATCCCTCCAAAATCAA	(MARKÓ et al., 2016)
	Reverse: ATCCACAGTCTTCTGGGTGG	

4.16 Ensaio de angiogênese *ex vivo*

A angiogênese *ex vivo* foi avaliada pelo método do anel aórtico, conforme Baker e colaboradores, 2011 com modificações. Fragmentos de aorta (1mm-1,5mm) foram retirados de camundongos BALB/c machos com quatro meses de idade. Os fragmentos removidos foram lavados em PBS gelado contendo 1% de penicilina-estroptomicina e colocados em placa de 96 poços revestida com 50µL de Matrigel (Corning® Matrigel® Matrix, USA) em duas camadas. As placas foram incubadas em meio RPMI suplementado com bFGF (10ng/mL) por 24h. Posteriormente, ocorreu o tratamento com a MjTX-II a 40µg/mL durante 10 dias em intervalos de 48h. Ao final do processo, os anéis de aorta foram fotografados em microscópio óptico invertido e a presença de vasos contabilizada.

4.17 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados em triplicata e todos os dados verificados primeiramente para distribuição normal, utilizando os testes de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Sminov. Para os dados paramétricos, as diferenças estatísticas foram determinadas pelos testes T de Student ou ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey. Para os dados não paramétricos, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, utilizando o Software GraphPad Prism version 6.01. Todos os dados foram apresentados como média \pm S.E.M e em triplicatas independentes. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

- ACUFF, H. B., CARTER, K. J., FINGLETON, B., GORDEN, D. L., MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. **Cancer Research**, 2006, v. 66, n. 1, p. 259-266.
- AKBULUT, H., ALTUNTAS, F., AKBULUT, K. G. , OZTURK, G., CINDORUK, M., UNAL, E., ICLI, F. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. **Cytokine**, 2002, v. 20, n. 4, p. 184-90.
- ALOULO, A., ALI, Y.B., BEZZINE, S., GARGOURI, Y., GELB, M. H. Phospholipases: an overview. **Methods in molecular biology**, 2012, v. 861, p. 63–85.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., SOARES, A. M., FONTES, M. R., FULY, A. L., CORRÊA, F. M., ROSA, J. C., GREENE, L. J., GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, 2002, v. 64, n. 4, p. 723-732.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M., ÂNGULO, Y., DÍAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 2000, v. 82, n. 8, p.755- 763.
- ARNI, R. K., WARD, R. J. Phospholipase A2 – A structural review. **Toxicon**, 1996, v. 34, p. 827-841.
- ASSOUN, S., BROSSEAU, S., STEINMETZ, C., GOUNANT, V., ZALCMAN, G. Bevacizumab in advanced lung cancer: state of the art. **Future oncology**, 2017, v. 13, n. 28, p. 2515-2535.
- AZEVEDO, F.V.P.V., LOPES, D.S., GIMENES, S.N.C., ACHÊ, D.C., VECCHI, L., ALVES, P.T., GUIMARÃES, D.O., RODRIGUES, R.S., GOULART, L.R., RODRIGUES, V.M., YONEYAMA, K.A.G. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016, v. 82, p. 671–677.
- Azevedo, F. V. P. V.; Zóia, M. A. P.; Lopes, D. S.; Gimenes, S. N.; Vecchi, L.; Alves, P. T.; Rodrigues, R. S.; Silva, A. C. A.; Yoneyama, K. A. G.; Goulart, L. G.; de Melo Rodrigues, V. Antitumor and antimetastatic effects of PLA2-BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom on human breast cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019, v. 135, p. 261–273.
- BAKER, M., ROBINSON, S. D., LECHERTIER, T., BARBER, P. R., TAVORA, B., D'AMICO, G., JONES, D. T., VOJNOVIC, B., HODIVALA-DILKE, K. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. **Nature Protocols**, 2011, v. 7, n. 1, p. 89-104.
- BALSINDE, J., BALBOA, M. A., INSEL, P. A., DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Pharmacology and Toxicology**, 1999, v. 39, p. 175-189.

BIELLENBERG, D. R., ZETTER, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. **Journal of Cancer**, 2015, v. 21, n. 4, p. 267-73.

BENATI, R. B., COSTA, T. R., CACEMIRO, M. C., SAMPAIO, S. V., CASTRO, F. A., BURIN, S. M. 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, v. 24, n. 40.

BRAUD, S., BON, C., WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, 2000, v. 82(9-10), p. 851-859.

BURKE, J. E., DENNIS, E. A. Phospholipase A2 Biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, 2009a, v. 23, n. 1, p. 49-59.

BURKE, J. E., DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, 2009b, v. 50, p. 237-242.

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R.L., TORRE, L.A., JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BYERS, L. A., RUDIN, C. M., Small Cell Lung Cancer: Where Do We Go From Here?. **Cancer**, 2015, v. 121, n. 5, p. 664-672.

CASAI-SILVA, L. L., TEIXEIRA, C. F., LEBRUN, I., LOMONTE, B., ALAPE-GIRÓN, A., GUTIÉRREZ, J. M. Lemnitoxin, the major component of Micrurus lemniscatus coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. **Toxicology Letters**, 2016, v. 257, p. 60-71.

Cecilio AB, Caldas S, Oliveira RA, Santos AS, Richardson M, Naumann GB, Schneider FS, Alvarenga VG, Estevão-Costa MI, Fuly AL, Eble JA, Sanchez EF. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A₂ from snake venom and their antiviral activities against Dengue virus. **Toxins (Basel)**, 2013, v. 5, n. 10, p.1780-98.

CHEN, H. S., PORTIER, K., GHOSH, K., NAISHADHAM, D., KIM, H. J., ZHU, L., PICKLE, L. W., KRAPCHO, M., SCOPPA, S., JEMAL, A., FEUER, E. J. Predicting US- and state-level cancer counts for the current calendar year: Part I: evaluation of temporal projection methods for mortality. **Cancer**, 2012, v. 118, n. 4, p. 1091-1099.

CHERNYSHENKO, V., PETRUK, N., KOROLOVA, D., KASATKINA, L., GORNYTSKA, O., PLATONOVA, T., CHERNYSHENKO, T., REBRIEV, A., DZHUS, O., GARMANCHUK, L., & LUGOVSKOY, E. Antiplatelet and anti-proliferative action of disintegrin from Echis multisquamatis snake venom. **Croatian medical journal**, 2017, v. 58, n. 2, p. 118-127.

CHESTNUTT, M. S., PRENDERGAST, T. J. LUNG. IN: TIERNEY LM JR, MCPHEE SJ, PAPADAKIS MA. **Current medical diagnosis & treatment**, 2002, p.269- 362.

DA SILVA, B. B., DA SILVA JUNIOR, R. G., BORGES, U. S., DA SILVEIRA FILHO, M. A., PIMENTEL, I. C., GEBRIM, L. H., et al. Quantification of angiogenesis induced in rabbit cornea by breast carcinoma of women treated with tamoxifen. **Journal of Surgical Oncology**, 2005, v. 90, n. 2, p. 77-80.

DA SILVA, B. B., DE CARVALHO GONÇALVES NUNES GALVÃO, E. R., DOS SANTOS, L. G. Evaluation of CD34 antigen expression following tamoxifen as primary treatment for breast cancer. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, 2006, v. 93, n. 1, p. 70-1.

DA SILVA, C. P., COSTA, T. R., PAIVA, R. M. A., CINTRA, A. C. O., MENALDO, D. L., ANTUNES, L.M.G., SAMPAIO, S. V. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from Bothrops jararacussu snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2015, v. 21, p. 21:44

DECAUSSIN, M., SARTELET, H., ROBERT, C., MORO, D., CLARAZ, C., BRAMBILLA, C., BRAMBILLA, E. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGFR1- Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. **Journal of Pathology**, 1999, v. 188, n. 4, p. 369-377.

DE LIMA LOPES, G. J. R., SEGEL, J. E., TAN, D. S., DO, Y. K., MOK, T., FINKELSTEIN, E. A. Cost-effectiveness of epidermal growth factor receptor mutation testing and first-line treatment with gefitinib for patients with advanced adenocarcinoma of the lung. **Cancer**, 2012, v. 118, n. 4, p. 1032-9.

DENNIS, E. A., CAO, J., HSU, Y. H., MAGRIOTI, V., KOKOTOS, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical reviews**, 2011, v. 111, n. 10, p. 6130–6185.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemistry**, 1994, v. 269, p. 13057-13060.

DUNCAN, R. E., SARKADI-NAGY, E., JAWORSKI, K., AHMADIAN, M., SUL, H. S. Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). **Journal of Biological Chemistry**, 2008, v. 283, n. 37, p. 25428-25436.

DVORAK, A. M., KOHN, S., MORGAN, E. S., FOX, P., NAGY, J. A., AND DVORAK, H. F. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. **Journal of Leukocyte Biology**, 1996, v. 59, p. 100–115.

DVORAK, H. F., NAGY, J. A., BERSE, B., BROWN, L. F., YEO, K. T., YEO, T. K., DVORAK, A. M., VANDEWATER, L., SIOUSSAT, T. M., AND SENGER, D. R. Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1992, v. 667, p. 110–111.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, I., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D., BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, 2015, v. 135, n. 5, p. E359–E386.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, 2004, v. 25, p. 581–611.

FERRARA, N., AND HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, 1989, v. 161, p. 851–858.

FILKIN, S.Y., LIPKIN, A.V., FEDOROV, A.N., Phospholipase superfamily: structure, functions, and biotechnological applications, **Biochemistry**. *Biokhimiia* 85 (Suppl. 1), 2020, S177–s195.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England journal of medicine**, 1971, v. 285, n. 21, p. 1182–1186.

FRANKEN, N.A., RODERMOND, H.M., STAP, J., HAVEMAN, J., VAN BREE, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315–2319.

GARCIA-DENEGRI, M. E.; ACOSTA, O. C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S. L.; TEIBLER, G. P.; LEIVA, L. C.; PONCE-SOTO, L. A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 BaSpII RP4 of the Bothrops alternates snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 64–74, 2010.

GEBRIM, L. C., MARCUSSI, S., MENALDO, D. L., MENEZES, C. S. R., NOMIZO, A., HAMAGUCHI, A., SILVEIRA-LACERDA, E. P., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., SAMPAIO, S. V., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, 2009, v. 37, p. 222–229.

GEGECHKORI, N., HAINES, L., LIN, J. J. Long Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. **Medical Clinics of North America**, 2017, v. 101, n. 6, p. 1053–1073.

GIMENES, S. N. C., LOPES, D. S., ALVES, P. T., AZEVEDO, S. V. P. V., VECCHI, L., GOULART, L. R., RODRIGUES, T. C. S., SANTOS, A. L. Q., BRITES, V. L. C., TEIXEIRA, T. L., SILVA, C. V., DIAS, M. H., TEIXEIRA, S. C., RODRIGUES, R. S., YONEYAMA, K. A. G., OLIVEIRA, R. A., RODRIGUES, V. M. Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Scientific Reports**, 2017, v. 7, n. 1, p. 7077.

GOSPODAROWICZ, D., ABRAHAM, J. A., AND SCHILLING, J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1989, v. 86, p. 7311–7315.

GRABNER, A. N., ALFONSO, J., KAYANO, A. M., MOREIRA-DILL, L. S., DOS SANTOS, A. P. A., CALDEIRA, C. A. S., SOBRINHO, J. C., GÓMEZ, A., GRABNER, F. P., CARDOSO, F. F., ZULIANI, J. P., FONTES, M. R. M., PIMENTA, D. C., GÓMEZ, C. V., TELES, C. B. G., SOARES, A. M., CALDERON, L. A. BmajPLA2-II, a basic Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasitocidal potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, v. 102, p. 571–581.

GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. **Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997, p.321–352.

GUTIERREZ, J. M., LOMONTE, B. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins, **Toxicon**, 2013, v. 62, p. 27–39.

DE OLIVEIRA GUIMARÃES, D., LOPES, D. S., AZEVEDO, F. V. P.V., GIMENES, S. N., SILVA, M. A., ACHÊ, D. C., GOMES, M. S. R., VECCHI, L., GOULART, L. R., YONEYAMA, K. A. G., RODRIGUES, R. S., DE MELO RODRIGUES, V. In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, v. 97, p. 770-777

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A., The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 2000, v.100,p. 57-70.

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

HSIN, I. L., OU, C. C., WU, T. C., JAN, M. S., WU, M. F., CHIU, L. Y., LUE, K. H., KO, J. L. GMI, an immunomodulatory protein from Ganoderma microsporum, induces autophagy in non-small cell lung cancer cells. **Autophagy**, 2011, v. 7, n. 8, p. 873-882.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <https://www.inca.gov.br/tabagismo>, acessado em 08/11/2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>, acessado em 08/11/2021.

IZIDORO, L. F., RIBEIRO, M. C., SOUZA, G. R., SANT'ANA, C. D., HAMAGUCHI, A., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GOULART, L. R., BELEBONI, R. O., NOMIZO, A., SAMPAIO, S. V., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pirajai snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2006, v. 14, n. 20, p. 7034-7043.

KINI, R. M., EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, 1989, v.27 (6), p.613-635.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, 2005, v.45 (8),p.1147-1161.

KLEIN, A., CAPITANIO, J. S., MARIA, D. A., RUIZ, I. R. Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. **Toxicon**, 2011, v. 57(1), p. 1-8.

LABELLE, M., HYNES, R. O. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. **Cancer discovery**, 2012, v. 2, n. 12, p. 1091–1099.

LAMOUILLE, S., XU, J., DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2014, v. 15, n. 3, p. 178-96.

LIU, J., HU, X. J., JIN, B., QU, X. J., HOU, K. Z., LIU, Y. P. β -Elemene induces apoptosis as well as protective autophagy in human non-small-cell lung cancer A549 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2012, v. 64, p. 146-153.

LOMONTE, B., ANGULO, Y., CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 2003, v. 42, n. 8, p. 885-901.

LOMONTE, B., RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, 2012, v. 60, n. 4, p. 520–530.

MARSON, L. P., KURIAN, K. M., MILLER, W. R., DIXON, J. M. The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2001, v. 66, n. 1, p. 9-15.

MEYER, M., CLAUSS, M., LEPPLE-WIENHUES, A., WALTENBERGER, J., AUGUSTIN, H. G., ZICHE, M., LANZ, C., BUTTNER, M., RZIHA, H. J., DEHIO, C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. **The EMBO Journal**, 1999 v. 18, p. 363–374.

MIGNATTI, P., RIFKIN, D. B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. **Physiological Reviews**, 1993 v. 73, n. 1, p. 161-95.

MOLLOY, T., VAN 'T VEER, L. Recent advances in metastasis research. **Current Opinion in Genetics**, 2008, v. 18, p. 35–41.

NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S., POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **The FASEB Journal**, 1999 v. 13, n.1, p. 9-22.

NIETHAMMER, A. G., XIANG, R., BECKER, J. C., WODRICH, H., PERTL, U., KARSTEN, G., ELICEIRI, B. P., REISFELD, R. A. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. **Nature Medicine**, 2002, v. 8, n. 12, p. 1369-1375.

NOLTE, S., DE CASTRO DAMASIO, D., BARRA, A. C., GOMES, J., MAGALHÃES, A., MELLO ZISCHLER, L. F. C., STUELP-CAMPELO, P. M., ELIFIO-ESPOSITO, S. L., ROQUE-BARREIRA, M. C., REIS, C. A., MORENO- AMARAL, A. N. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, 2012, v. 59, n. 1, p. 81- 85.

NÚÑEZ, C. E., ANGULO, Y., LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A(2) from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane- damaging activities. **Toxicon**, 2001, v. 39, n. 10, p. 1587-94.

OGAWA, S., OKU, A., SAWANO, A., YAMAGUCHI, S., YAZAKI, Y. AND SHIBUYA, M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. **Journal of Biological Chemistry**, 1998, v. 273, p. 31273–31282.

OLSSON, A. K., DIMBERG, A., KREUGER, J., CLAESSION-WELSH, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2006, v. 7, n. 5, p. 359-371.

PAN, X., ZHANG, X., SUN, H., ZHANG, J., YAN, M., ZHANG, H. Autophagy inhibition promotes 5-fluorouraci-induced apoptosis by stimulating ROS formation in human non-small cell lung cancer A549 cells. **PLoS One**, 2013, v. 8, n. 2, p. 56679.

PINHO, M. S. L., Angiogênese: O Gatilho Proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 2005, v. 25, n. 4, p. 396-402.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, 1993, v. 72, n. 3p. 962-970.

POLLONI, L., AZEVEDO, F. V. P. V., TEIXEIRA, S. C., MOURA, E., COSTA, T. R.,

GIMENES, S. N. C., CORREIA, L. I. V., FREITAS, V., YONEYAMA, K. A. G., RODRIGUES, R. S., LOPES, D. S., RODRIGUES, V. M.. Antiangiogenic effects of phospholipase A₂ Lys49 BnSP-7 from *Bothrops pauloensis* snake venom on endothelial cells: An in vitro and ex vivo approach. **Toxicol In Vitro**, 2021.

PRESTA, L. G., CHEN, H., O'CONNOR, S. J., CHISHOLM, V., MENG, Y. G., KRUMMEN, L., WINKLER, M., FERRARA, N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. **Cancer Research**, 1997, v. 57, n. 20, p. 4593-4599.

RECK, M., SHANKAR, G., LEE, A., COLEMAN, S., MCCLELAND, M., PAPADIMITRAKOPOULOU, V. A., SOCINSKI, M. A., SANDLER, A. Atezolizumab in combination with bevacizumab, paclitaxel and carboplatin for the first-line treatment of patients with metastatic non-squamous non-small cell lung cancer, including patients with EGFR mutations. **Expert Review of Respiratory Medicine**, 2020, v. 14, n. 2, p. 125-136.

RODRIGUEZ-CANALES, J., PARRA-CUENTAS, E., WISTUBA, I. I. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. **Cancer Research and Treatment**, 2016, v. 170, p.25-46.

RONDEAU, E., LARMONIER, N., PRADEU, T., BIKFALVI, A. Characterizing causality in cancer. **Elife**, 2019 v. 8 e53755.

ROSENBERG, P. Handbook of toxinology. W. T. Shyer e D. Mebs. New York: Dekker1990.

SCHALOSKE, R. H., DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006, v. 1761, p.1246- 1259.

SHIELDS, P. G. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. **Oncogene**, 2002, v. 21, n.45, p. 6870-6.

SILVA, C. P., COSTA, T. R., PAIVA, R. M. A., CINTRA, A. C. O., MENALDO, D. L., ANTUNES, L. M. G., SAMPAIO, S. V. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* Snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, 2015.

SILVA, M. A., LOPES, D. S., TEIXEIRA, S. C., GIMENES, S. N. C., AZEVEDO, F. V. V., POLLONI, L., BORGES, B. C., SILVA, M. S., BARBOSA, M.J., OLIVEIRA JÚNIOR, R. J., ELIAS, M. C., SILVA, C. V., YONEYAMA, K. A. G., RODRIGUES, V. M., RODRIGUES, R. S. Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys- 49 phospholipase A₂ (PLA₂) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, v. 118, p. 311-319.

SOARES, A. M., SESTITO, W. P., MARCUSSI, S., STÁBELI, R. G., ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., CUNHA, O. A., VIEIRA, C. A., GIGLIO, J. R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2004, v. 36, n. 2, p. 258-270.

