

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Ariani Rodrigues Aragão

Caracterização do potencial antitumoral de peptídeos análogos ao peptídeo (p-
BthTX-I)₂

Araraquara
2023

Ariani Rodrigues Aragão

Caracterização do potencial antitumoral de peptídeos análogos ao peptídeo (p-BthTX-I)₂

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Norival A. Santos-Filho

Araraquara

2023

A659c Aragão, Ariani Rodrigues
Caracterização do potencial antitumoral de peptídeos
análogos ao peptídeo (p-BthTX-I)₂ / Ariani Rodrigues Aragão. --
Araraquara, 2023
35 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química,
Araraquara
Orientador: Norival Alves Santos Filho

1. Fosfolipase A2. 2. Peptídeos. 3. Peptídeos - síntese. 4.
Agentes antineoplásicos. 5. Células cancerosas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ariani Rodrigues Aragão

Caracterização do potencial antitumoral de peptídeos análogos ao peptídeo (p-BthTX-I)₂.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Química.

Araraquara, 30 de novembro de 2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **NORIVAL ALVES SANTOS FILHO**
Data: 06/12/2023 14:12:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Norival Alves Santos-Filho

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA ZANOLLI FREITAS**
Data: 06/12/2023 14:06:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Fernanda Zanolli Freitas

Documento assinado digitalmente
 **SAULO SANTESSO GARRIDO**
Data: 06/12/2023 13:56:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente meus pais, Arlete e César, e meus avós, Noemia e Jonas, por todo apoio desde sempre.

Ao professor Norival, gostaria de agradecer pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Síntese e Estudo de Biomoléculas, pela confiança e atenção.

Agradeço a todos do Lasebio, em especial à doutoranda Letícia e à mestranda Louise, por toda ajuda, atenção e conversas.

Agradeço ao Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular, em especial à Profa. Dra. Valéria Valente pela parceria.

Aos meus amigos pelo apoio e companhia. Os que trouxe da vida, especialmente Junior e Gabriela, por sempre me ouvirem e me incentivarem a seguir em frente, mesmo com dificuldades. Os que conheci no Instituto de Química e foram meus parceiros de todas as horas, pós provas, festas e desabafos, em especial meus companheiros de todos os almoços e tardes, Eloá, Gabriel e Marina, passar esse tempo com vocês deixou meus últimos anos mais leves. E à República Big Mato, por ser minha casa por quatro anos, um espaço para compartilhar tudo. Sem todos vocês, com certeza esse caminho seria muito mais difícil.

Ao meu namorado, que desde meu primeiro ano me apoiou em tudo, inclusive na fase de escrita desse trabalho, por sempre me acalmar e incentivar a ser melhor cada vez mais.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET), que fiz parte por dois anos e oito meses como bolsista, muito do que aprendi e evolui nesse período de graduação devo ao grupo, que tenho muito orgulho de fazer parte.

Agradeço à banca, Profa. Dra. Fernanda Zanolli Freitas e Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido, por aceitarem meu convite.

RESUMO

O estudo das toxinas encontradas em venenos de animais tem se mostrado relevante por possibilitar a aplicação dessas moléculas no desenvolvimento de novos fármacos como estratégias terapêuticas para diversas doenças. Na composição de veneno das serpentes há uma classe de enzimas chamadas fosfolipases A₂, que são divididas em grupos, um desses grupos possui uma substituição de aspartato por lisina no resíduo de aminoácido na posição 49, chamadas Lys⁴⁹ fosfolipases A₂ homólogas que não possuem ação catalítica, mas demonstram outras atividades, como ação antimicrobiana. Sabe-se que o câncer é uma das maiores causas de morte no mundo atualmente e o tratamento se torna um desafio, visto que as terapias tradicionais como quimioterapia e radioterapia causam diversos efeitos colaterais, além da possibilidade do desenvolvimento de resistência das células tumorais. Dessa forma, a busca por agentes antitumorais cresce cada vez mais. Os peptídeos antitumorais surgem como uma alternativa interessante, sendo ferramenta promissora na pesquisa. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi determinar o potencial antitumoral de moléculas análogas ao peptídeo (p-BthTX-I)₂, os peptídeos de código LC2202, LC2203, GB2203, GB2207, GB2211 e GB2214, em linhagens de adenocarcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e células não tumorais de pulmão (MRC-5). Para tanto, realizou-se a síntese de peptídeos em fase sólida e a purificação do peptídeo GB2214, os demais peptídeos foram doados por membros do grupo de pesquisa. Depois, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Os resultados indicam que a maioria dos peptídeos não são citotóxicos para as linhagens celulares, principalmente em concentrações menores. GB2207 e GB2214 se destacam por apresentarem toxicidade para a célula não tumoral em altas concentrações, além disso, GB2207 também apresenta toxicidade para as linhagens tumorais de pulmão e mama, nas concentrações mais altas. Com isso, espera-se que os resultados possam contribuir com perspectivas para novos estudos em desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: peptídeos antitumorais; fosfolipase A₂; Lys⁴⁹ PLA₂ homóloga; (p-BthTX-I)₂.