SORLIE, T., WANG, Y., XIAO, C., JOHNSEN, H., NAUME, B., SAMAHA, R.R., BORRESEN-DALE, A.L., Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, 2006, v. 7, p. 127.

STÁBELI, R. G., AMUI, S. F., SANT'ANA, C. D., PIRES, M. G., NOMIZO, A., MONTEIRO, M. C., ROMÃO, P. R. T., GUERRA-SÁ, R., VIEIRA, C. A., GIGLIO, J. R.,

FONTES, M. R. M., SOARES, A. M. Bothrops moojeni myotoxin- II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2006, v. 142, p. 371-381.

STRAUME, O., AKSLEN, L. A. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression. **The American Journal of Pathology**, 2002; v. 160, p.1009-1019.

SUHAIL, Y., CAIN, M. P., VANAJA, K., KURYWCHAK, P. A., LEVCHENKO, A., KALLURI, R., KSHITIZ. SystemsBiology of Cancer Metastasis. **Cell Syst**, 2019 v. 9, n. 2, p. 109-127.

SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R.L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A., BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2021. v, 71, n. 3, p. 209-249.

TAKAHASHI, H., HATTORI, S., IWAMATSU, A., TAKIZAWA, H. AND SHIBUYA, M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. **JJournal of Biological Chemistry**, 2004, v. 279, p. 46304–46314.

TALMADGE, J. E., FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Research**, 2010, v. 70, n. 14, p.5649-69.

TEIXEIRA, S. C., BORGES, B. C., OLIVEIRA, V. Q., CARREGOSA, L. S., BASTOS, L. A., SANTOS, I. A., JARDIM, A. C. G., MELO, F. F., FREITAS, L. M., RODRIGUES, V. M., LOPES, D. S. Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, v. 164, p. 616-625.

TEIXEIRA, S. C., DA SILVA, M. S., GOMES, A. A. S., MORETTI, N. S., LOPES, D. S., FERRO, E. A. V., RODRIGUES, V. M. Panacea within a Pandora's box: the antiparasitic effects of phospholipases A₂ (PLA₂s) from snake venoms. **Trends in Parasitology**, 2021, S1471-4922(21)00169-0.

TEIXEIRA, S. C., LOPES, D. S., GIMENES, S. N., TEIXEIRA, T. L., DA SILVA, M. S., BRÍGIDO, R. T., DA LUZ, F. A., DA SILVA, A. A., SILVA, M.A., FLORENTINO, P. V., TAVARES, P. C., DOS SANTOS, M. A., ÁVILA, V. M., SILVA, M. J., ELIAS, M. C., MORTARA, R. A., DA SILVA, C. V. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of Trypanosoma cruzi Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Scientific Reports**, 2017, v. 7, p. 44978.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, 2002, v. 2, n. 6, p. 442-454.

TRAVIS, W. D., BAMBRILLA, E., BURKE, A. P., MARX, A., NICHOLSON, A. G. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart, 4th edn. **IARC WHO Classification of Tumours 2015: World Health Organization**, 2015.

VALASTYAN, S., WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, 2011; v. 147, n. 2, p. 275–292.

VALENTIN, E., LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? **Biochimie**, 2000, v. 82(9-10), p. 815-831.

VYAS, V. K., BRAHMBHATT, K., BHATT, H., PARMAR, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2013, v. 3, n. 2, p.156-162.

WAN, X., LUO, X., TAN, C., ZENG, X., ZHANG, Y., PENG, L. First-line atezolizumab in addition to bevacizumab plus chemotherapy for metastatic, nonsquamous non-small cell lung cancer: A United States-based cost- effectiveness analysis. **Cancer**, 2019, v. 125, n. 20. p. 3526-3534.

WHITEMAN, D. C., WILSON, L. F. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. **Cancer Epidemiology**, 2016, v. 44, p. 203- 221.

WISE, L. M., VEIKKOLA, T., MERCER, A. A., SAVORY, L. J., FLEMING, S. B., CAESAR, C., VITALI, A., MAKINEN, T., ALITALO, K. AND STACKER, S. A. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1999, v. 96, p. 3071–3076.

WOLPAW, D. R. Early detection in lung cancer. Case finding and screening. **Medical Clinics of North America**, 1996, v. 80, n. 1, p. 63-82.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, acessado em 08/11/2021.

YAMAZAKI, Y., MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. **Molecular Diversity**, 2006, v. 10, p. 515–527.

YAMAZAKI, Y., TAKANI, K., ATODA, H. AND MORITA, T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **Journal of Biological Chemistry**, 2003, v. 278, p. 51985–51988.

YEN, L., YOU, X. L., AL MOUSTAFA, A. E., BATIST, G., HYNES, N. E., MADER, S., MELOCHE, S., ALAOUJ-JAMALI, M. A. Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. **Oncogene**, 2000, v. 19, n. 31, p. 3460-3469.

ZAINAL ABIDIN, S. A., RAJADURAI, P., HOQUE CHOWDHURY, M. E., OTHMAN, I., NAIDU, R. Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptosis Activity of l-Amino Acid Oxidase from Malaysian *Cryptelytrops purpureomaculatus* (CP-LAAO) Venom on Human Colon Cancer Cells. **Molecules**, 2018, v. 23, n. 6, p. 1388.

CAPÍTULO 1

**Efeito antimetastático em células de câncer de pulmão e antiangiogênico da Fosfolipase
A₂ MjTX-II, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni***

Luísa Carregosa Santos^a, Samuel Cota Teixeira^b, Vinícius Queiroz Oliveira^a, Thiago Macêdo Lopes Correia^c, Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade^a, Lorena Polloni^d, Cristiani Baldo da Rocha^e, Lucas Miranda Marques^f, Patricia Bianca Clissa^g Veridiana de Melo Rodrigues Ávila^h
Daiana Silva Lopes^f

^aInstituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^b Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil; ^c Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^dInstituto de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil; ^eDepartamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil; ^f Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^gLaboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil; ^hInstituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Universidade federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil.

*Autor correspondente: Prof.^a Dr^a. Daiana Silva Lopes. Instituto Multidisciplinar em Saúde. Rua Hormindo Barros, 58, Candeias, CEP 45029-094, Vitória da Conquista, Brasil. E-mail: lsdaiana@yahoo.com.br

Resumo:

O câncer de pulmão é o terceiro tipo mais comum de câncer no Brasil e está associado às altas taxas de incidência e de mortalidade, em consequência da agressividade sustentada pelos processos de angiogênese e metástase. Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado que as PLA₂ isoladas da peçonha de serpentes vêm sendo investigadas com o objetivo de desenvolver futuros fármacos para terapia contra o câncer. Neste trabalho objetivamos investigar pela primeira vez o efeito antimetastático e antiangiogênico da MjTX-II, uma PLA₂ isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* sobre células de câncer de pulmão e células

endoteliais. A partir de ensaios de cultura celular *in vitro* e técnicas *ex vivo*, demonstramos que a PLA₂ atua sobre as células tumorais de câncer de pulmão A549, reduzindo sua viabilidade e inibindo processos fundamentais para seu crescimento e metástase, como adesão, migração, invasão e diminuição do citoesqueleto de actina sem interferir significadamente nas células de pulmão não tumorigênicas (BEAS-2B). Além disso, causou alterações no ciclo celular, levou à produção de espécies reativas de oxigênio, bem como modulou a expressão de genes pró e antiangiogênicos e diminuiu a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células endoteliais HUVECs. Por fim, a toxina também inibiu os processos de angiogênese *ex vivo* em modelo de anel de aorta. Concluimos, portanto, que a MjTX-II apresenta um efeito antiproliferativo e antiangiogênico *in vitro* e *ex vivo*, representando uma ferramenta biotecnológica para o estudo de neoplasias e uma molécula promissora como modelo farmacológico para terapia antitumoral.

Palavras-chave: PLA₂, peçonha de serpente, câncer de pulmão.

1. Introdução

O câncer de pulmão é mundialmente a doença maligna mais comum e também uma das principais causas de mortalidade por câncer causando cerca de 1,8 milhões de mortes no ano de 2020 [2]. Esse tipo de câncer possui alta mortalidade em consequência da agressividade sustentada pelos processos de angiogênese e metástase [3] decorrentes dos processos característicos de divisão descontrolada das células, as quais escapam dos sinais de inibição do crescimento, evadem dos mecanismos de apoptose e do sistema imune, e invadem tecidos, promovendo a angiogênese [4-6].

A inibição da angiogênese é, portanto, uma estratégia terapêutica para o tratamento do câncer. [7]. Durante a última década houve um progresso no que se refere ao tratamento da doença e novas terapias moleculares vêm sendo utilizadas. O Bevacizumab, por exemplo, fármaco utilizado na quimioterapia do câncer de pulmão, é um anticorpo monoclonal, que bloqueia a ação do VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ou seja, impede o crescimento de vasos sanguíneos que alimentam tumores malignos [8-10].

Estudos já demonstraram que diversos produtos de origem natural têm potencial para serem utilizados como ferramentas terapêuticas alternativas para o tratamento do câncer, como por exemplo, as fosfolipases A₂ isoladas das peçonhas de serpentes (PLA₂). Silva e colaboradores 2015 [11] demonstraram o efeito citotóxico, moduladores do ciclo celular e indutores da apoptose da BthTX-I, PLA₂ da peçonha de *Bothrops jararacussu* sobre células de leucemia humana, carcinoma hepatocelular humano, melanoma e feocrocitoma murinos. Azevedo e colaboradores 2016 [12] analisaram os efeitos da BnSP-6, uma PLA₂ Lys-49

homologa de *Bothrops pauloensis*, constatando seu efeito indutor de morte em células de câncer de mama. Além disso, Benati e colaboradores 2018 [13] ressaltam os efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos da MjTX-I, PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* em células de leucemia.

O efeito antitumoral de PLA₂ isolada de serpentes sobre diferentes tipos de câncer vem sendo amplamente explorado, principalmente em células de câncer de mama e leucemia [13-15], contudo, o efeito antimetástático e antiangiogênico dessa classe de toxinas sobre câncer de pulmão ainda precisa ser melhor investigado, uma vez que, não existem trabalhos que explorem esses efeitos nesse tipo celular.

Nesse contexto, o presente estudo abordará diferentes técnicas de cultura celular em modelos *in vitro* e *ex vivo* para avaliar, pela primeira vez, as ações antimetastáticas e antiangiogênicas da fosfolipase A₂ MjTX-II Lys-49, isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, em células de câncer de pulmão, em células endoteliais e em anéis aórticos de camundongo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira (Protocolo 083/2020) e estão em acordo com os princípios éticos de experimentação animal aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados oito camundongos machos da linhagem Balb-c (20-30 g) mantidos em condições padrões de temperatura 25°C, umidade relativa do ar de 60-65%, ciclode 12 horas de luz/noite, dieta e água ad libitum.

2.2 PLA₂ MjTX-II

As peçonhas de serpentes *Bothrops moojeni* foram obtidas de espécimes mantidas no Instituto Butantan, possuindo o cadastro de acesso ao Patrimônio Genético nº A2C2534. A MjTX-II foi purificada a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*, segundo o método descrito por Soares e colaboradores, 2004 [16] com modificações.

2.3 Cultura de células

Os efeitos antimetastáticos e antiangiogênicos induzidos pela MjTX-II foram avaliados em diferentes linhagens celulares, sendo o câncer de pulmão humano de células não pequenas (NSCLC) (A549) e as células de pulmão não tumorigênicas (BEAS-2B) utilizadas para avaliar a atividade antitumoral/antimetastática e as células endoteliais do cordão umbilical humano

(HUVEC) requeridas para verificar os efeitos antiangiogênicos. Todas as linhagens foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e mantidas a 37°C numa incubadora umidificada contendo 5% de CO₂, em meio de cultura celular RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 2mM de piruvato de sódio, 1mM de aminoácidos não essenciais, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina.

2.4 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT em diferentes linhagens celulares

Para avaliar a citotoxicidade, o ensaio de MTT foi realizado de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017 [17].

2.5 Ensaio de proliferação celular ou formação de colônias

O ensaio de formação de colônias foi realizado conforme descrito por Franken e colaboradores, 2006 [18]. com modificações.

2.6 Ensaio de mensuração de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)

Para avaliar o efeito da MjTX-II sobre a formação de espécies reativas de oxigênio intracelular, foi realizado o ensaio ROS dependente de peróxido de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) (Invitrogen | catálogo número: D399) para formar o composto fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), de acordo com Teixeira e colaboradores, 2020 [19] com modificações.

2.7 Ensaio de ciclo celular

O ensaio de ciclo celular foi realizado de acordo com Polloni e colaboradores, 2021 [20].

2.8 Ensaio de inibição da adesão celular

A fim de avaliar a inibição da adesão celular induzida pela MjTX-II foi realizado o ensaio de inibição da adesão celular de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017 [17].

2.9 Ensaio de migração celular por Wound Healing

A inibição da migração celular foi avaliada pelo método de cicatrização de feridas de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017 [17].

2.10 Ensaio de migração e invasão celular por Transwell

Para avaliar a inibição da migração e invasão celular foi utilizada a câmara Transwell com membrana de 8µm de acordo com Gimenes e colaboradores, 2017 [17].

2.11 Ensaio de quantificação dos níveis de F-actina

A quantificação dos níveis de F-actina foi realizada de acordo com Teixeira e colaboradores, 2017 [21]. com modificações.

2.12 Ensaio de angiogênese *in vitro*

Para avaliar a angiogênese *in vitro* foi realizado o ensaio de verificação da formação de vasos em Matrigel, segundo Gimenes e colaboradores, 2017 [17].

2.13 Dosagem de VEGF no sobrenadante de células HUVEC

Para quantificar os níveis de VEGF foi utilizado o sobrenadante das células HUVEC obtidos após o ensaio da formação de vasos *in vitro*. A dosagem foi realizada utilizando um Kit CBA para proteínas celulares (BD – EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, uma curva padrão foi construída com diferentes concentrações de VEGF conhecidas (2500, 1250, 625, 312,5, 156, 80, 40, 20 e 10pg), posteriormente adicionou-se 25µl do Mix de Beads (Diluent Beads e Capture Beads). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1h em temperatura ambiente e em seguida adicionados 25µL do Mix PE Detection Reagent, sendo então incubado por mais 2h em temperatura ambiente. Após esta incubação as amostras foram lavadas com 500µL de Wash Buffer e centrifugadas a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi então retirado e o pellet de células ressuspendido em 300µL de Wash Buffer. As amostras foram submetidas ao citômetro de fluxo e analisadas com o auxílio do software Flowjo BD Accuri C6 (BD Accuri C6 – Biosciences, CA, USA).

2.14 Ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

Células da linhagem HUVEC foram plaqueadas a 5×10^6 células/poço em microplacas de 24 poços, tratadas com a MjTX-II (40µg/mL), meio de cultura com bFGF (controle positivo) ou meio de cultura sem bFGF (controle negativo) por 24h, sendo mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Após o tratamento, O RNA total das culturas foi extraído por meio do kit RNeasy Microarray (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do processo de extração, o RNA foi tratado com RNase-Free DNase (Qiagen, EUA) para digestão de possíveis fragmentos contaminantes de ácido desoxirribonucleico (DNA). A concentração (ng/µL) e pureza (A260:A230 e A260:A280) do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA). O cDNA foi sintetizado com 2µg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystem, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de

expressão dos genes VEGFA, Angiopoietina1 e SFlt-1 foram quantificados por PCR em tempo real utilizando o sistema PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) a partir das amostras de cDNA na concentração de 100ng/μL. Os dados foram normalizados utilizando GAPDH como controle endógeno da reação e todos os procedimentos foram realizados em triplicata e sistema StepOne Plus (Applied Biosystem, EUA) foi utilizado para termociclagem, conforme descrito: um ciclo de 50°C por 2min, um ciclo de 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 40 ciclos de 60 °C por 1min e a curva de melting (15 a 95 °C, 1min a 60 °C, 15s a 95 °C). As sequências específicas dos primers para os genes na análise do PCR em tempo real foram obtidas na literatura e os anelamentos testados pela ferramenta BLAST do NCBI (Tabela 1). A partir da obtenção dos resultados de Ct (cycle threshold) fornecidos pelo termociclador, calculou-se a expressão relativa (fold-change) por meio do método comparativo (2-ΔΔCt) em função do grupo tratado apenas com o meio de cultura (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1: Sequência dos primers humanos utilizados na qPCR.

Gene	Sequência 5' - 3'	Referência
VEGFA	Forward: AGGGCAGAATCATCACGAAGT	(SUN; LI; LI, 2016)
	Reverse: AGGGTCTCGATTGGATGGCA	
ANGIOPOIETINA-1	Forward: GGCAGTACAATGACAGTTTC	(SUN; LI; LI, 2016)
	Reverse: CTTTGTTGCTTTCATAATCGC	
SFLT-1	Forward: AGGGGAAGAAATCCTCCAGA	(HUI et al., 2019)
	Reverse: CAACAAACACAGAGAAGG	
GAPDH	Forward: CGAGATCCCTCCAAAATCAA	(MARKÓ et al., 2016)
	Reverse: ATCCACAGTCTTCTGGGTGG	

2.15 Ensaio de angiogênese *ex vivo*

A angiogênese *ex vivo* foi avaliada pelo método do anel aórtico, conforme Baker e colaboradores, 2011 [22] com modificações.

2.16 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados em triplicata e todos os dados verificados primeiramente para distribuição normal, utilizando os testes de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Sminov. Para os dados paramétricos, as diferenças estatísticas foram determinadas pelos testes T de Student ou ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey. Para os dados não paramétricos, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, utilizando o Software GraphPad Prism version 6.01. Todos os dados foram apresentados como média ± S.E.M e em triplicatas independentes. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Purificação da PLA₂ MjTX-II

A peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi inicialmente fracionada em coluna Mono Q contendo resina de troca iônica. Como demonstrado na Figura 1A, foram obtidas 13 frações. Para a obtenção da MjTX-II, a fração 1 foi selecionada e recromatografada em coluna de troca iônica CM FF (Figura 1B). A análise por SDS-PAGE 12% (Figura 1C) da fração 3 revelou a presença de uma única banda correspondente a toxina MjTX-II, cuja massa molecular é de aproximadamente 14kDa. As amostras de proteína isolada foram reunidas em pools, liofilizadas e armazenadas a -20° C para análises posteriores.

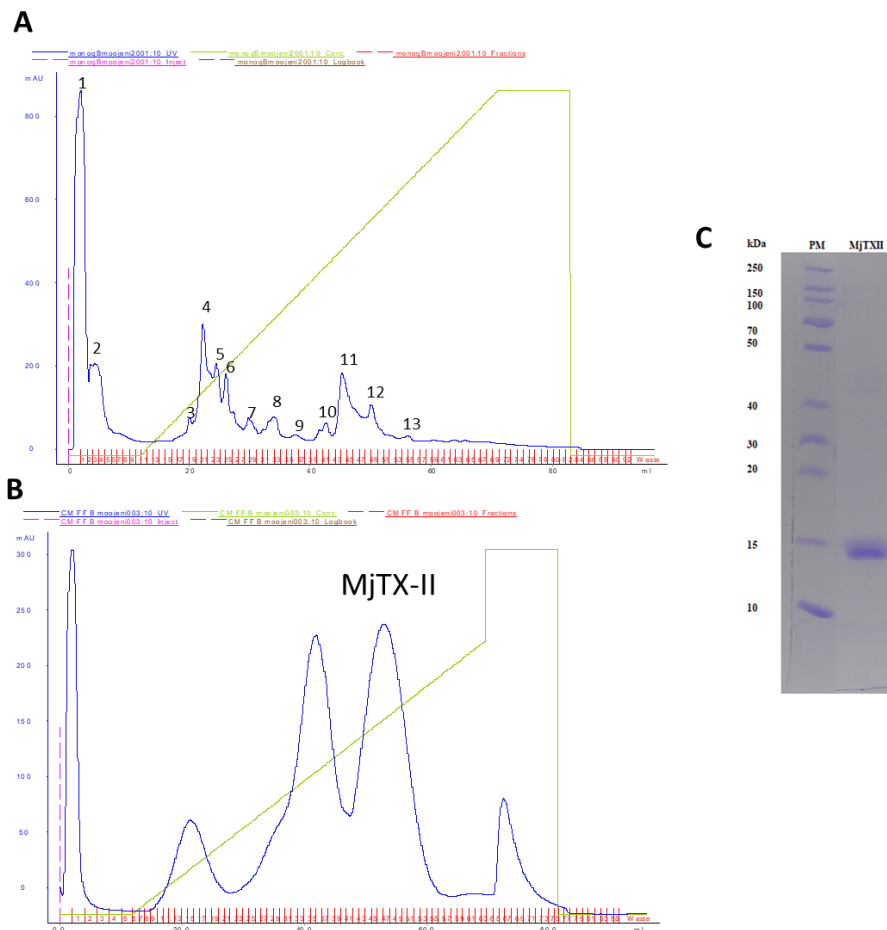


Figura 1. Purificação da PLA₂ MjTX-II. A) Perfil Cromatográfico da peçonha de *Bothrops moojeni* em coluna MonoQ. B) Perfil Cromatográfico da fração 1 proveniente da MonoQ em coluna contendo resina CM FF. C) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes da MjTX-II (~14kDa). Padrão de massa molecular (PM) (Thermo Scientific®).

5.2 Efeito antimetastático

5.2.1 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT

Os resultados demonstram o potencial citotóxico da toxina sobre a linhagem cancerígena em sua maior concentração com redução significativa da viabilidade celular (Figura 2A). A MjTX-II não interferiu na viabilidade celular da linhagem normal de pulmão (BEAS-2B) em nenhuma das concentrações testadas (Figura 2B).

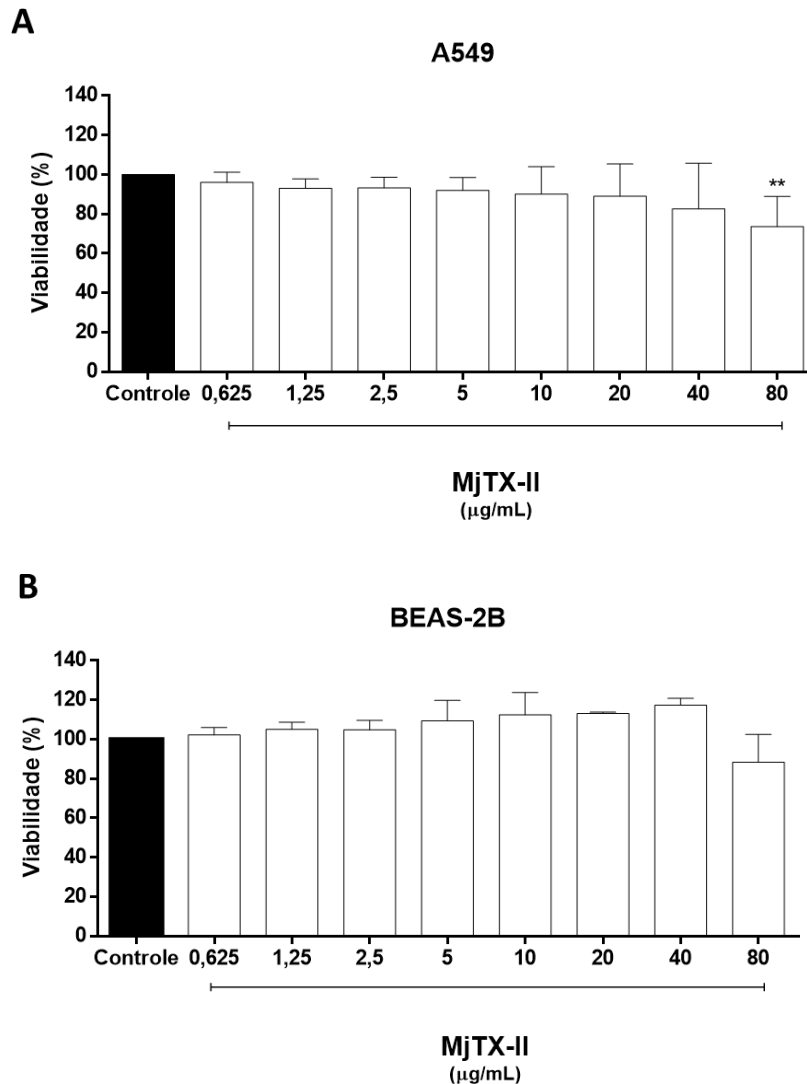


Figura 2. Ensaio de viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT. As células A549 e BEAS-2B foram tratadas com a MjTX-II em diferentes concentrações (0,625µg/mL, 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 40µg/mL e 80µg/mL) por 24h. Controle negativo: meio de cultura. A) Porcentagem de viabilidade celular em A549. B) Porcentagem de viabilidade celular em BEAS-2B. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. **p < 0,01.

5.2.2 Ensaio de proliferação celular pela metodologia de formação de colônias

Os resultados mostraram redução significativa do número de colônias formadas pela linhagem celular de câncer de pulmão na maior concentração utilizada (40 μ g/mL) (Figuras 3A e 3C). As análises não demonstraram diferença significativa na proliferação das células não tumorigênicas quando tratadas com as mesmas concentrações da toxina, uma vez que a formação de colônias dos grupos tratados não apresentou diferenças representativas em relação ao controle não tratado (Figuras 3B e 3D). A partir deste ensaio foram definidas as concentrações (10 μ g/mL, 20 μ g/mL e 40 μ g/mL) utilizadas nos ensaios seguintes de verificação do potencial antimetastático da MjTX-II.

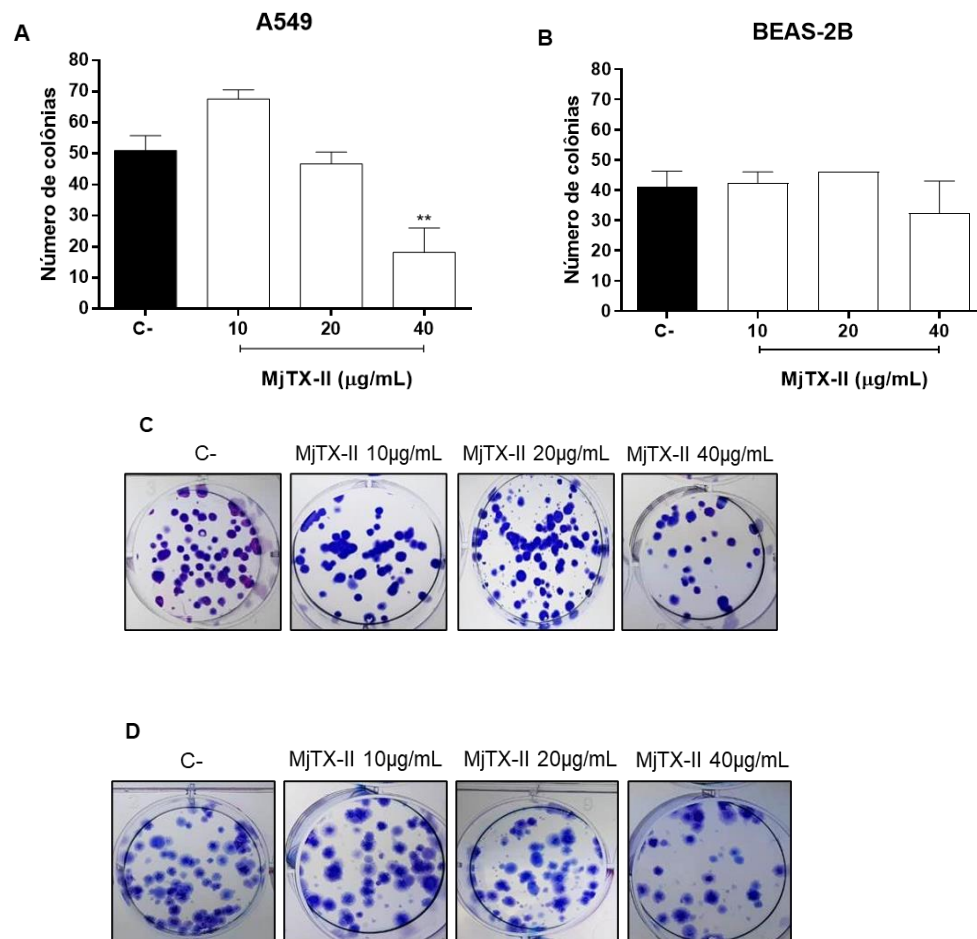


Figura 3. Ensaio de proliferação celular. As células foram tratadas com a MjTX-II (10 μ g/mL, 20 μ g/mL e 40 μ g/mL), (C-): controle negativo (meio de cultura). A) Número de colônias da linhagem A549. B) Número colônias da linhagem BEAS-2B. C) Fotomicrografia representativa das placas clonogênicas da linhagem A549 tratada com diferentes concentrações da toxina. D) Fotomicrografia representativa das placas clonogênicas da linhagem BEAS-2B tratada com diferentes concentrações da toxina. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. ** $p < 0.01$.

5.2.3 Ensaio de inibição da adesão celular

Os resultados demonstram que a MjTX-II reduziu a adesão das células A549 em 55% e 64% nas concentrações de 20 e 40 μ g/mL, respectivamente (Figura 4A). Interessantemente, observou-se redução significativa da adesão celular da linhagem BEAS-2B apenas na maior concentração testada (40 μ g/mL) com uma redução de aproximadamente 54% da adesão (Figura 4B).

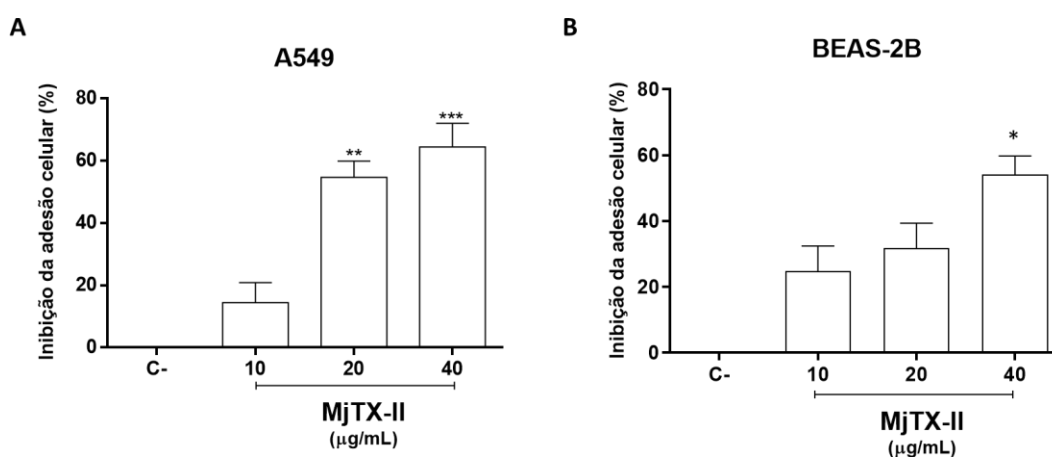
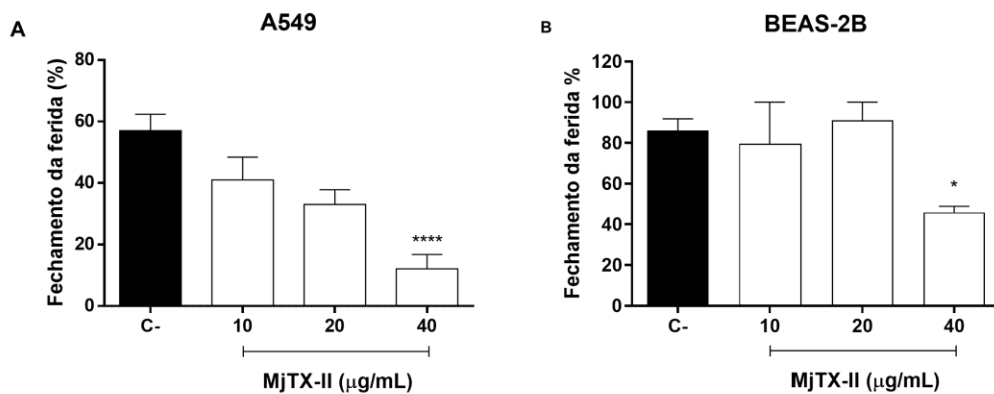


Figura 4. Ensaio de inibição da adesão celular. As células A549 e BEAS-2B foram tratadas com diferentes concentrações da MjTX-II (10 μ g/mL, 20 μ g/mL e 40 μ g/mL) ou meio (controle negativo). A) Porcentagem de inibição da adesão celular da linhagem A549. B) Porcentagem de inibição da adesão celular da linhagem BEAS-2B. C-: controle negativo (meio de cultura). Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

5.2.4 Ensaio de migração celular horizontal e vertical

Seguindo com as análises do potencial antimetastático da MjTX-II sobre as células de câncer de pulmão, avaliamos o potencial da toxina em inibir a migração celular. O resultado obtido pela técnica de Wound healing (migração horizontal) demonstra que o tratamento com a toxina na concentração de 40 μ g/mL reduziu significativamente a migração das células em 79% após 24h, quando comparado com o grupo controle (considerando o fechamento da ferida do grupo controle como 100%) (Figuras 5A e 5C). Em relação à linhagem não tumorigênica, também foi verificada a inibição significativa da migração na concentração de 40 μ g/mL em aproximadamente 47% (Figuras 5B e 5D). A interferência da MjTX-II na adesão celular, provocada pela ferida não permitiu a migração completa das células controle neste tempo de tratamento avaliado. Os resultados do ensaio de migração horizontal nas células A549 tratadas com a MjTX-II 40 μ g/mL por 24 horas, demonstram que a interferência na adesão celular, provocada pela ferida não permitiu a migração completa das células controle neste tempo de tratamento avaliado. Além disso, as células tratadas com a toxina na maior concentração, apresentam-se com uma morfologia alterada.

Visando corroborar com os dados de migração horizontal, foi realizado o ensaio de migração por Transwell (migração vertical), no qual células A549 e BEAS-2B foram pré-incubadas por 30 minutos com a MjTX-II (10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$). Para este ensaio, foi considerado controle positivo insertos onde foi adicionado meio de cultura com SFB 10% na câmara inferior e controle negativo, insertos onde foi adicionado meio de cultura sem SFB. Além disso, as análises estatísticas foram realizadas considerando os valores dos grupos tratados em relação ao controle positivo. A MjTX-II diminuiu a migração vertical das células A549 através da membrana da câmara do transwell em aproximadamente 70% nas concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ (considerando o número de células por campo do controle positivo como 100%) (Figuras 6A e 6C). Resultados semelhantes foram observados nas células BEAS-2B tratadas com a toxina, apresentando inibição da migração das células pelo ensaio de transwell após tratamento com 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ da toxina (considerando o número de células por campo do controle positivo como 100%) (Figura 6B e 6D).



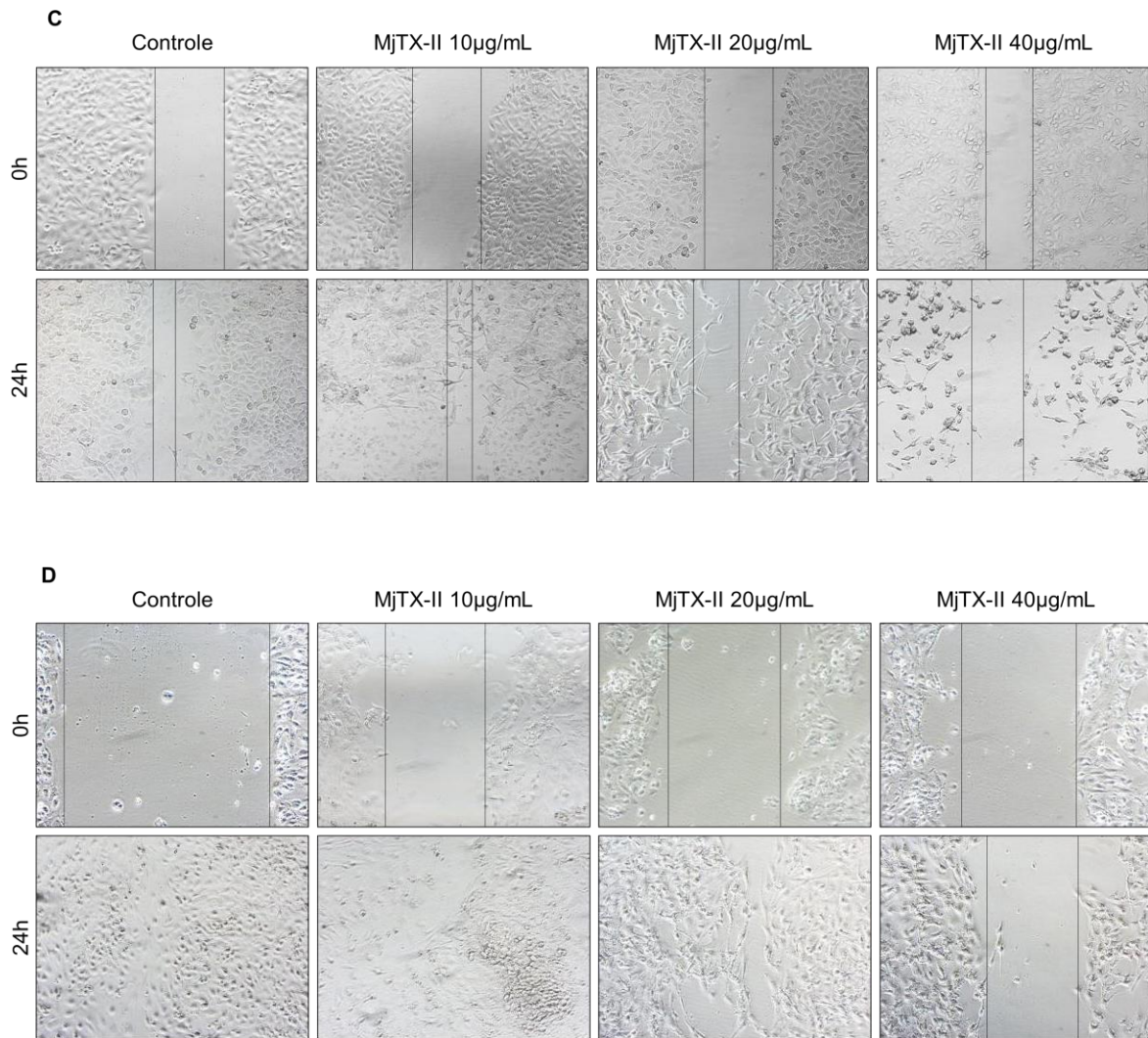


Figura 5. Ensaio de migração celular por Wound-Healing. As linhagens de câncer de pulmão e células de pulmão não tumorigênicas foram tratadas com diferentes concentrações da MjTX-II (10, 20 e 40 µg/mL) ou meio (controle negativo). A) Porcentagem de fechamento da ferida após 24h em linhagem A549. B) Porcentagem de fechamento da ferida após 24h em linhagem BEAS-2B; C) Fechamento da ferida após 24h da linhagem A549 em diferentes concentrações da toxina D) Porcentagem de fechamento da ferida após 24h em linhagem BEAS-2B em diferentes concentrações da toxina; (C -: controle negativo). Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