ABSTRACT

The study of toxins found in animal venoms has proven to be relevant by enabling the application of these molecules in the development of new drugs as therapeutic strategies for various diseases. In the composition of snake venom, there is a class of enzymes called phospholipases A₂, which are divided into groups. One of these groups has a substitution of aspartate for lysine at amino acid residue position 49, called Lys⁴⁹ phospholipases A₂ homologues, which do not have catalytic action but demonstrate other activities, such as antimicrobial action. It is known that cancer is one of the leading causes of death in the world today, and treatment becomes a challenge, as traditional therapies such as chemotherapy and radiotherapy cause various side effects, in addition to the possibility of developing resistance of tumor cells. Thus, the search for antitumor agents is growing. Antitumor peptides emerge as an interesting alternative, being a promising tool in research. Therefore, the aim of this study was to determine the antitumor potential of molecules analogous to the peptide (p-BthTX-I)₂, the peptides with codes LC2202, LC2203, GB2203, GB2207, GB2211, and GB2214, in lung adenocarcinoma (A549), breast adenocarcinoma (MCF-7), and non-tumor lung cells (MRC-5) cell lines. For this purpose, the solid-phase synthesis of peptides was carried out, along with the purification of the peptide GB2214, the remaining peptides were donated by members of the research group. Subsequently, a cell viability assay was performed using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) technique. The results indicate that most peptides are not cytotoxic to the cell lines, especially at lower concentrations. GB2207 and GB2214 stand out for showing toxicity to non-tumor cells at high concentrations, furthermore, GB2207 also exhibits toxicity to lung and breast tumor cell lines at higher concentrations. Thus, it is hoped that the results can contribute to perspectives for new studies in the development of new drugs.

Keywords: antitumor peptides; Lys⁴⁹ PLA₂ homologue; phospholipase A₂; (p-BthTX-I)₂.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	(A): Estrutura terciária da PLA ₂ BthTX-I. (B): Representação da região C-terminal de BthTX-I, correspondente aos aminoácidos 115–129. (C): Representação da dimerização do peptídeo p-BthTX-I através da oxidação dos resíduos de cisteína.....	17
Figura 2 –	Esquema da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS).....	21
Figura 3 –	Perfil cromatográfico do peptídeo GB2214 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B por 30 minutos.....	25
Figura 4 –	Perfil cromatográfico do peptídeo GB2214 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B por 30 minutos.....	26
Figura 5 –	Espectro de massas do peptídeo GB2214 puro.....	27
Figura 6 –	Avaliação da viabilidade celular da linhagem MRC-5 em 24h de tratamento com os peptídeos.....	28
Figura 7 –	Avaliação da viabilidade celular da linhagem A549 em 24h de tratamento com os peptídeos.....	29
Figura 8 –	Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 em 24h de tratamento com os peptídeos.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAC	Peptídeo anticancer
PAM	Peptídeo antimicrobiano
FDA	Food and Drug Administration
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Cys	Cisteína
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Peptídeos derivados de venenos animais	12
1.2	Câncer	13
1.3	Peptídeos bioativos	15
2	OBJETIVO	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Síntese do peptídeo	20
3.2	Purificação e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	21
3.3	Espectrometria de massas	22
3.4	Avaliação da viabilidade celular	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Síntese do peptídeo	24
4.2	Purificação e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	25
4.3	Espectrometria de massas	26
4.4	Avaliação de viabilidade celular	27
5	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade existe um fascínio por animais venenosos, o que possibilitou estudos sobre os venenos animais como escorpiões, abelhas, aranhas, sapos, serpentes, entre outros, que vivem espalhados pelo mundo todo.