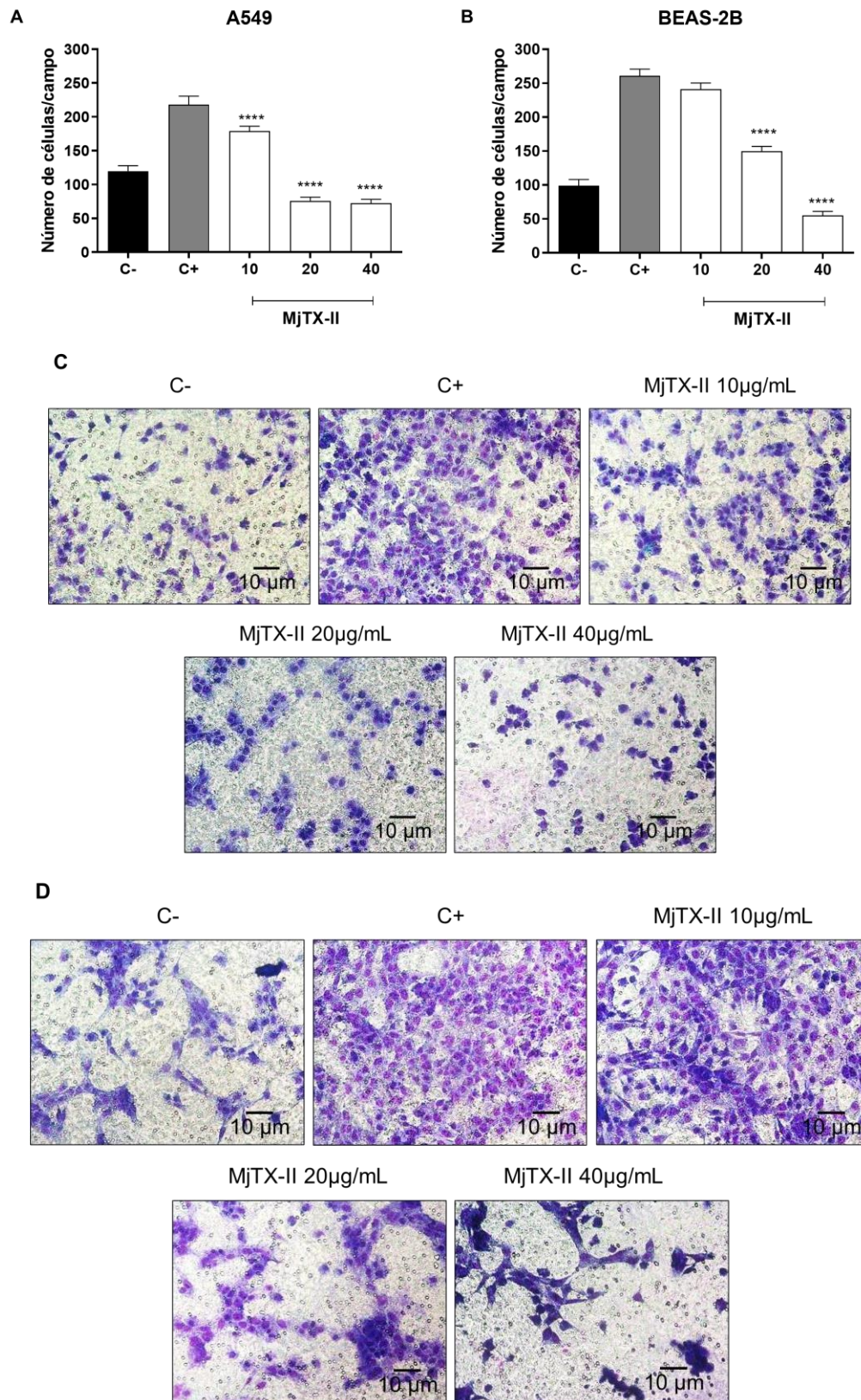
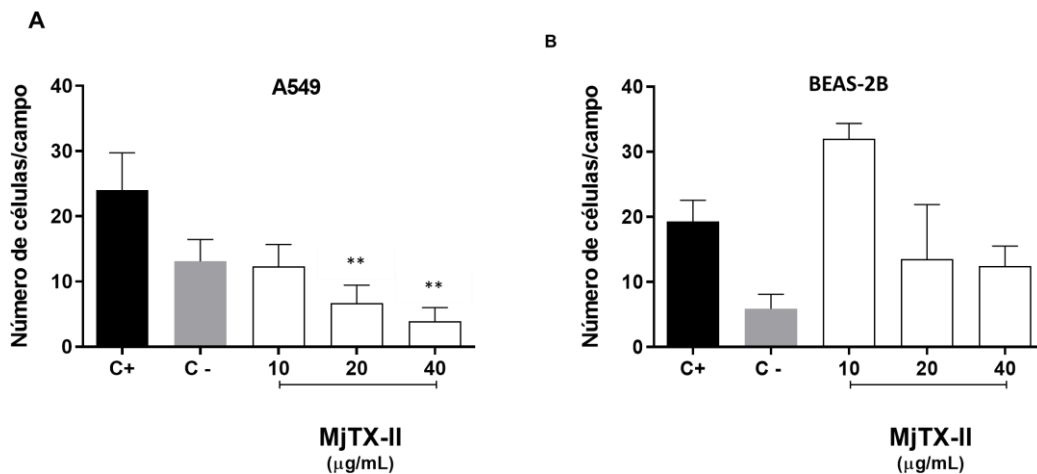


Figura 6. Ensaio de migração celular por Transwell. A linhagens de câncer de pulmão e células de pulmão não tumorigênicas foram pré-incubadas com diferentes concentrações da MjTX-II (10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura. A parte inferior da câmara foi preenchida com meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (controle positivo: C+) e meio de cultura sem soro fetal bovino (controle negativo: C-). (A): Número de células A549 migradas por campo (B): Fotomicrografia representativa da migração em Transwell em A549 após tratamento com toxina. (C) Número de células BEAS-2B migradas por campo. (D) Fotomicrografia representativa da migração em Transwell em BEAS-2B após tratamento com toxina. Barra de escala: 10 μm . Fotografias tiradas em aumento de 40x. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. **** $p < 0.0001$.

5.2.5 Ensaio de invasão celular por Transwell

O ensaio de invasão em Matrigel demonstrou que o tratamento com a toxina foi capaz de reduzir a invasão das células tumorais de pulmão em todas as concentrações testadas quando comparado com as células controles contendo meio suplementado com SFB 10% na câmara inferior (Controle positivo), apresentando 50%, 72% e 83% de inibição da invasão após o tratamento com 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ da toxina, respectivamente (Figuras 7A e 7C). Para este ensaio, foi considerando o número de células invadidas por campo do controle positivo como 100%. Além disso, as análises estatísticas foram realizadas considerando os valores dos grupos tratados em relação ao controle positivo. Interessantemente, não houve redução significativa da invasão das células BEAS-2B após tratamento com a MjTX-II (Figuras 7B e D).



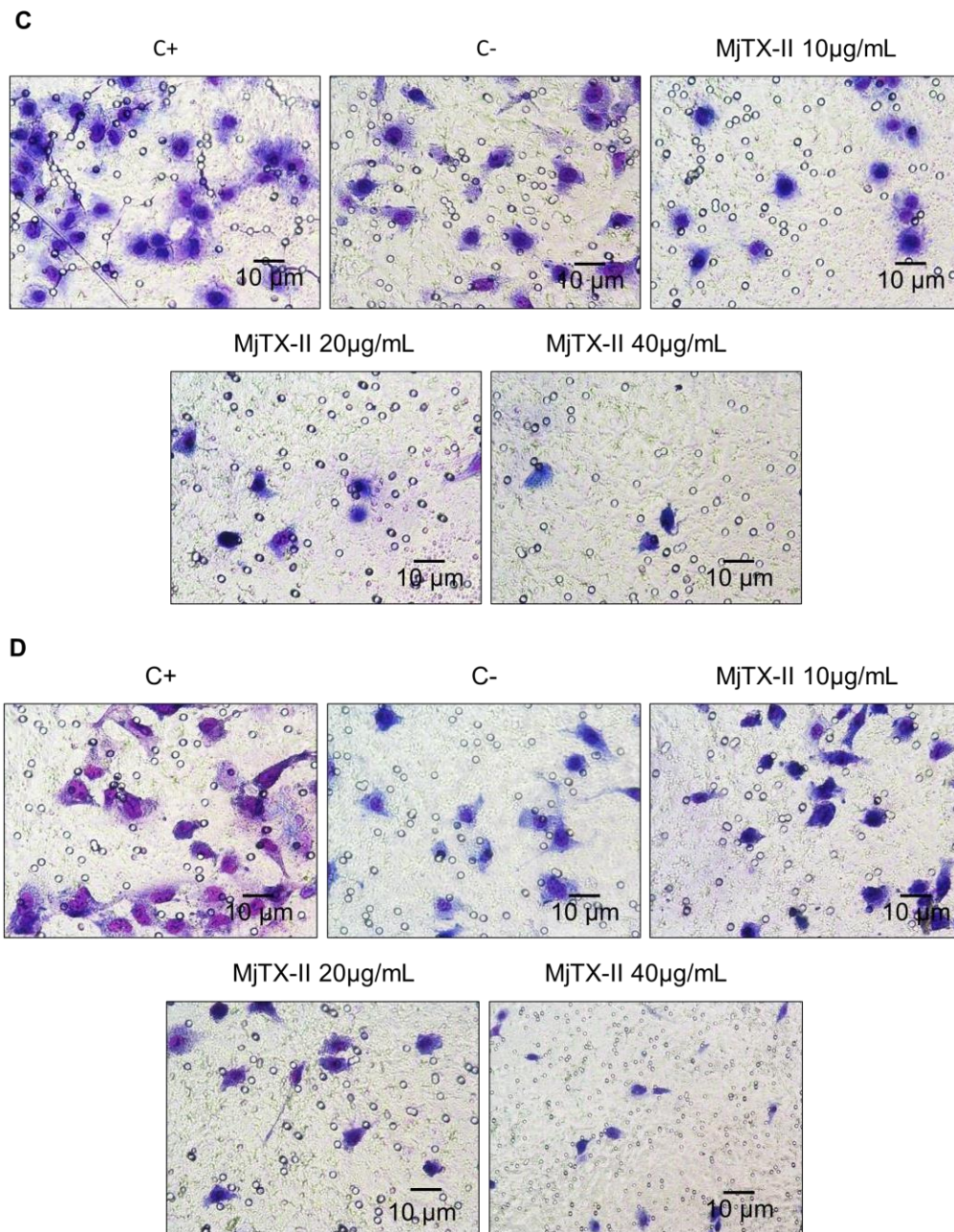
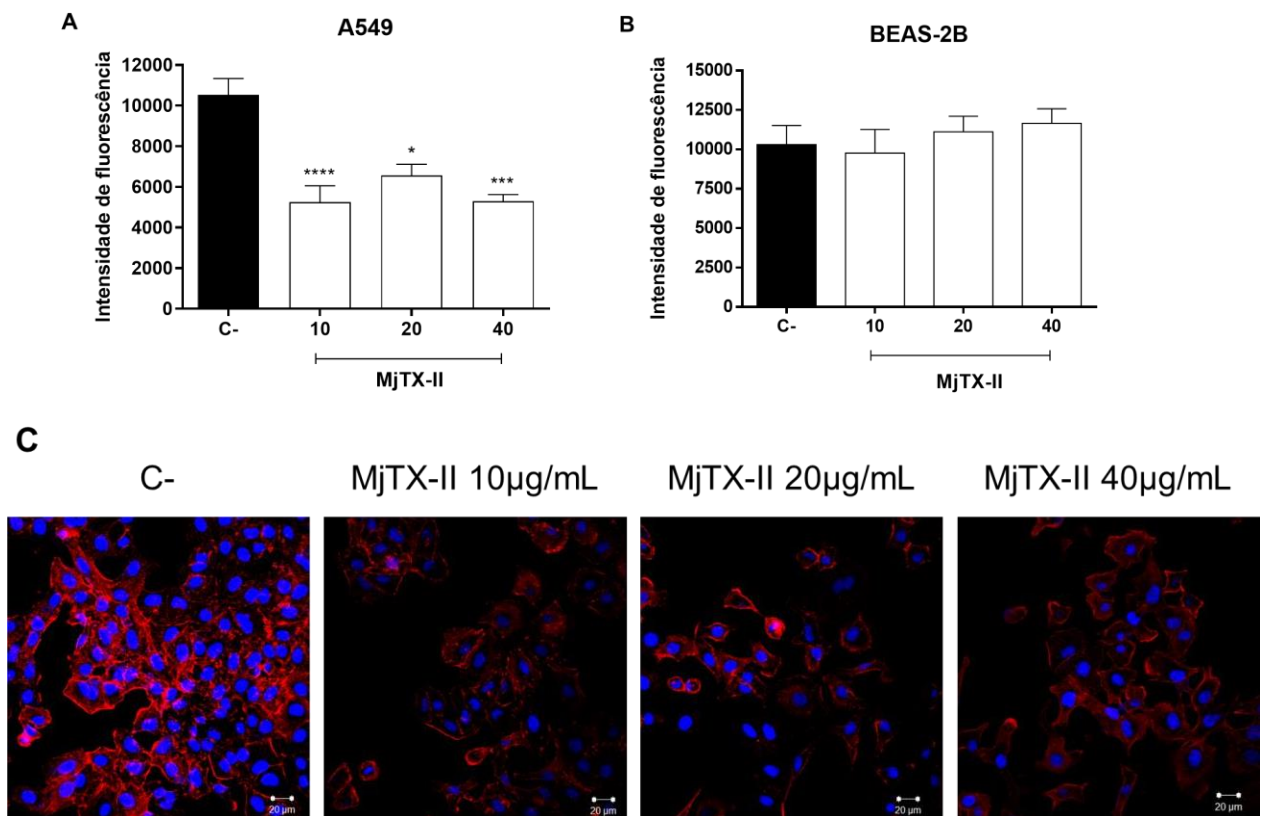


Figura 7. Inibição da invasão celular pela técnica de Transwell. Células A549 e BEAS-2B foram pré- incubadas com diferentes concentrações da MjTX-II (10, 20 e 40 µg/mL) ou meio de cultura. A parte inferior da câmara foi preenchida com meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (controle positivo: C+) e meio de cultura sem soro fetal bovino (controle negativo: C-). A) Número de células A549 invadidas por campo. (B) Número de células BEAS-2B invadidas por campo. (C) Fotomicrografia representativa da invasão em Transwell após tratamento das células A549 com a toxina. (D) Fotomicrografia representativa da invasão em Transwell após tratamento das células BEAS-2B com a toxina. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. **p < 0.01.

5.2.6 Ensaio de quantificação dos níveis de F-actina

Como demonstrando nas figuras 8A e 8C, foi observada significativa redução da intensidade de fluorescência (aproximadamente 50, 62 e 50%, nas concentrações de 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) nas células A549 tratadas com a MjTX-II quando se comparada ao grupo controle (considerando a intensidade de fluorescência do controle como 100%). Interessantemente, não foi verificada redução da intensidade de fluorescência das células controle (BEAS-2B), como mostrado nas figuras 8B e 8D. Além disso, os resultados mostraram que após o tratamento com a MjTX-II, as células A549 apresentaram mudanças na morfologia celular com os feixes de filamentos de actina curtos e finos, afetando a disposição das células, quando se comparadas ao grupo controle, em que as células mantiveram-se espalhadas e com as fibras de actina espessas e longas dispostas ao longo das células.



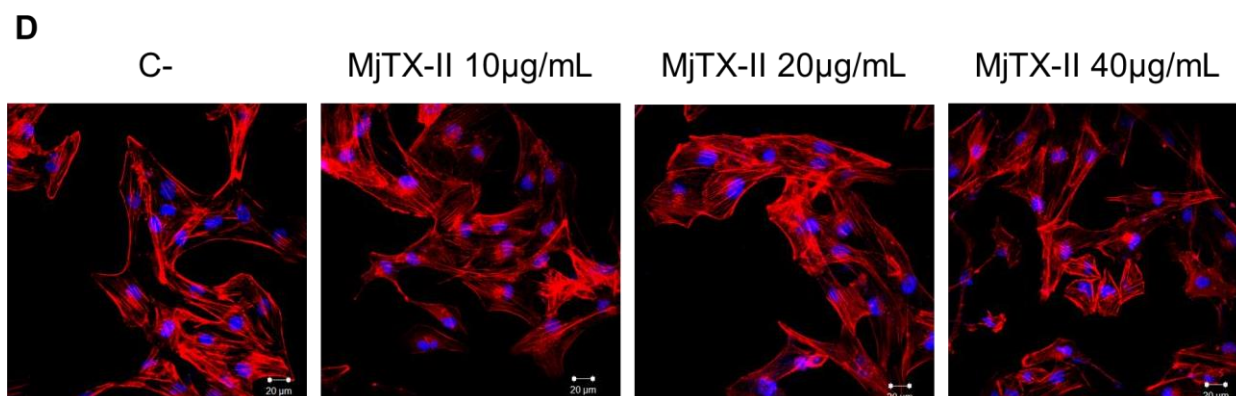


Figura 8. Ensaio de quantificação dos níveis de F-actina. Células A549 e BEAS-2B foram tratadas com diferentes concentrações da MjTX-II e meio de cultura (controle negativo: C-). A) Intensidade de fluorescência detectada nas células A549. (B) Intensidade de fluorescência detectada nas células BEAS-2B. C) Fotomicrografia representativa da intensidade de fluorescência detectada após tratamento das células A549 com a toxina. D) Fotomicrografia representativa da intensidade de fluorescência detectada após tratamento das células BEAS-2B com a toxina. Fotografias tiradas no aumento de 40x. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

5.3 Efeito antiangiogênico

A partir destes ensaios com resultados promissores, os quais demonstram a capacidade da MjTX-II em inibir processos importantes da metástase, foi investigado também o potencial da toxina em interferir na angiogênese, em modelos *in vitro* e *ex vivo*, utilizando células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e anéis aórticos, respectivamente.

5.3.1 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT

Não foi observada citotoxicidade sobre a linhagem HUVEC em nenhuma das concentrações testadas (Figura 9).