Os venenos animais possuem uma gama de moléculas complexas e bioativas, como proteínas, enzimas e peptídeos, com propriedades de interesse biológico, que podem ser estudadas para a obtenção de novos fármacos (El-Aziz *et al.*, 2019), grande exemplo é o anti-hipertensivo Captopril, o primeiro fármaco à base de toxinas animais a ser aprovado em 1981 pela FDA (Food and Drug Administration) e um dos mais utilizados do mundo no tratamento de hipertensão, produto de um peptídeo potencializador da bradicinina (BPP) derivado do veneno da *Bothrops jararaca*, uma serpente brasileira (Cushman; Ondetti, 1991; Ferreira, 1965).

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde, 2023), o número de pessoas que sofrem acidentes ofídicos no mundo pode chegar a até 5,4 milhões por ano, sendo que de 1,8 a 2,7 milhões desenvolvem doenças e entre 81 e 138 mil morrem por complicações. A maioria dos casos de morte ocorrem no Sul e Sudeste da Ásia e na África Subsaariana. Na América Latina, as serpentes do gênero *Bothrops*, da Família Viperidae são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos (dos Santos *et al.*, 2011). No Brasil, as regiões em que há maior incidência desses acidentes são Norte e Centro-Oeste, os meses de maior frequência são os quentes e chuvosos e a população rural é a mais afetada, segundo o Ministério da Saúde (2023).

Entre os principais problemas causados pela picada dessas serpentes estão danos teciduais proeminentes como inchaços, hemorragias e mionecroses, podendo levar a sérias complicações, como a amputação do membro afetado (Borges *et al.*, 2021).

1.1 Peptídeos derivados de venenos animais

As miotoxinas são importantes componentes naturais encontrados nos venenos de animais, geralmente são pequenas proteínas e peptídeos, que podem causar danos irreversíveis ao tecido muscular. Algumas miotoxinas atuam de maneira localizada, afetando apenas o local de injeção e os arredores, outras podem causar

danos também em locais distantes (Lomonte *et al.*, 2003). As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são uma das classes mais abundantes em venenos de serpentes (Santos-Filho *et al.*, 2008). São enzimas presentes no metabolismo dos fosfolipídios, também participam de diversas funções celulares, como a manutenção de fosfolipídios celulares, proliferação celular e contração muscular, além de estarem envolvidas no processo inflamatório humano (Santos-Filho *et al.*, 2015).

As PLA₂s são divididas em diversos grupos, as que são presentes no veneno das serpentes pertencem a dois grupos, que possuem relação evolutiva, porém apresentam estruturas diferentes, sendo eles o grupo IA, da Família Elapidae e o grupo IIA, da Família Viperidae. O segundo grupo pode ser dividido em subgrupos diferenciados pelo resíduo de aminoácido encontrado na posição 49, que comumente contém aspartato (Asp49 PLA₂) e os homólogos, que apresentam lisina na posição 49 (Lys⁴⁹ PLA₂). O primeiro subgrupo possui ação catalítica e o segundo não (Lomonte *et al.*, 2010).

Essa classe de enzimas pode desempenhar uma variedade de efeitos biológicos, como a necrose muscular, a maior causa de complicações nos sobreviventes de picada de serpentes, que é causado predominantemente pelas PLA₂s (Lomonte *et al.*, 2010). As Lys⁴⁹ PLA₂s homólogas, apesar de enzimaticamente inativas, desempenham atividades por meio de um mecanismo que independe de ação catalítica, como atividades miotóxicas e antimicrobianas (Tonello *et al.*, 2012).