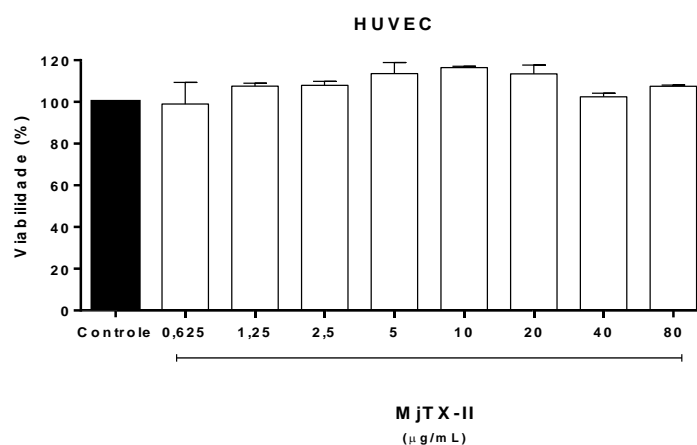


Figura 9. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT. As células da linhagem HUVEC foram tratadas com diferentes concentrações da MjTX-II (0,625µg/mL, 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 40µg/mL e 80µg/mL) ou meio de cultura (controle negativo) por 24h.

5.3.2 Ensaio de proliferação celular ou formação de colônias

Como observado no ensaio de formação de colônias, a MjTX-II também não interferiu na proliferação celular de HUVECs. As figuras 10A e 10B demonstram que não houve redução significativa no número de colônias formadas nas células HUVEC após o tratamento com a toxina em nenhuma das concentrações utilizadas.

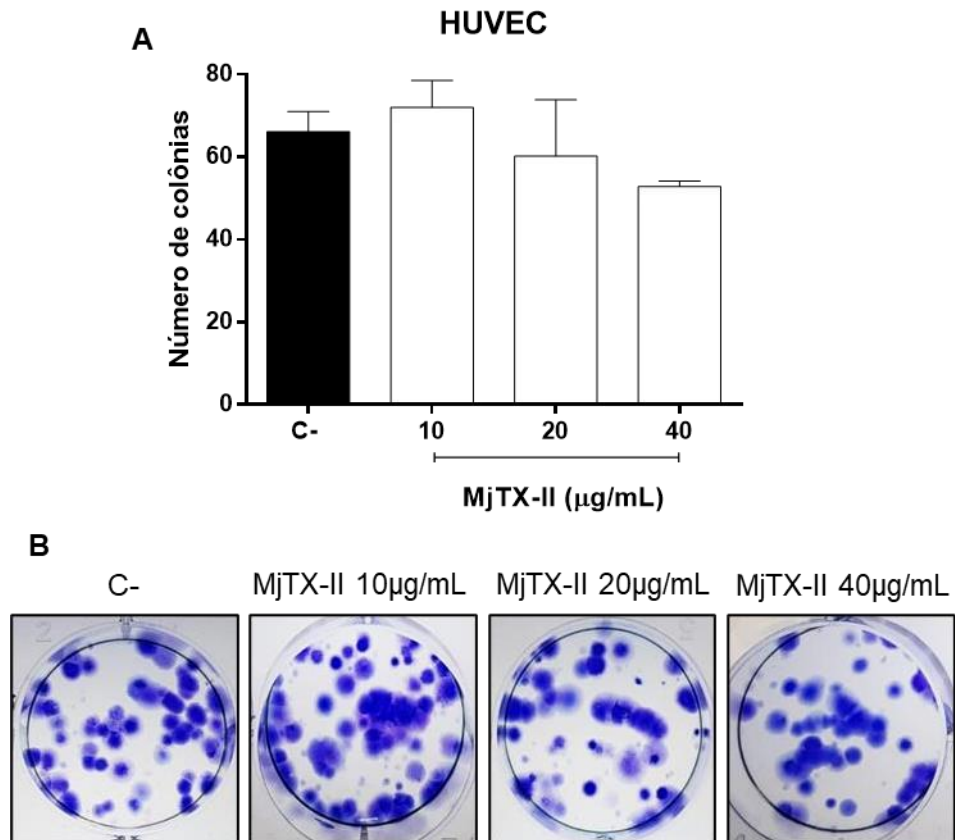


Figura 10. Ensaio de proliferação celular. As células HUVEC foram tratadas com a MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) ou meio (controle negativo: C-). A) Número de colônias da linhagem HUVEC B) Fotomicrografia representativa das placas clonogênicas da linhagem HUVEC tratada com diferentes concentrações da toxina.

5.3.3 Ensaio de ciclo celular

A MjTX-II foi capaz de interferir no ciclo celular de células HUVECs, levando a aumento de células na fase Sub-G1, cerca de 30% e 20% do total de células tratadas com 10 e 20µg/mL da toxina respectivamente. MjTX-II também provocou uma diminuição das células na fase G0-G1 40% e 50% do total de células tratadas com 10 e 20µg/mL respectivamente (Figuras 11A e 11B).

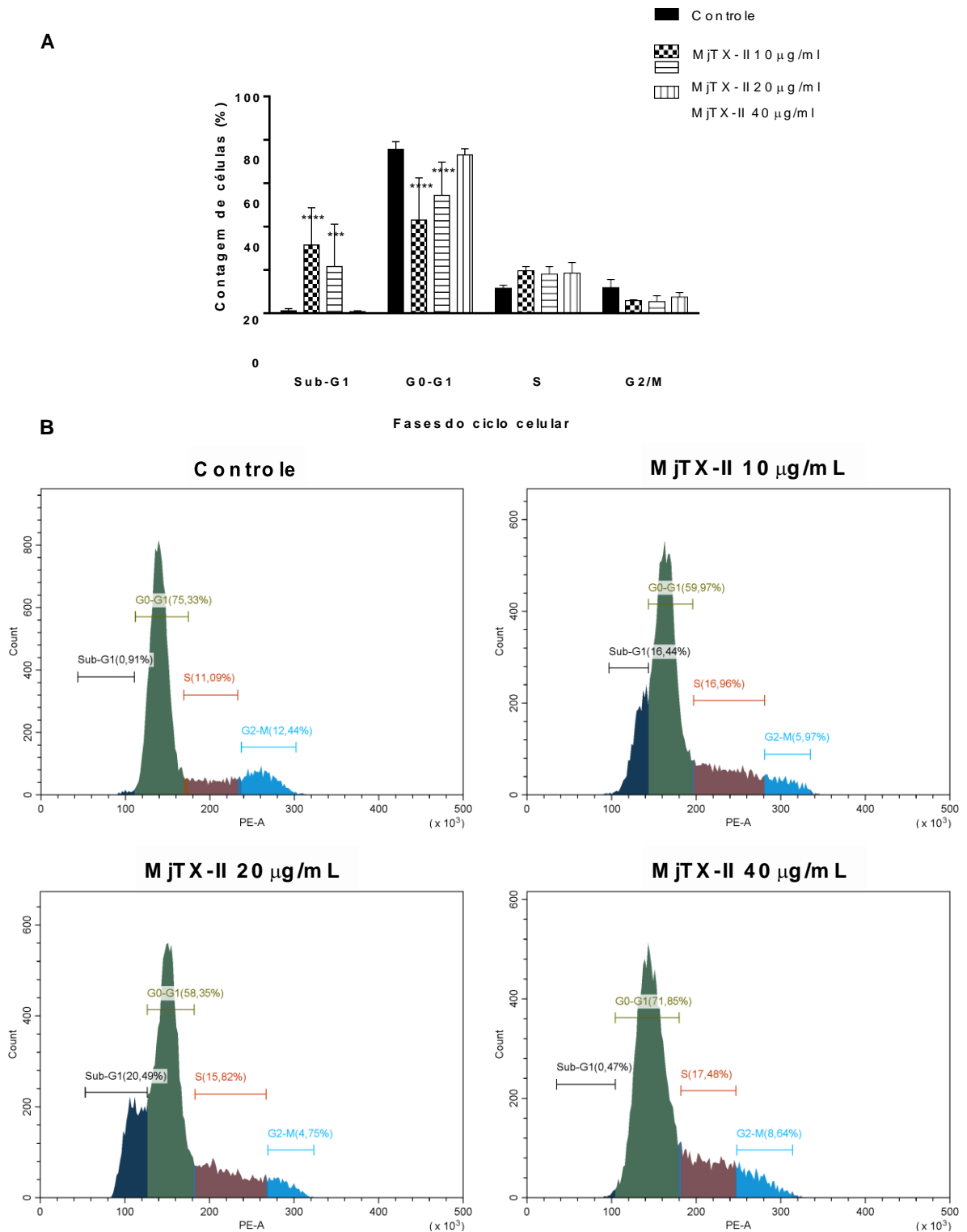


Figura 11. Ensaio de ciclo celular. As células HUVEC foram tratadas com diferentes concentrações da MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) por 24 horas. A) Porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular. B) Fluxograma da contagem de células em diferentes fases do ciclo celular. Azul escuro: fase Sub-G1, Verde: fase G0-G1, Marrom: fase S e Azul claro: fase G2-M.

5.3.4 Ensaio de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Após avaliarmos a interferência da MjTX-II sobre a citotoxicidade e proliferação das células HUVEC e não constarmos redução da viabilidade e da formação de colônias, decidimos investigar se a toxina exercia papel na formação de espécies reativas de oxigênio. Os resultados foram mensurados em porcentagem de número de células e intensidade da fluorescência, podendo-se observar aumento significativo das células duplomarçadas para PI e ROS em todas as concentrações analisadas (Figuras 12A e 12C). Com relação à intensidade de fluorescência, observou-se aumento significativo em todas as concentrações testadas, em especial, 40µg/mL (Figura 12B e 12C).

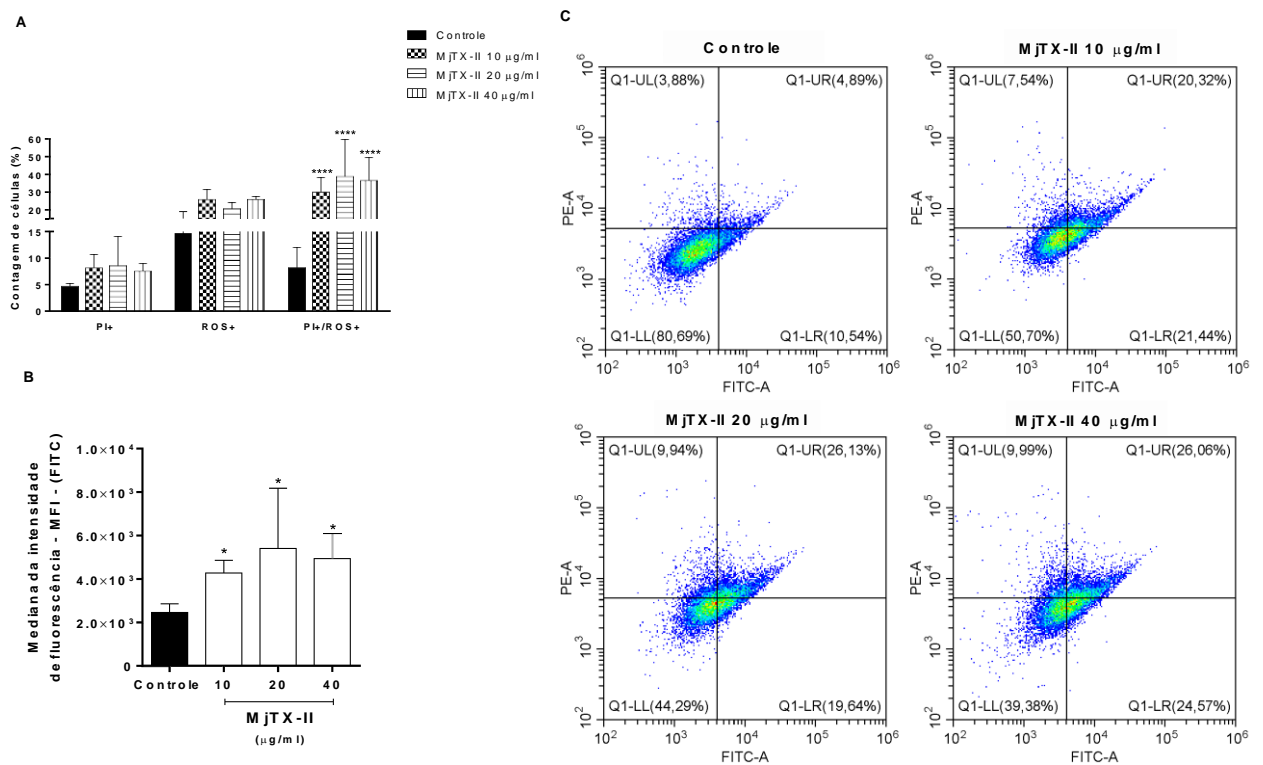


Figura 12. Ensaio de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Células HUVEC foram tratadas com a MjTX-II em diferentes concentrações (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) ou meio de cultura (grupo controle). A) Porcentagem de células marcadas com PI e/ou ROS. B) Intensidade de fluorescência. C) Análise de fluorescência por citometria de fluxo: dotplot representativo da quantidade de fluorescência e porcentagem de células unimarcadas e duplomarçadas. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. *p < 0.05; ****p < 0.0001. Q1-UL: PI+, Q1-UR: ROS+/PI+, Q1-LL: não marcado Q1-LR: ROS+.

5.3.5 Ensaio de inibição da adesão

Observou-se inibição da adesão das HUVECs em aproximadamente 54% na concentração de 40µg/mL, e 33% na concentração de 20µg/mL, sugerindo uma ação dose dependente (Figura 13).

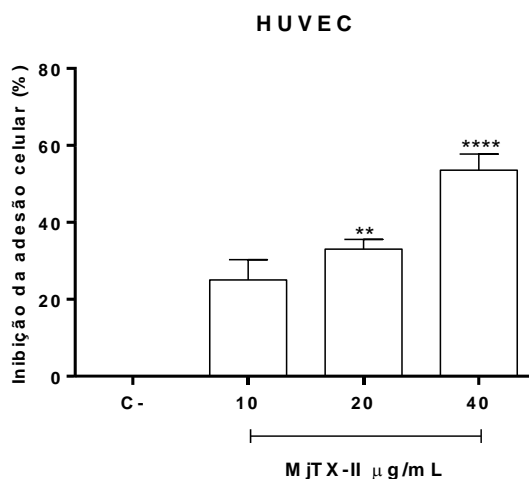


Figura 13. Ensaio de inibição da adesão celular. As células HUVEC foram pré-incubadas com a MjTX-II em diferentes concentrações (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) ou meio (controle negativo: C-). Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. **p < 0.01; ****p < 0.0001.

5.3.6 Ensaio de migração celular por wound healing

As análises demonstraram significativa inibição da migração celular após 24h de tratamento com a MjTX-II em 44, 45 e 71% nas concentrações de 10, 20 e 40µg/mL, respectivamente (considerando o fechamento da ferida do grupo controle como 100%) (Figuras 14A e 14B).

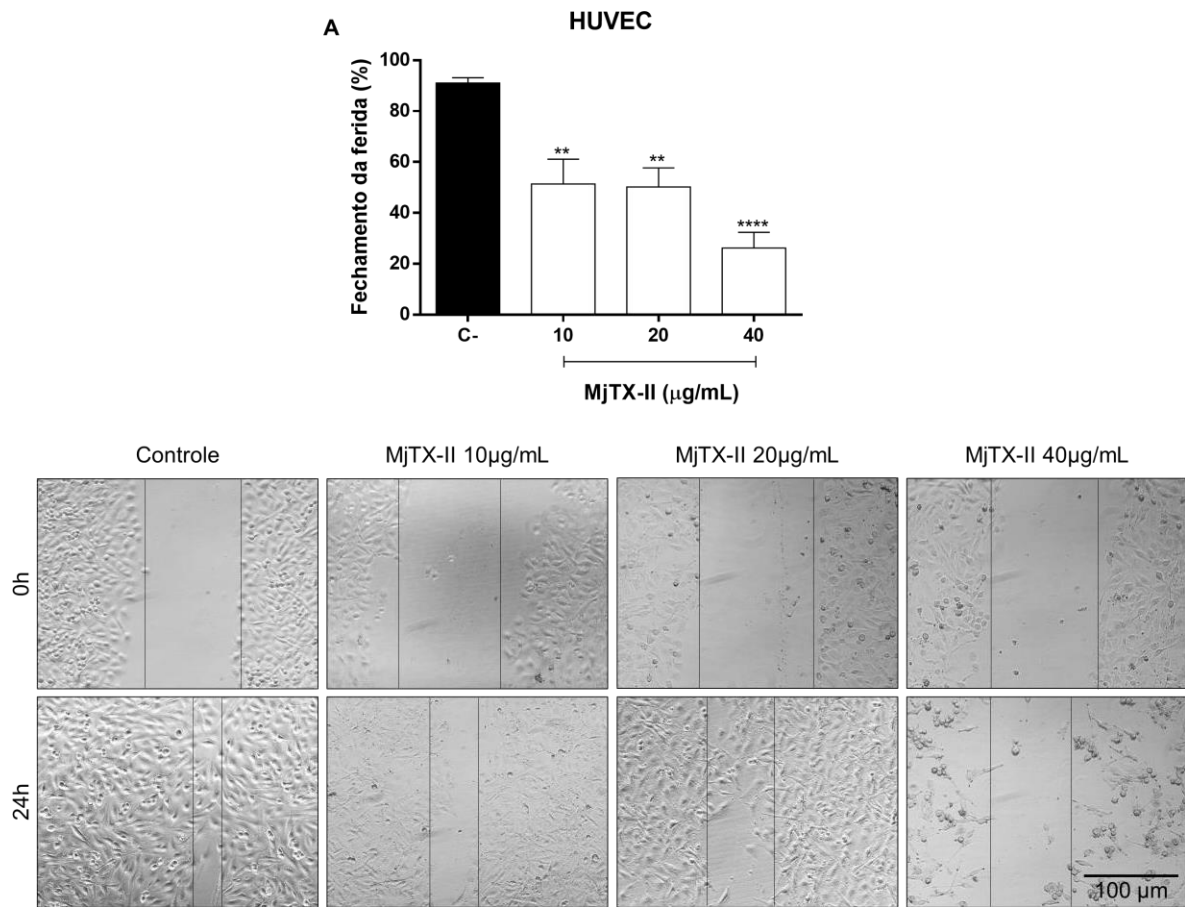


Figura 14. Ensaio de Migração celular por Wound-Healing. Células da linhagem HUVEC foram tratadas com diferentes concentrações da MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL) ou meio de cultura (controle negativo: C -). (A): Porcentagem de fechamento da ferida em linhagem HUVEC; (B): Fechamento da ferida após 24h da linhagem HUVEC em diferentes concentrações da toxina. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

5.3.7 Ensaio de migração celular por transwell

Uma vez inibindo a migração celular pelo ensaio de Wound-Healing, analisamos a capacidade da MjTX-II em inibir a migração vertical pelo método de Transwell. Resultados positivos em relação à inibição da migração em câmara Transwell foram observados. Em todas as concentrações testadas houve redução significativa do número de células migradas quando se comparadas ao controle positivo (Figura 15A e 15B).