Diversas PLA₂s foram descritas na literatura e pesquisou-se a fim de identificar a região responsável pela toxicidade dessas moléculas, identificando um sítio de ligação à heparina, na região do C-terminal, que poderia ser capaz de replicar tanto a ação miotóxica, quanto a antimicrobiana (Lomonte *et al.*, 1994). Tendo como base as estruturas primárias desses homólogos, diversos peptídeos catiônicos já foram sintetizados e obtiveram eficácia antibacteriana, antifúngica e antitumoral, sendo uma opção viável para tratamentos terapêuticos.

1.2 Câncer

Câncer é o nome dado para a um grande grupo de doenças que pode acometer diversas partes do corpo, surge a partir de fatores genéticos e epigenéticos, que alteram a composição genética e levam ao crescimento celular descontrolado. A maior

causa de morte associada ao câncer é o processo chamado de metástase, que é quando o crescimento desordenado das células anormais passa a invadir outros tecidos e órgãos vizinhos (Kalita; Saviola; Mukherjee, 2021).

Câncer é uma das maiores causas de morte no mundo. Segundo a IARC (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, 2023), foi responsável por aproximadamente 10 milhões de mortes no ano de 2020. No mundo, uma em cada cinco pessoas pode desenvolver câncer durante a vida. No Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer, 2023), há uma estimativa de cerca de 700 mil novos casos por ano entre 2023 e 2025. Os dados demonstram que 70% das mortes por câncer no mundo ocorrem em países de baixa e média renda, atrelado ao fato de que um em cada três países conseguem comunicar dados de qualidade, a fim de conduzir uma política de prevenção, tratamento e suporte. Dadas as estatísticas, o câncer se torna um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI.

Existem possibilidades de tratamento tradicionais de câncer que vão depender de um diagnóstico correto, pois cada tipo de doença tem um tratamento específico, seja por meio de cirurgia, imunoterapia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação de dois ou mais. (Offor, *et al.*, 2023).

A quimioterapia é o tratamento tradicional mais utilizado em diversos tipos de câncer. Utiliza-se compostos químicos que acometem as células cancerígenas, causando diversos efeitos colaterais problemáticos, além de possuir baixa seletividade, podendo acometer também células normais, ao longo do tempo pode induzir a resistência (Aljabery, *et al.*, 2018). A radioterapia também pode resultar em sérios efeitos colaterais, como deficiências hormonais. O tratamento com imunoterapia é mais seletivo e com menos efeitos colaterais que quimioterapia e radioterapia, porém, pode ocasionar alterações no sistema imune (Kalita; Saviola; Mukherjee, 2021).

Um dos maiores desafios e limitações do tratamento de câncer é o desenvolvimento de células cancerígenas resistentes e efeitos adversos, dessa forma, pesquisadores de todo o mundo trabalham assiduamente em busca de novos agentes anticâncer mais efetivos.

1.3 Peptídeos bioativos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas pequenas, compostas de 10 a 40 resíduos de aminoácidos, sendo em sua maioria, catiônicos, anfipáticos e hidrofóbicos, podendo possuir ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral e analgésica (TOKE, 2005).

Os peptídeos com ação antitumoral são chamados de PACs (peptídeos anticâncer). Os mecanismos de ação dos PACs podem ser extracelulares e intracelulares. A maior diferença entre células tumorais e não tumorais é a constituição da membrana celular, células tumorais possuem uma membrana celular com caráter mais negativo, devido aos fosfolipídios que a constituem. No geral, os PACs são catiônicos e detectam células cancerígenas através de interação eletrostática com os fosfolipídios. Existem inúmeras vantagens na utilização de PACs quando comparados a tratamentos tradicionais, incluindo o amplo espectro de ação, baixa indução de resistência, alta especificidade, seletividade, não induzindo efeitos colaterais, além da fácil síntese através da SPFS (Síntese de Peptídeos em Fase Sólida) (Kordi, *et al.*, 2023).

Na literatura há diversos exemplos de peptídeos derivados da região C-terminal das Lys⁴⁹ PLA₂s homólogas, destacando peptídeos derivados de: miotoxina II (Mt-II) de *Bothrops asper* (Gutiérrez; Ownby; Odell, 1984); bothropstoxina I (BthTX-I) de *Bothrops jararacussu* (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988); A K49 fosfolipase A₂ (AppK) de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Maraganore; Heinrikson, 1986) e a miotoxina de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (ACL) (Johnson; Ownby, 1993).

O peptídeo de sequência KKYRYYLKPLCKK derivado da miotoxina Mt-II de *Bothrops asper* demonstrou uma variedade de atividades biológicas, como ação antitumoral e a reprodução de um potencial antibacteriano semelhante ao da molécula parental *in vitro*, que ocorre através de um mecanismo envolvendo permeabilização de membrana (Lomonte *et al.*, 2010; Santamaria *et al.* 2005). Com o intuito de aumentar a atividade antimicrobiana do peptídeo, unindo com a menor toxicidade contra células eucarióticas, foram testadas diversas modificações na sequência de aminoácidos, denominadas pEM-1 até pEM-10, o análogo pEM-2 (sequência KKWRWWLKALAKK) demonstrou maior potência e especificidade contra procariotos (Santamaria *et al.* 2005). A partir disso, outro estudo analisou a ação antitumoral do

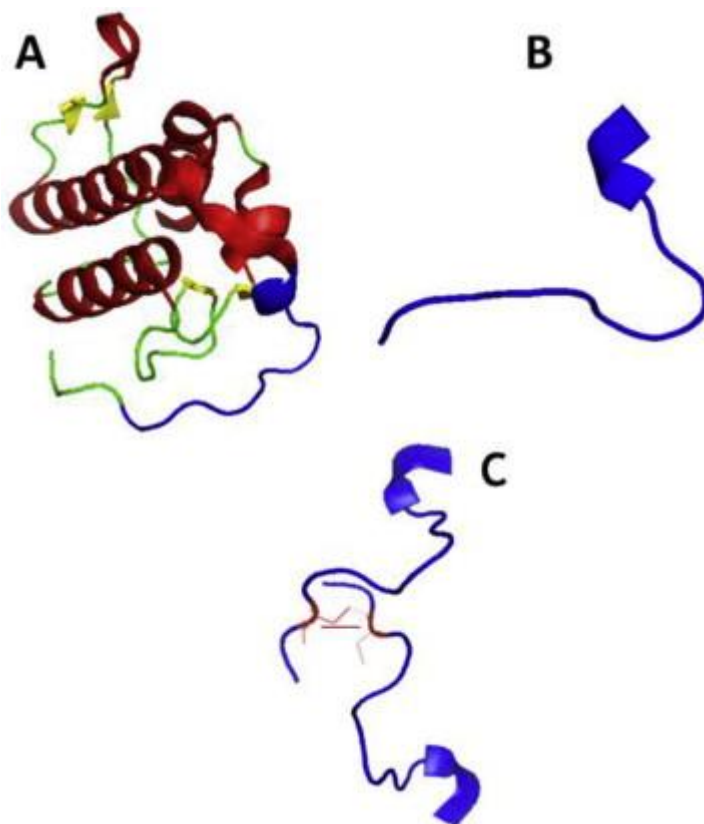
análogo pEM-2 (enantiômero D), que demonstrou ação inibitória satisfatória sobre tumores mamários EMT6 em camundongos (Araya; Lomonte, 2007).

O peptídeo p-AppK (sequência KKYKAYFKLKCKK) (Nunéz; Angulo; Lomonte, 2001) é outra molécula de interesse, em um estudo sobre atividade antitumoral, p-AppK demonstrou ação *in vitro* em células de melanoma B16, carcinoma mamário EMT6, sarcoma S-180, mieloma P3X, endoteliais tEnd. Quando comparado com o peptídeo pEM-2, a atividade do p-AppK foi maior. (Araya; Lomonte, 2007).

O peptídeo p-Ac1 (sequência KKYKAYFKFKCKK) (Ambrosio *et al.*, 2005) proveniente do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, possui uma sequência muito parecida com o peptídeo p-AppK, diferindo em apenas um resíduo de aminoácido na posição 9, p-Ac1 possui um resíduo de fenilalanina enquanto o p-AppK possui uma leucina. Em estudos, p-Ac1 e um análogo p-Ac1R7 (sequência RRYRAYFRFCRR), demonstraram potencial leishmanicida contra *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* (Mendes *et al.*, 2019). Em estudo comparando as atividades antimicrobianas dos peptídeos p-AppK e p-Ac1, tem-se que o p-Ac1 demonstrou uma atividade mais significativa contra bactérias Gram-positivas e algumas linhagens de células tumorais, como MG63 e HOS. O que indica que a substituição de leucina por fenilalanina resulta em diferenças significativas na atividade desses peptídeos (Almeida *et al.*, 2022).