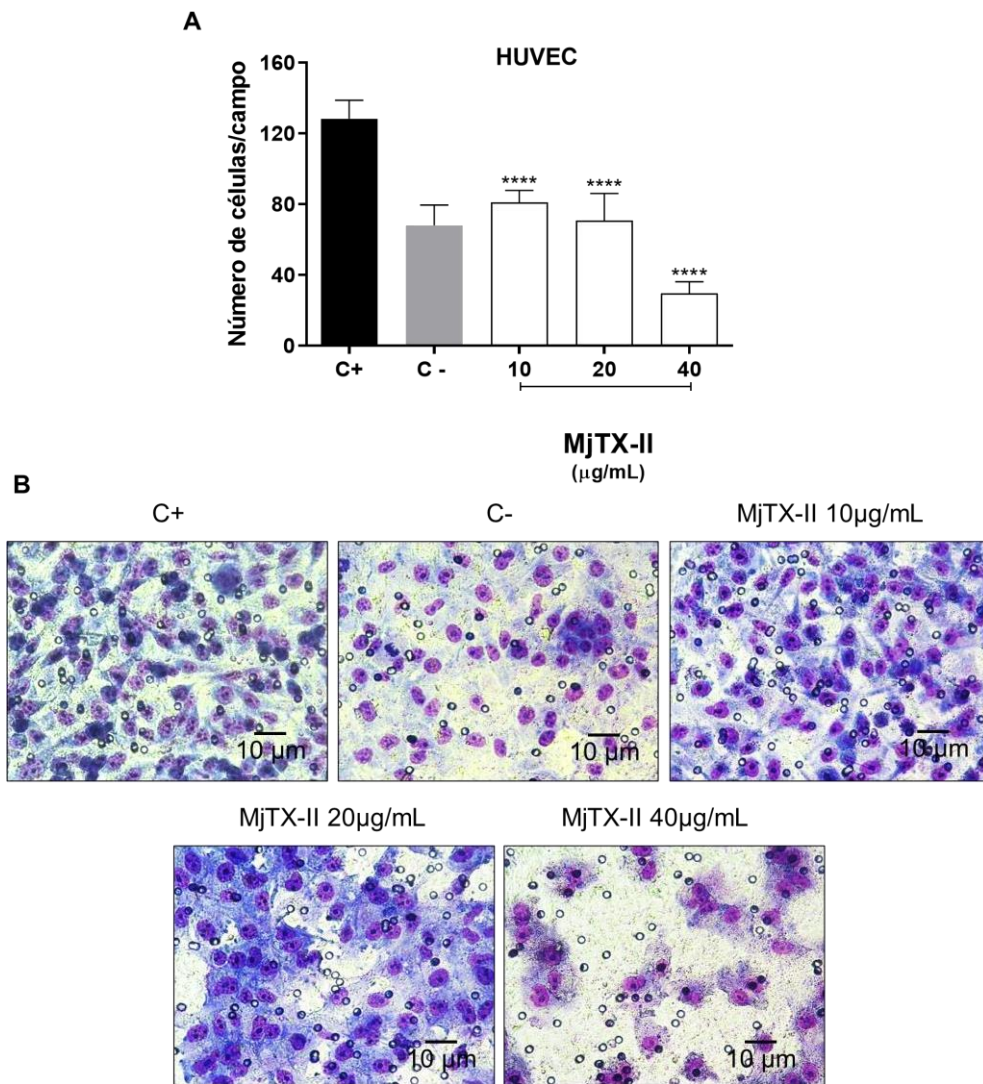


Figura 15. Ensaio de Migração celular por Transwell. Células da linhagem HUVEC foram pré-incubadas com diferentes concentrações da MjTX-II (10µg/mL, 20µg/mL e 40µg/mL), meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (controle positivo: C+) e meio de cultura sem soro fetal bovino (controle negativo: C-). A): Número de células migradas; B): Fotomicrografia representativa da migração em Transwell após tratamento com toxina. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. ****p < 0.0001.

5.3.8 Ensaio de angiogênese *in vitro*

Após avaliar os efeitos da MjTX-II sobre a linhagem HUVEC em ensaios que envolvem processos importantes para a angiogênese, experimentos que verificaram a inibição da formação de vasos foram realizados. O potencial antiangiogênico da MjTX-II foi confirmado com os resultados que demonstraram inibição completa da formação dos vasos em todas as concentrações analisadas (Figuras 16A e 16B). Nesse ensaio também houve redução do nível de VEGF presente no sobrenadante dos grupos tratados com a MjTX-II. Foram quantificados

1630,35pg/mL de VEGF no sobrenadante de células não tratadas (controle) e 229,608 pg/mL de VEGF no sobrenadante de células tratadas com 40µg/mL da MjTX-II (Figura 17).

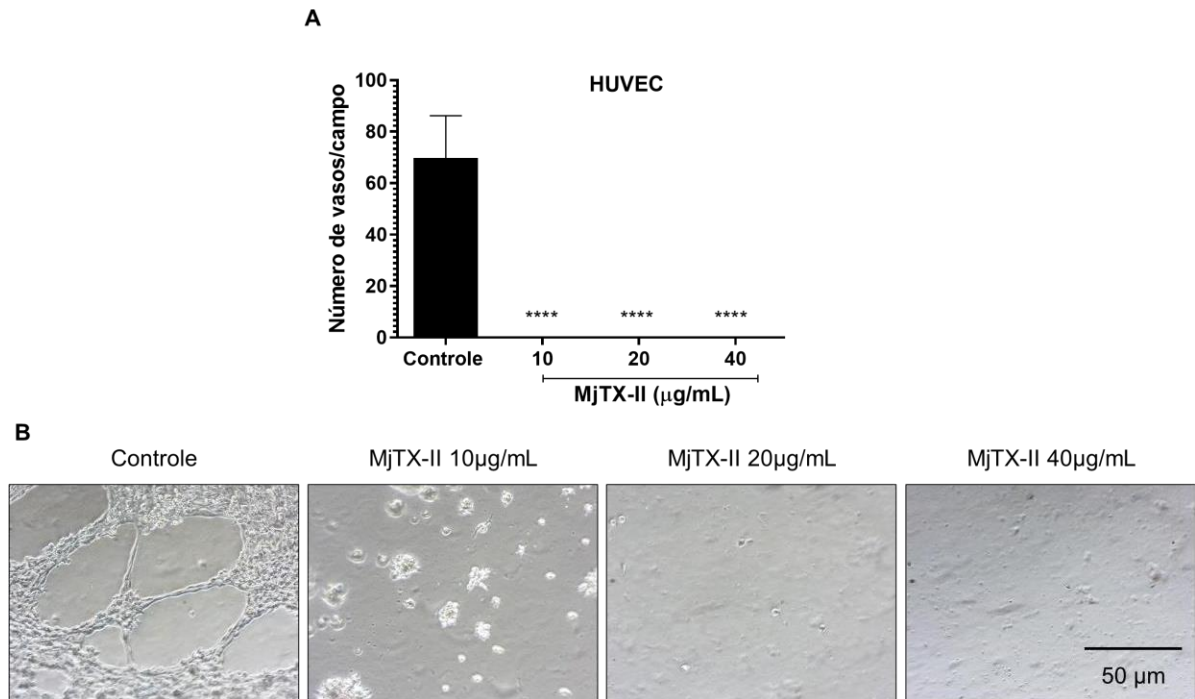


Figura 16. Ensaio de inibição da angiogênese *in vitro*. Células HUVECs foram tratadas com a MjTX-II (40µg/mL) ou meio (controle negativo). A): Número de vasos formados; B): Fotomicrografia representativa da formação de vasos em Matrigel com diferentes concentrações da toxina ou meio de cultura (controle). Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. ****p < 0.0001.

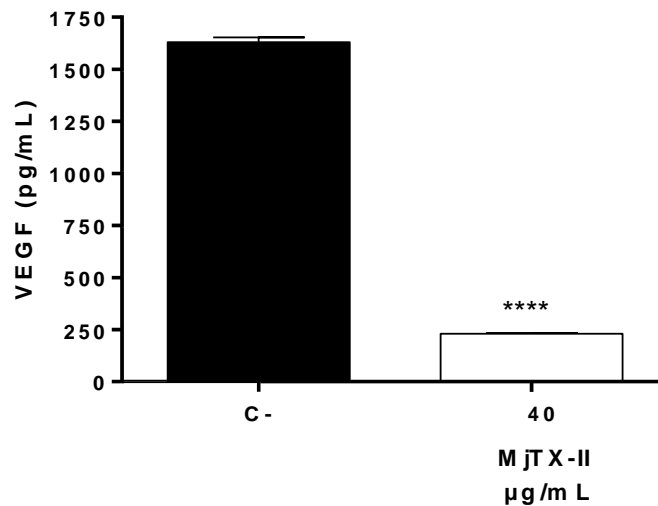


Figura 17. Dosagem de VEGF do sobrenadante de células HUVEC. O sobrenadante de células HUVECs do ensaio de angiogênese *in vitro* foi coletado para dosagem de VEGF após tratamento com a MjTX-II (40µg/mL). Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. ****p < 0.0001.

5.3.9 Ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

Após observarmos a inibição da angiogênese *in vitro*, resolvemos verificar, através da expressão gênica, se a MjTX-II modulava a expressão de genes pró e antiangiogênicos. Os resultados demonstraram que a toxina, na concentração de 40µg/mL, diminuiu a expressão dos genes de VEGF-A e ANGPT1 e aumentou a expressão do gene SFLT-1 (Figuras 18A, 18B e 18C).

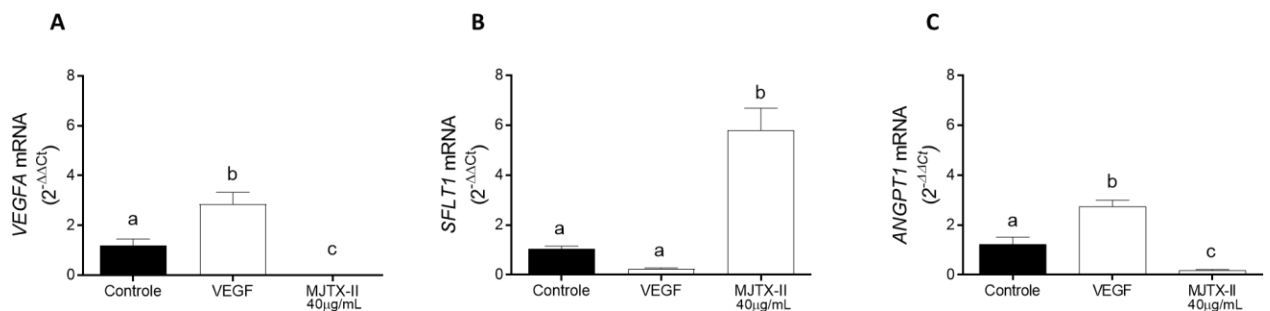


Figura 18. Ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR). Expressão de genes pró e antiangiogênicos após tratamento com a MjTX-II (40µg/mL) ou meio (GRUPO controle). A) Expressão do gene VEGF-A. B) Expressão do gene SFLT-1. C) Expressão do gene ANGPT1. Símbolos (a, b e c) indicam diferenças significativas entre grupos, onde cada letra representa diferença estatística, de modo a diferenciar cada grupo.

5.3.10 Ensaio de angiogênese *ex vivo*

O efeito antiangiogênico da MjTX-II foi confirmado pela redução da quantidade de brotamento celular formado a partir dos fragmentos de aorta nos grupos tratados com a toxina (40µg/mL) no ensaio *ex vivo*. Foi observada uma diminuição 44% no comprimento dos vasos após o tratamento com a toxina a 40µg/mL (considerando o comprimento dos vasos do grupo controle como 100%). (Figura 19).

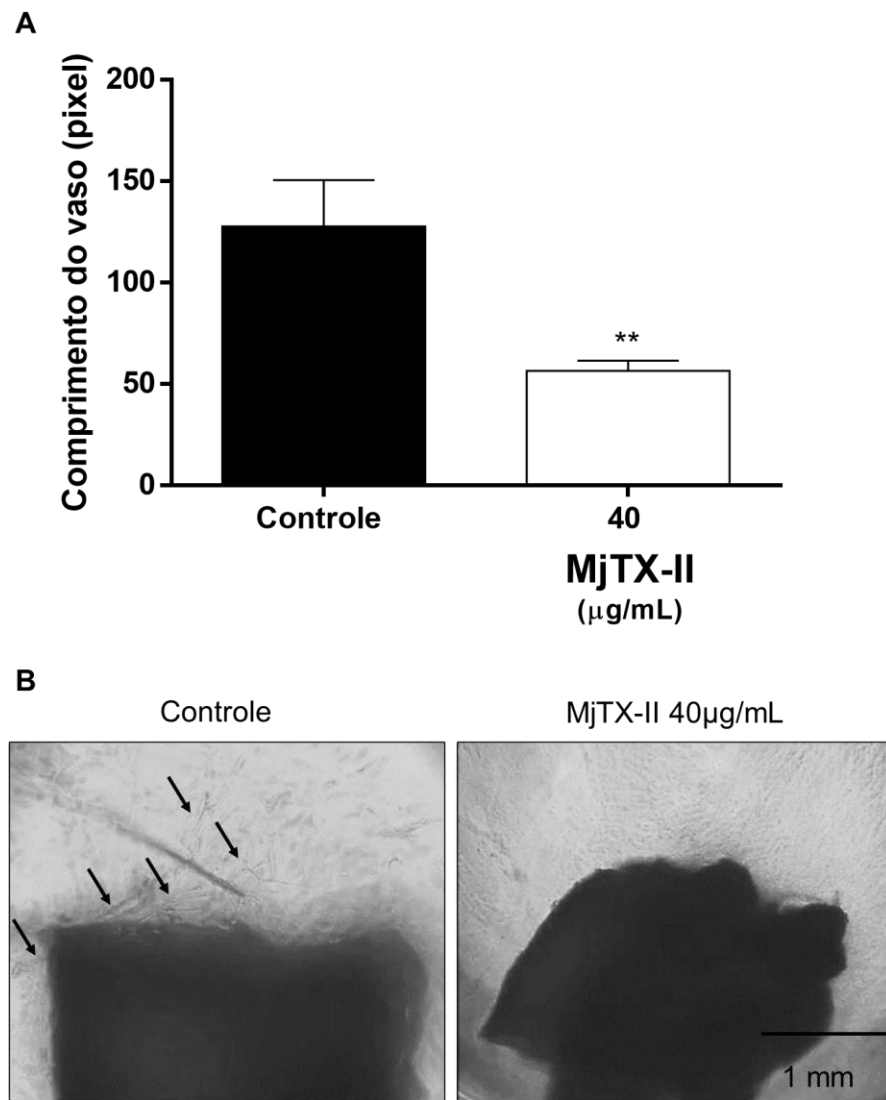


Figura 19. Ensaio de inibição da angiogênese *ex vivo*. Anéis de aorta foram tratados com a MjTX-II (40µg/mL) ou meio com bFGF (10 ng/mL) (controle negativo). A) Comprimento dos vasos formados. B) Imagens representativas da formação de vasos em Matrigel na presença de 40µg/mL da toxina ou meio (controle). Os brotamentos celulares são indicados pelas setas. Símbolo (*) indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. **p < 0.01.

4. Discussão

Nos últimos anos, o efeito antitumoral e antiangiogênico de diferentes fosfolipases A₂ isoladas de peçonha de serpente (PLA₂s) vem sendo explorado sobre diferentes tipos de tumores (câncer de mama, melanoma, leucemia de células T humanas, leucemia promielocítica, carcinoma hepatocelular humano, câncer de cérebro, pâncreas, cervical e de esôfago) em ensaios *in vitro* e *in vivo*, indicando o papel dessas toxinas na inibição de processos importantes para a progressão tumoral e indução da angiogênese [23, 12, 13, 24, 20]. Contudo, pouco se sabe sobre o papel dessa classe de toxinas em células de câncer de pulmão. Neste estudo, demonstramos pela primeira vez, os efeitos antimetastáticos da PLA₂ MjTX-II, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, sobre células de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) A549, sobre as células não tumorigênicas BEAS-2B e a atividade antiangiogênica sobre células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs).

Inicialmente, a MjTX-II foi purificada em duas etapas cromatográficas, obtendo-se de maneira eficiente uma fração homogênea da toxina, que foi utilizada nos ensaios biológicos seguintes. A MjTX-II é uma das principais toxinas encontradas na peçonha de *B. moojeni*, sendo caracterizada como uma PLA₂-Lys-49 miotóxica sem atividade catalítica, cujo peso molecular é de 13,5 kDa [16].

Com o intuito de avaliar o potencial antimetastático da toxina, inicialmente avaliamos a capacidade da MjTX-II em induzir citotoxicidade nas células de câncer de pulmão A549 e nas células não tumorigênicas BEAS-2B pelo ensaio de MTT. Neste ensaio observamos uma fraca citotoxicidade induzida pela toxina (80 µg/mL) apenas na linhagem tumoral. O ensaio de MTT avalia a função mitocondrial e é frequentemente usado para detectar diminuição da sobrevivência celular. Contudo, esta metodologia pode subestimar o dano e a morte celular porque este método é mais adequado para detectar os estágios finais da apoptose, quando a atividade metabólica das células é severamente reduzida [25].

Assim, também investigamos a interferência da PLA₂ MjTX-II nas células A549 e BEAS-2B pelo ensaio de formação de colônias. MjTX-II foi capaz de inibir significativamente a capacidade das células tumorais A549 de sofrer divisão e produzir colônias na concentração de 40 µg/mL. Diferentemente, a toxina não inibiu a proliferação das células controle em nenhuma das concentrações testadas, evidenciando assim, o possível efeito citotóxico da toxina na linhagem celular de câncer de pulmão.

A crotocina (CrTX), uma PLA₂ isolada da peçonha da cascavel *Crotalus durissus terrificus*, inibe o crescimento de várias linhagens tumorais de pulmão, incluindo carcinoma

escamoso de pulmão humano (SK-MES-1) e duas linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão humano (SPCA-1 e A549). Han e colaboradores, 2014 [26] demonstraram que a CrTX inibiu o crescimento pelo ensaio de MTT e a formação de colônias de células SK-MES-1 de maneira dependente da dose e do tempo. Além disso, a CrTX inibe significativamente o crescimento de células A549 com um valor de IC50 de 78µg/mL de uma maneira dependente da concentração [27]. O mecanismo subjacente aos efeitos citotóxicos da CrTX em células de câncer de pulmão A549 e SK-MES-1 inclui a inibição da proliferação celular e apoptose, associada à ativação da caspase-3, quinase N-terminal c-Jun (JNK), p53 e p38 [28, 29].

É importante destacar que quando testada nas mesmas concentrações, a PLA₂ MjTX-II reduziu de maneira seletiva a viabilidade e a proliferação das células tumorais A549, não interferindo na viabilidade da linhagem não tumorigênica (BEAS-2B). A preservação da viabilidade e proliferação das células controle, não tumorigênica, observadas nestes resultados, sugere uma possível preferência por alvos específicos das células tumorais, característica importante para a potencial aplicação desta toxina como modelo farmacológico.

Outros pesquisadores também verificaram a indução de citotoxicidade de PLA₂s de peçonha de serpentes em outros tipos de câncer. Em trabalho realizado por Benati e colaboradores em 2018, observou-se que a MjTX-I, isolada também da peçonha de *B. moojeni*, induziu citotoxicidade em células de leucemia (K562-S e K562-R) ao reduzir a viabilidade dessas células. A BnSP-6, uma PLA₂ Lys-49 isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, induziu citotoxicidade de maneira dose dependente em células de câncer de mama [12].

Além da ativação de vias proliferativas e resistência a morte celular, foram descritas outras capacidades biológicas adquiridas durante a carcinogênese, como, evasão de supressores de crescimento tumoral, imortalidade, instabilidade do genoma, inflamação, reprogramação do metabolismo energético, evasão da destruição do sistema imunológico, ativação de processos de invasão, metástase e angiogênese [4,5]. O processo metastático é importante para o aumento da malignidade do câncer. Este processo depende da capacidade dessas células em seguir uma sucessão de mudanças biológicas celulares em uma cascata de invasão-metástase [30] que começa com a invasão local, seguida pelo intravasamento por células cancerosas em vasos sanguíneos e linfáticos próximos, trânsito de células cancerosas através dos sistemas linfático e hematogênico, seguido pelo escape de células cancerosas da luz de tais vasos no parênquima de tecidos distantes (extravasamento), a formação de pequenos nódulos de células cancerosas (micrometástases) e finalmente, o crescimento de lesões micrometastáticas em tumores macroscópicos, sendo esta última etapa denominada “colonização” [4].

Neste contexto, foi observada a atividade da MjTX-II na inibição da adesão, migração e invasão de células de câncer de pulmão A549, mesmo em doses sub-tóxicas. A MjTX-II interferiu na adesão, migração e invasão das células BEAS-2B apenas na maior concentração,

resultados que corroboram com a hipótese de que a MjTX-II tem uma preferência por alvos nas células tumorais. É relevante observar que os resultados do ensaio de migração horizontal das células A549 cultivadas por 24 horas, demonstram que a interferência na adesão celular, provocada pela ferida, não permitiu a migração completa das células controle (sem tratamento). Além disso, as células tratadas com a toxina na maior concentração, apresentam-se com uma morfologia alterada, o que corrobora com a inibição da proliferação observada nessa concentração no ensaio de formação de colônias.

É possível distinguir três mecanismos antimetastáticos exibidos pelas diferentes classes de toxinas isoladas de serpentes: envolvendo (1) a inibição da adesão, migração e invasão a componentes da matriz extracelular, (2) inibição da transição epitélio-mesenquimal e (3) inibição da migração por alterações na rede actina/citoesqueleto [31]. MVL-PLA₂, uma Asp49 isolada da serpente *Macrovipera lebetina transmediterranea* foi hábil em inibir a adesão e migração de células de câncer de melanoma IGR39 ao fibrinogênio e fibronectina (Bazza et al., 2009). Azevedo e colaboradores em 2019 [15] investigaram o potencial antitumoral e antimetastático da PLA₂-Asp49 BthTX-II isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* em células de câncer de mama MDA-MB-231. Seus resultados demonstram que a toxina inibiu a adesão à diferentes componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina. Além disso, inibiu a invasão, migração e transição epitélio-mesenquimal das células através do aumento da expressão de E-caderina (CDH-1) e diminuindo TWIST1 (Twist Family BHLH Transcription Factor 1), CTNNB1 (catenin beta 1), vimentina e expressão de citoqueratina-5.

Durante a migração e invasão de células cancerosas, o citoesqueleto de actina é remodelado sob estímulos extracelulares, que são mediados por vários receptores, incluindo integrinas [32]. As integrinas ativam a sinalização intracelular que controla a organização do citoesqueleto, a polaridade celular e a formação da vanguarda das células cancerosas em migração, processos estes que envolvem a conexão de integrinas ao citoesqueleto, quinases e receptores de fator de crescimento transmembrana [33, 34]. Neste contexto, nossos resultados demonstram que as alterações no citoesqueleto de actina de células A549 tratadas com a MjTX-II podem justificar os efeitos anti-adesivos, anti-migratórios, anti-invasivos observados e confirmar o potencial antimetastático da PLA₂ MjTX-II.

Corroborando com os nossos resultados, Bazaa e colaboradores, 2010 [35] demonstraram que MVL-PLA₂ isolada de *Macrovipera lebetina*, também induz uma alteração na dinâmica dos microtúbulos de células endoteliais HMEC-1 inibindo a adesão e migração das células. A Daboialectina, uma lectina do tipo C, isolada da peçonha de *Daboia russelii* (Víbora Russell) também inibiu a adesão e migração de células derivadas de carcinoma bronco-alveolar humano (A549) por induzir alterações no citoesqueleto celular através da regulação de RHO-GTPases e bloqueio da via antiapoptótica [36].

Outras moléculas derivadas da peçonha de serpentes também já demonstraram efeitos

antimetastáticos relacionado às alterações na rede actina/citoesqueleto. Oliva e colaboradores em 2007 [37] analisaram a ação das desintegrinas, Jarastatina (JT) isolada de da peçonha de *Bothrops jararaca* e Flavouridina (FL), da peçonha de *Trimeresurus flavoridis* sobre o citoesqueleto de células de melanoma, constatando-se que a JT e FL induziram modificações do citoesqueleto de actina, de maneira a aumentar a polimerização da actina e intensidade de fluorescência, bem como alterações na morfologia celular.

Diante da evidência que o tratamento com a MjTX-II inibiu diferentes processos importantes para a metástase tumoral, nosso próximo passo foi investigar o potencial antiangiogênico dessa toxina utilizando modelos *in vitro* e *ex vivo*. A angiogênese tumoral é um processo fundamental para o favorecimento da metástase e do remodelamento tumoral [38, 39] permitindo o estabelecimento de um ambiente favorável ao crescimento do tumor, com o suprimento de nutrientes e oxigênio para o metabolismo celular [40, 41]. Quando as células recebem estímulos pró-angiogênicos, o endotélio celular atua para estabelecer a migração, proliferação, aderência e alinhamento de células endoteliais para permitir a formação de novos vasos sanguíneos e estabilização dos mesmos [41, 42].

Nossos resultados demonstram que mesmo não interferindo na viabilidade e proliferação das células endoteliais humanas (HUVEC) pelo ensaio de MTT e formação de colônia, a MjTX-II foi capaz de promover a parada do ciclo celular na fase Sub-G1 e uma diminuição na fase G0/G1 sugerindo que as células possam estar em apoptose, uma vez que alguns autores consideram os picos sub-G1 como células apoptóticas [43-46]. De forma semelhante, a PLA₂ citotóxica Crotoxina, aumentou a proporção de células em fase S induzindo apoptose em células de adenocarcinoma de pulmão humano SPCA-1 [26]. ABnSP-7, PLA₂-Lys49, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, também causou aumento de células HUVECs na fase sub-G1, diminuição na fase G0/G1 e parada do ciclo celular na fase S/M [20].

Para melhor compreender a interferência da PLA₂ MjTX-II no ciclo celular das células HUVECs, avaliamos a produção de ROS pelas células endoteliais, observando um aumento significativo da presença das espécies reativas de oxigênio, através do aumento da intensidade de fluorescência. Além disso, a toxina promoveu um aumento na porcentagem de células duplo-marcadas com ROS e PI, sugerindo que a alta produção de ROS possa estar levando a morte dessas células (seja por apoptose tardia ou necrose). Em trabalho realizado por Chen e colaboradores em 2009 [47] observou-se que a PLA₂ isolada da peçonha de *Naja naja atra* e sua forma modificada com brometo de *p*- bromofenacil (BPB) (BPB-PLA₂) induziram a geração de ROS em células de neuroblastoma humano SK-N-SH. Nossos dados também corroboram com os observados por Pathan e colaboradores, 2017, [36] onde a Daboialectina, isolada da peçonha da Víbora de Russell, induziu um aumento da produção de ROS intracelulares em células A549.

Terapias anticâncer atuam de maneira a aumentar os níveis intracelulares de ROS

causando dano ao DNA [48, 49]. Para matar as células cancerosas, a terapia sistêmica busca causar a indução de danos no DNA celular ou inibir pontos do ciclo celular, levando à apoptose [50, 51]. O aumento da produção de ROS está associado à indução de apoptose, devido ao estresse oxidativo que leva à oxidação de poros da membrana mitocondrial ou despolarização da mesma, ocasionando na liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol [52, 53]. Esses eventos resultam, então, na ativação das caspase-9 e caspase-3 [54]. PLA₂ de peçonha de serpentes, durante o metabolismo de fosfolipídeos de membrana, causam um efeito citotóxico que pode estar relacionado à liberação de ROS. Esse estresse oxidativo pode levar ainda, à ativação de vias de morte celular, por exemplo, as vias de regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large), Bcl2 (B-cell lymphoma 2), e c-FLIP (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein) [13]. Contudo, os mecanismos que levam a produção de ROS por PLA₂ Lys49, cataliticamente inativas, ainda precisam ser melhor investigados.

Continuando nossas investigações sobre o potencial antiangiogênico da MjTX-II, observamos que a toxina reduziu expressivamente a adesão e migração das HUVECs. Resultados semelhantes foram observados por Polloni e colaboradores em 2021 [20], onde a PLA₂ Lys49 BnSP-7, inibiu a adesão celular da linhagem HUVEC em diferentes concentrações e a migração em 24h através dos ensaios Wound-Healing e de Transwell. Em trabalho realizado por Kessentini-Zouari e colaboradores, 2010 [55], foi demonstrado que as PLA₂s CC-PLA2-1 e CC-PLA2-2, isoladas da peçonha de *Cerastes cerastes* inibiram significativamente a adesão de células endoteliais microvasculares de cérebro humano (HBMECs). Complementado o efeito antiangiogênico da MjTX-II, observamos a completa inibição da formação de vasos em modelo *in vitro*. Corroborando com nossos resultados, a PLA₂ Lys49 BnSP-7 também afeta a angiogênese *in vitro* [20].

Os mecanismos de inibição da adesão, migração e outros eventos importantes para a metástase e angiogênese tumoral de PLA₂ Lys49 isoladas da peçonha de serpentes ainda não foram totalmente elucidados. Embora essa classe de toxina não apresente atividade catalítica, parte dos efeitos citotóxicos apresentados por essas toxinas pode estar associado à interação da região C-terminal da molécula (115-129), composta por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos, com os fosfolipídeos da membrana causando danos à membrana celular [56-59]. Contudo, outros mecanismos de ação podem estar envolvidos nos efeitos antimetastáticos e antiangiogênicos dessa classe de toxinas, de maneira a complementar ou até mesmo potencializar seus efeitos, envolvendo ligação à diferentes proteínas da membrana da superfície celular, como por exemplo, receptores de PLA₂ tipo M, integrinas e receptor de VEGF [60, 61].

A MVL-PLA₂, uma PLA₂ Asp49 isolada da peçonha de *Macrovipera lebetina*, aboliu completamente a adesão celular das células de melanoma IGR39 e a migração de células de ficrosarcoma HT1080 através da modulação das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e αv em um mecanismo

independente da atividade catalítica da enzima [62]. Outro estudo demonstrou que as toxinas CC-PLA2-1 e CC-PLA2s, PLA₂s Asp49, derivadas da peçonha de *Cerastes cerastes* foram capazes de inibir completamente a formação de vasos *in vitro* utilizando células HBMECs, por meio da interferência das toxinas da função da integrina, afetando, portanto, a adesão às proteínas que constituem a MEC [55].

Buscando compreender os mecanismos relacionados à inibição da angiogênese induzida pela Lys49 MjTX-II, avaliamos a expressão gênica e proteica do VEGF. Nossos dados demonstram que a MjTX-II diminuiu a expressão gênica de VEGF-A. Corroborando com os dados expressão gênica, também foi observado que a MjTX-II também inibiu a produção proteica de VEGF. Sabe-se que, o bloqueio do VEGF permite a inibição da angiogênese e consequentemente do desenvolvimento tumoral [63, 64].

O VEGF A exibe importante relação com o crescimento e desenvolvimento de tumores, pois impulsionam o crescimento de novos vasos sanguíneos, permitindo o acesso dos tumores ao oxigênio e nutrientes que favorecem o crescimento tumoral [65]. Além disso, o VEGF A contribui para a proliferação, migração e invasão celular [66]. Seus efeitos fisiológicos ocorrem em decorrência da sua ligação com dois receptores específicos, o receptor de VEGF 2 (KDR) (principal mediador da ação do VEGF) e o receptor de VEGF 1 (VEGFR1) (regulador da sinalização do KDR) [67]. Ao se ligar aos receptores, o VEGF A induz a fosforilação do domínio tirosina quinase, de modo a ativar a sinalização de proteínas, como por exemplo a quinase, que quando ativada por enzimas atuam sobre a proliferação e migração celular [68]. É importante ressaltar que a expressão gênica e proteica de VEGF também foi observada em células de câncer de pulmão humanas (NSCLC) [69-71]. Sugerimos, então, que além de reduzir a expressão gênica e proteica de VEGF, a MjTX-II pode estar interferindo/interagindo diretamente com um receptor de VEGF, impossibilitando assim, a ação do mesmo em gatilhar a angiogênese.

Interessantemente, a KDR-bp, uma PLA₂-Lys49 homóloga isolada da peçonha de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, consiste em uma proteína de ligação ao receptor VEGF que se liga ao domínio extracelular de KDR, culminando no bloqueio do crescimento de células endoteliais gerado pelo VEGF [72]. Pllans-II, uma PLA₂ Asp49, isolada da peçonha de *Porthidium lansbergii lansbergii* também inibiu a angiogênese *in vitro* em células endoteliais HUVEC e aumentou a expressão proteica de VEGF [61].

A MjTX-II também modulou a expressão de outros importantes genes relacionados aos eventos da angiogênese, como ANGPT1 e SFLT-1. A diminuição da expressão gênica de ANGPT1 pode estar relacionada a inibição da angiogênese induzida pela MjTX-II. A angiopoietina-1 (ANGPT1) é um ativador do receptor tirosina quinase Tek (também denominado Tie2) expresso principalmente nas células endoteliais. A via de sinalização da angiopoietina-1 (Ang1)/Tie2 é conhecida por desempenhar um papel importante na regulação

da maturação vascular e na manutenção da integridade dos vasos [73]. O papel da Ang-1 na angiogênese e no crescimento tumoral parece ser altamente dependente do tipo específico de câncer. Alguns estudos mostram notável eficácia de vários inibidores específicos de Ang-1/Ang-2 e anticorpos neutralizantes no bloqueio da angiogênese e crescimento tumoral [74, 75]. Em um estudo realizado por Holopainen e colaboradores, 2009 [76] foi demonstrado que o tratamento com Ang1 administrado por meio de um vetor adenoviral promoveu o aumento dos vasos sanguíneos no tumor de pulmão e nos tecidos normais, o que aumentou a disseminação das células tumorais na circulação sanguínea e o estabelecimento de metástase [76]. Em outro estudo, foi demonstrado que a deficiência global de ANGPT1 resulta em aumento da metástase para o pulmão sem afetar o crescimento do tumor primário de mama. Curiosamente, ANGPT1 parece afetar principalmente os estágios finais do processo metastático, fixação e extravasamento [77].

A MjTX-II também induziu um aumento significativo da expressão do gene sFlt-1. A Fração solúvel do receptor VEGF 1 (sFlt-1) é um inibidor endógeno do VEGF que é produzido principalmente por células trofoblásticas e células endoteliais vasculares e é considerado um importante inibidor da angiogênese. Interessantemente, sFlt-1 inibe a proliferação, migração e invasão de células de câncer colorretal SW480, através da supressão da formação de mimetismo vascular [78].

Finalmente, a MjTX-II exibiu potente atividade antiangiogênica *ex vivo*, usando o modelo de ensaio de anel aórtico de camundongo. Ensaios desse tipo, seguindo o modelo de anel aórtico, permitem observar resultados fisiologicamente mais relevantes quando se comparado ao modelo *in vitro*, pois possibilitam a melhor compreensão do processo de angiogênese como um todo, uma vez que, o microambiente em estudo proporciona entender e associar processos importantes para a angiogênese, como a proliferação, migração celular, formação e remodelação dos vasos, através do recrutamento perivascular [22]. Em conjunto, estes resultados confirmam o potencial antiangiogênico da MjTX-II.

Corroborando com os nossos resultados, Ye e colaboradores em 2011 [27] demonstraram que a CrTX inibiu o crescimento do tumor A549 *in vivo* (modelo de xenoinxerto de tumor pulmonar) destruindo os vasos sanguíneos ao redor do xenoinxerto do tumor e reduzindo o nível de VEGF em comparação com o grupo de controle, sugerindo um efeito antiangiogênico. Em ensaio *in vivo* através do método de membrana corioalantóide de galinha (CAM), pesquisadores demonstraram que as PLA₂s CC-PLA2-1 e CC-PLA2-2 (1mM) reduziram o desenvolvimento de novos vasos [55].

Considerações finais

A MjTX-II isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi citotóxica para as células de câncer de pulmão A549 demonstrando uma preferência por alvos nessas células tumorais quando comparado com as células de pulmão não tumorigênicas. A toxina inibiu eventos moleculares (adesão, migração e invasão) importantes para a metástase tumoral das células A549, bem como interferiu no citoesqueleto das células, diminuindo o conteúdo de actina celular. Por fim, a MjTX-II interferiu no ciclo celular de células endoteliais, inibiu a angiogênese em modelos *in vitro* e *ex vivo*, diminuindo a liberação de VEGF e modulou a expressão de importantes genes relacionados ao processo de angiogênese. Assim, demonstramos o potencial antimetástático e antiangiogênico da MjTX-II, contribuindo para a compreensão do mecanismo de ação de PLA₂s isoladas da peçonha de serpentes no câncer de pulmão e seu uso como modelo farmacológico para terapia antitumoral.

REFERÊNCIAS

- [1]. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (2018) 394-424. <https://doi:10.3322/caac.21492>.
- [2]. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71 (2021) 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [3]. Tipos de câncer, Câncer de pulmão. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>, 2021 (acessado em 08 de novembro de 2021).
- [4]. D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (2011) 646-674. <https://doi:10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [5]. D. Hanahan, R.A. Weinberg, The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (2000)57-70. [https://doi:10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- [6]. T. Sorlie, Y. Wang, C. Xiao, H. Johnsen, B. Naume, R.R. Samaha, A.L. Borresen-Dale, Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms, *BMC Genomics*, 7 (2006) 127. <https://doi:10.1186/1471-2164-7-127>.
- [7] M. Reck, G. Shankar, A. Lee, S. Coleman, M. McClelland, V.A. Papadimitrakopoulou, M.A. Socinski, A. Sandler, Atezolizumab in combination with bevacizumab, paclitaxel and carboplatin for the first-line treatment of patients with metastatic non-squamous non-small cell lung cancer, including patients with EGFR mutations. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 14 (2020) 125-136. <https://doi:10.1080/17476348.2020.1701439>.
- [8]. M.S.L. Pinho, Angiogênese: O Gatilho Proliferativo, *Revista Brasileira de Coloproctologia*, 25 2005 396-402. ID: lil-421296.
- [9]. L.G. Presta, H. Chen, S.J. O'connor, V. Chisholm, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, N. Ferrara, Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research*, 57 (1997) 4593-4599. PMID: 9377574.
- [10]. X. Wan, X. Luo, C. Tan, X. Zeng, Y. Zhang, L. Peng, First-line atezolizumab in addition to bevacizumab plus chemotherapy for metastatic, nonsquamous non-small cell lung cancer: A United States-based cost-effectiveness analysis. *Cancer*, 125 (2019) 3526-3534. <https://doi:10.1002/cncr.32368>.
- [11]. C.P. Silva, T.R. Costa, R.M.A. Paiva, A.C.O. Cintra, D.L. Menaldo, L.M.G. Antunes, S.V. Sampaio, Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* Snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines, *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0044-5>.

- [12]. F.V.P.V. Azevedo, D.S. Lopes, S.N.C. Gimenes, D.C. Achê, L. Vecchi, P.T. Alves, D.O. Guimarães, R.S. Rodrigues, L.R. Goulart, V.M. Rodrigues, K.A.G. Yoneyama, Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom, *International Journal of Biological Macromolecules*, 82 (2016) 671–677. [https://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080).
- [13]. R.B. Benati, T.R. Costa, M.C. Cacemiro, S.V. Sampaio, F.A. Castro, S.M. Burin, 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. [https://doi: 10.1186/s40409-018-0180-9](https://doi.org/10.1186/s40409-018-0180-9).
- [14]. M.A. Silva, D.S. Lopes, S.C. Teixeira, S.N.C. Gimenes, F.V.V. Azevedo, L. Polloni, B.C. Borges, M.S. Silva, M.J. Barbosa, R.J. Oliveira Júnior, M.C. Elias, C.V. Silva, K.A.G. Yoneyama, V.M. Rodrigues, R.S. Rodrigues, Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys- 49 phospholipase A2 (PLA2) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118 (2018) 311-319. [https://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082).
- [15]. F. V. P. V. Azevedo, M.A.P. Zóia, D.S. Lopes, S.N. Gimenes, L. Vecchi, P.T. Alves, R.S. Rodrigues, A.C.A. Silva, K.A.G. Yoneyama, L.G. Goulart, V. de Melo Rodrigues, Antitumor and antimetastatic effects of PLA2-BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom on human breast cancer cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 135 (2019) 261–273. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.164.
- [16]. A.M. Soares, W.P. Sestito, S. Marcussi, R.G. Stábeli, S.H. Andrião- Escarso, .A. Cunha, C.A. Vieira, J.R. Giglio, Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (2004) 258-270. [https://doi: 10.1016/s1357-2725\(03\)00237-1](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00237-1).
- [17]. S.N.C. Gimenes, D.S. Lopes, P.T. Alves, S.V.P.V. Azevedo, L. Vecchi, L.R. Goulart, T.C.S. Rodrigues, A.L.Q. Santos, V.L.C. Brites, T.L. Teixeira, C.V. Silva, M.H. Dias, S.C. Teixeira, R.S. Rodrigues, K.A.G. Yoneyama, R.A.Oliveira, V.M. Rodrigues, Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell, *Scientific Reports*, 7 (2017) 70-77. [https://doi: 10.1038/s41598-017-07082-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07082-2).
- [18]. N.A. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2315–2319. [https://doi: 10.1038/nprot.2006.339](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339).
- [19]. S.C. Teixeira, B.C. Borges, V.Q. Oliveira, L.S. Carregosa, L.A. Bastos, I.A. Santos, A.C.G. Jardim, F.F. Melo, L.M. Freitas, V.M. Rodrigues, D.S. Lopes, Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms, *Int J Biol Macromol*, 164 (2020) 616-625. [https://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178).
- [20]. L. Polloni, F.V.P.V. Azevedo, S.C. Teixeira, E. Moura, T.R. Costa, S.N.C. Gimenes L.I.V. Correia, V. Freitas, K.A.G. Yoneyama, R.S. Rodrigues, D.S. Lopes, V.M. Rodrigues, Antiangiogenic effects of phospholipase A₂ Lys49 BnSP-7 from *Bothrops pauloensis* snake venom on endothelial cells: An in vitro and ex vivo approach, *Toxicol In Vitro*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105099>.
- [21] S.C. Teixeira, D.S. Lopes, S.N. Gimenes, T.L. Teixeira, M.S. da Silva, R.T. Brígido, F.A. da Luz, A.A da Silva, M.A. Silva, P.V. Florentino, P.C. Tavares, M.A. Dos Santos, V.M. Ávila, M.J. Silva, M.C. Elias, R.A. Mortara, C.V. da Silva, Mechanistic Insights into the Anti-

angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy, *Sci Rep*, 21 (2017) 44978. [https://doi: 10.1038/srep44978](https://doi.org/10.1038/srep44978).

[22]. M. Baker, S.D. Robinson, T. Lechertier, P.R. Barber, B.Tavora, G. D'amico, D.T. Jones, B. Vojnovic, K. Hodivala-Dilke, Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis, *Nature Protocols*, 7 (2011)89-104. [https://doi:10.1038/nprot.2011.435](https://doi.org/10.1038/nprot.2011.435).

[23]. A. Bazaa, J. Luis, N. Srairi-Abid, O. Kallech-Ziri, R. Kessentini-Zouari, C. Defilles, J.C. Lissitzky, M. El Ayeb, N. Marrakchi, MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina* transmediterranea venom, inhibits tumor cells adhesion and migration, *Matrix Biol*, 28 (2009) 188-193. [https://doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.007](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.03.007).

[24]. S.P. Muller, V.A.O. Silva, A.V.P. Silvestrini, L.H. de Macedo, G.F. Caetano, R.M. Reis, M.V. Mazzi, Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom: In vitro cytotoxic activity of a heterodimeric phospholipase A₂ on human cancer-derived cell lines, *Toxicon*, 156 (2018) 13-22. [https://doi: 10.1016/j.toxicon.2018.10.306](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.306).

[25]. V.N. Sumantran, Cellular chemosensitivity assays: an overview, *Methods Mol Biol*, 731 (2011) 219-36. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_19.

[26]. R. Han, H. Liang, Z.H. Qin, C.Y. Liu, Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38MAPK signaling pathway, *Acta Pharmacol Sin*, 35 (2014) 1323-32. [https://doi: 10.1038/aps.2014.62](https://doi.org/10.1038/aps.2014.62).

[27]. Bin.Ye, Y. Xie, Z.H. Qin, J.C. Wu, R. Han, J.K. He, Anti-tumor activity of CrTX in human lung adenocarcinoma cell line A549, *Acta Pharmacol Sin*, 32 (2011) 1397-401. doi: 10.1038/aps.2011.116. [https://doi: 10.1038/aps.2011.116](https://doi.org/10.1038/aps.2011.116).

[28]. C.J. Rudd, L.J. Viskatis, J.C. Vidal, M.A. Etcheverry, In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line, *Invest New Drugs*, 12 (1994) 183-184. [https://doi: 10.1007/BF00873958](https://doi.org/10.1007/BF00873958).

[29]. Junhua. Wang, X. Qin, Z. Zhang, M. Chen, Y. Wang, B. Gao, Crotoxin suppresses the tumorigenic properties and enhances the antitumor activity of Iressa® (gefitinib) in human lung adenocarcinoma SPCA-1 cells, *Mol Med Rep*, 10 (2014) 3009-14. [https://doi: 10.3892/mmr.2014.2620](https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2620).

[30]. K.W. Hunter, N.P. Crawford, J. Alsarraj, Mechanisms of metastasis, *Breast Cancer Res*, 10 (2008) Suppl 1(Suppl 1):S2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.602416>.

[31]. F.A. Urrea, R. Araya-Maturana, Targeting Metastasis with Snake Toxins: Molecular Mechanisms, *Toxins (Basel)*, 9 (2017) 390. [https://doi: 10.3390/toxins9120390](https://doi.org/10.3390/toxins9120390).

[32]. W. Longmate, C.M. DiPersio, Beyond adhesion: emerging roles for integrins in control of the tumor microenvironment, *F1000Res*, 6 (2017) 1612. [https://doi: 10.12688/f1000research.11877.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.11877.1).

[33]. F.G. Giancotti, E. Ruoslahti, Integrin signaling, *Science* 285 (1999) 1028–1032. [https://doi: 10.1126/science.285.5430.1028](https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1028).

[34]. G. Rádis-Baptista, Integrins, cancer and snake toxins (mini-review), *Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 11 (2005) 217-241, doi. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992005000300002>

[35]. A. Bazaa, E. Pasquier, C. Defilles, I. Limam, R. Kessentini-Zouari, O. Kallech-Ziri, A. El Battari, D. Braguer, M. El Ayeb, N. Marrakchi, J. Luis, MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and

- disorganization of focal adhesions, *PLoS One*, 5 (1999) e10124. <https://doi:10.1371/journal.pone.0010124>.
- [36]. J. Pathan, S. Mondal, A. Sarkar, D. Chakrabarty, Daboialectin, a C-type lectin from Russell's viper venom induces cytoskeletal damage and apoptosis in human lung cancer cells in vitro, *Toxicon*, 127 (2017) 11-21. <https://doi:10.1016/j.toxicon.2016.12.013>.
- [37]. I.B. Oliva, R.M. Coelho, G.G. Barcellos, R. Saldanha-Gama, L.S. Wermelinger, C. Marcinkiewicz, R. Benedeta Zingali, C. Barja-Fidalgo, Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos, *Toxicon*, 50 (2007) 1053-63. <https://doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.016>.
- [38]. J. Folkman, Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Semin Oncol*, (6 Suppl 16) (2002) 15-8. <https://doi:10.1053/sonc.2002.37263>.
- [39]. N.H. NISHIDA, T. YANO, T. NISHIDA, M. KAMURA, M. KOJIRO, Angiogenesis in Cancer, *Vascular Health and Risk Management*, 2 (2006) 213-219. <https://doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.213>.
- [40]. J. Folkman J, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat Med*, 1 (1995) 27-31. <https://doi:10.1038/nm0195-27>.
- [41]. K.K. Hirschi, P.A. D'Amore, Pericytes in the microvasculature, *CardiovascRes*, 32 (1996) 687-98. PMID: 8915187.
- [42]. D.G. Stupack, D.A. Cheresh, Integrins and angiogenesis, *Curr Top Dev Biol*, 64 (2004) 207–238. [https://doi:10.1016/S0070-2153\(04\)64009-9](https://doi:10.1016/S0070-2153(04)64009-9).
- [43]. R.N. ANTOLIKOVA, M. KELLO, M. ZIGOVA, V. TISCHLEROVA, V. PETRILLA, Z. PIRNIK, G. MOJZISOVA, J. MOJZIS, Naja ashei venom induces mitochondria-mediated apoptosis in human colorectal cancer cells, *Acta Biochimica Polonica*, 66 (2019) 207-213. https://doi:10.18388/abp.2018_2779.
- [44]. L. Polloni L, A.C. Seni Silva, S.C. Teixeira, F.V.P.V. Azevedo, M.A.P. Zóia, M.S. da Silva, P.M.A.P. Lima, L.I.V. Correia, J. do Couto Almeida J, C.V. da Silva, V.M. Rodrigues Ávila, L.R.F. Goulart, S. Morelli, W. Guerra, R.J. Oliveira Júnior, Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death, *Biomed Pharmacother*, 112 (2019) 108586. <https://doi:10.1016/j.biopha.2019.01.047>.
- [45]. M. Kajstura, H.D. Halicka, J. Pryjma, Z. Darzynkiewicz, Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms, *Cytometry*, 71 (2007) 125–131. <https://doi:10.1002/cyto.a.20357>.
- [46]. C. Riccardi, I. Nicoletti, Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Nat. Protoc*, 1 (2006) 1458–1461.
- [47]. K.C. Chen, P.H. Kao, S.R. Lin, L.S. Chang, Upregulation of Fas and FasL in Taiwan cobra phospholipase A2-treated human neuroblastoma SK-N-SH cells through ROS- and Ca²⁺-mediated p38 MAPK activation, *J Cell Biochem*, 106 (2009) 93-102. <https://doi:10.1002/jcb.21979>.
- [48]. B. Perillo, M. D Donato, A. Pezone, E. Di Zazzo, P. Giovannelli, G. Galasso, G. Castoria, A. Migliaccio, ROS in cancer therapy: the bright side of the moon, *Exp Mol Med*, 52 (2020) 192-203. <https://doi:10.1038/s12276-020-0384-2>.

- [49]. L.A. Rowe, N. Degtyareva, P.W. Doetsch, DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*, *Free Radic Biol Med*, 45 (2008) 1167-77. [https://doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.018](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.018).
- [50]. S. Joshi-Barr, C. de Gracia Lux, E. Mahmoud, A. Almutairi, Exploiting oxidative microenvironments in the body as triggers for drug delivery systems, *Antioxid Redox Signal*, 21 (2014) 730-54. [https://doi: 10.1089/ars.2013.5754](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5754).
- [51]. S. W. Lowe, A.W. Lin, Apoptosis in cancer, *Carcinogenesis*, 21 (2000) 485-95. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.485>.
- [52]. G.Y. Liou, P. Storz, Reactive oxygen species in cancer, *Free Radic Res*, 44 (2010) 479-96. [https://doi: 10.3109/10715761003667554](https://doi.org/10.3109/10715761003667554).
- [53]. H.U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, 5 (2000) 415-8. [https://doi: 10.1023/a:1009616228304](https://doi.org/10.1023/a:1009616228304).
- [54]. N. Shivapurkar, J. Reddy, P.M. Chaudhary, A.F. Gazdar, Apoptosis and lung cancer: a review, *J Cell Biochem*, 88 (2003) 885-898. [https://doi: 10.1002/jcb.10440](https://doi.org/10.1002/jcb.10440).
- [55]. R. Kessentini-Zouari, J. Jebali, S. Taboubi, N. Srairi-Abid, M. Morjen, O. Kallech-Ziri, S. Bezzine, J. Marvaldi, M. El Ayeb, N. Marrakchi, J. Luis, CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2, two *Cerastes cerastes* venom-derived phospholipases A2, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo, *Lab Invest*, 90 (2010) 510-9. [https://doi: 10.1038/labinvest.2009.137](https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.137).
- [56]. L.C. Gebrim, S. Marcussi, D.L. Menaldo, C.S.R. Menezes, A. Nomizo, A. Hamaguchi, E. P. Silveira-Lacerda, M.I. Homsí-Brandeburgo, S.V. Sampaio, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region, *Biologicals*, 37 (2009) 222-229. [https://doi: 10.1016/j.biologicals.2009.01.010](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.010).
- [57]. C. Araya, B. Lomonte, Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms, *Cell Biology International*, 3 (2007) 263-8. [https://doi: 10.1016/j.cellbi.2006.11.007](https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.11.007).
- [58]. R.G. Stábeli, S.F. Amui, C.D. Sant'ana, M.G. Pires, A. Nomizo, M. C. Monteiro, P.R.T. Romão, R. Guerra-Sá, C.A. Vieira, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, A.M. Soares, Bothrops moojeni myotoxin- II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142 (2006) 371-381. [https://doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.020](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.020).
- [59]. B. Lomonte, Y. Angulo, L. Calderón, An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action, *Toxicon*, 42 (2003) 885-901. [https://doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.008](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.008).
- [60]. Y. Yamazaki, Y. Tokunaga, K. Takani, T. Morita, C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation, *Pathophysiol Haemost Thromb*, 34 (2005) 197-9. [https://doi: 10.1159/000092423](https://doi.org/10.1159/000092423).
- [61]. E. Jiménez-Charris, D.S. Lopes, S.N.C. Gimenes, S.C. Teixeira, L. Montealegre-Sánchez, L. Solano-Redondo, L. Fierro-Pérez, V.M. Rodrigues Ávila, Antitumor potential of Pllans-II, an acidic Asp49-PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells, *Int J Biol Macromol*, 122 (2019) 1053-1061. [https://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053).
- [62]. A. Bazaa, J. Luis, N. Srairi-Abid, O. Kallech-Ziri, R. Kessentini-Zouari, C. Defilles, J.C.

Lissitzky, M. El Ayeb, N. Marrakchi, MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina* transmediterranea venom, inhibits tumor cells adhesion and migration, *Matrix Biol*, 28 (2009) 188-93. <https://doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.007>.

[63]. N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocr. Rev*, 25 (2004) 581–611. <https://doi: 10.1210/er.2003-0027>.

[64]. E.W. Ng, D.T. Shima, P. Calias, Jr. E.T. Cunningham, D.R. Guyer, A.P. Adamis, Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov*, 5 (2006) 123–132. <https://doi: 10.1038/nrd1955>.

[65]. G. Bergers, L.E. Benjamin, Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat Rev Cancer*, 3 (2003) 401–410. <https://doi: 10.1038/nrc1093>.

[66]. L.M. Ellis, D.J. Hicklin, VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity, *Nat Rev Cancer*, 8 (2008) 579-591. <https://doi: 10.1038/nrc2403>.

[67]. K.A.Thomas, Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent, *J Biol Chem*, 271 (1996) 603–606. <https://doi: 10.1074/jbc.271.2.603>.

[68]. M. Kowanz, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective, *Clin Cancer Res*, 12 (2006) 5018–5022. <https://doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1520>.

[69]. H. Li, K. Takayama, S. Wang, Y. Shiraishi, K. Gotanda, T. Harada, K. Furuyama, E. Iwama, I. Ieiri, I. Okamoto, Y. Nakanishi. Addition of bevacizumab enhances antitumor activity of erlotinib against non-small cell lung cancer xenografts depending on VEGF expression, *Cancer Chemoth Pharm*, 74 (2014) 1297–1305. doi: 10.1007/s00280-014-2610-x.

[70]. C. Holm, D. Gineitis, G. McConville G, A. Kazlauskas, Expression of PDGF, VEGF and their receptors in non-small cell lung tumor cell lines, *Int J Oncol*, 9 (1996) 1077–1086. <https://doi: 10.3892/ijo.9.5.1077>.

[71]. Y. Ohta, Y. Endo, M. Tanaka, J. Shimizu, M. Oda, Y. Hayashi, Y. Watanabe, T. Sasaki, Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer, *Clin Cancer Res*, 2 (1996) 1411–1416. PMID: 9816315.

[72]. D. Fujisawa, Y. Yamazaki, B. Lomonte, T. Morita, Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region, *Biochem J*, 411 (2008) 515-22. <https://doi: 10.1042/BJ20080078>.

[73]. L. Eklund, P. Saharinen, Angiopoietin signaling in the vasculature, *Exp Cell Res*, 319 (2013) 1271–80. <https://doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.011>.

[74]. J. Neal, H. Wakelee, AMG-386, a selective angiopoietin-1/-2-neutralizing peptibody for the potential treatment of cancer, *Curr. Opin. Mol. Ther*, 12 (2010) 487–495. PMID: 20677100.

[75]. M.R. Machein, A. Knedla, R. Knoth, S. Wagner, E. Neuschl, K.H. Plate, Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model, *Am. J. Pathol*, 165 (2004) 1557–1570. [https://doi: 10.1016/S0002-9440\(10\)63413-X](https://doi: 10.1016/S0002-9440(10)63413-X).

[76]. Holopainen T, Huang H, Chen C, Kim KE, Zhang L, Zhou F, Han W, Li C, Yu J, Wu J, Koh GY, Alitalo K, He Y. Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment. *Cancer Res*. 69 (2009) 4656-64. <https://doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4654>.

[77]. I.P. Michael, M. Orebrand, M. Lima, B. Pereira, O. Volpert, S.E. Quaggin, M. Jeansson, Angiopoietin-1 deficiency increases tumor metastasis in mice, *BMC Cancer*, 17 (2017) 539.

[78]. W. Jinjun, W. Zhaowei, L. Qiang, X. Zhijun, Z. Juanzi, L. Lin, J. Guixi J, sFLT-1 inhibits proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer SW480 cells through vascular mimicry formation suppression, *Tumour Biol*, 39 (2017) 1010428317698339. <https://doi:10.1177/1010428317698339>.