O peptídeo p-BthTX-I (sequência KKYRYHLKPFCKK) derivado da região C-terminal da bothropstoxina I demonstrou ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias multirresistentes, não apresentou atividade contra *Candida albicans*. Em solução a forma monomérica demonstrou sofrer oxidação, gerando sua forma dimérica, (p-BthTX-I)₂, formada pela ligação dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (Figura 1). O dímero apresentou uma ação antibacteriana ainda maior (Santos-Filho *et al.*, 2015, 2017). Com o objetivo de facilitar a obtenção do dímero Santos-Filho *et al.* promoveu a dimerização através de um resíduo de lisina como ponto de ramificação, gerando o peptídeo [des-Cys¹¹, Lys¹², Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K] de sequência (KKYRYHLKPF)₂K, o análogo que apresentou maior atividade antimicrobiana, além de não apresentar toxicidade para eucariotos. Além disso, a molécula e análogos demonstraram atividade antiviral contra SARS-CoV-2, o agente causador da COVID-19, aliado a baixa citotoxicidade e índices de seletividade interessantes (Freire *et al.*, 2021).

Figura 1: (A): Estrutura terciária da PLA2 BthTX-I. (B): Representação da região C-terminal de BthTX-I, correspondente aos aminoácidos 115–129. (C): Representação esquemática da dimerização do peptídeo p-BthTX-I através da oxidação dos resíduos de cisteína.



Fonte: Santos-Filho *et al.*, 2015

Com base nos relatos sobre a atividade antitumoral de peptídeos catiônicos, nesse estudo tem-se o objetivo de avaliar se peptídeos sintéticos derivados da região C-terminal de Lys⁴⁹ PLA₂s homólogos de venenos de serpentes, contendo modificações propostas por Santos-Filho *et al.*, seguindo a molécula [des-Cys¹¹, Lys¹², Lys¹³ -(p-BthTX-I)₂K] como modelo, poderiam ter ação antitumoral. Com essa finalidade, foram selecionadas as sequências: proteína ACL de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Mendes *et al.*, 2019); A K49 fosfolipase A2 (AppK) de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Nunéz; Angulo; Lomonte, 2001) e miotoxina II de *Bothrops asper* (Lomonte *et al.*, 1994), além de um peptídeo original da miotoxina II, pEM-2, que foi otimizado com o intuito de aumentar a capacidade antimicrobiana (Santamaria *et al.*, 2005). Essas moléculas foram escolhidas por serem peptídeos bem descritos na literatura. Dessa forma, neste estudo os análogos sintéticos baseados em [des-

Cys¹¹, Lys¹², Lys¹³ -(p-BthTX-I)₂K] foram doados, sendo realizada a síntese de um deles, para avaliar e comparar suas atividades antitumorais *in vitro*.

Visto que o câncer é uma das doenças que mais mata mundialmente e que há desafios e limitações no tratamento, principalmente a indução à resistência das células cancerígenas, o presente trabalho visa avaliar o potencial antitumoral de peptídeos, que surgem como uma alternativa viável para novos tratamentos mais eficazes, principalmente devido ao amplo espectro de ação e baixa indução de resistência. Dessa forma, espera-se que os resultados deste trabalho possam contribuir para estudos futuros para o desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos no tratamento de câncer, com o objetivo de diminuir a mortalidade associada.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar a atividade antitumoral de análogos dos peptídeos MtlI, pEM-2, p-Ac1 e p-AppK, baseados nas modificações propostas por Santos-Filho *et al.* Em linhagens celulares A549 (adenocarcinoma de pulmão) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e não tumoral MRC-5 (fibroblasto de pulmão). Os peptídeos de trabalho estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Dados os peptídeos de trabalho.

Código do peptídeo	Sequência	Massa molar (g/mol)
GB2203	(KKYRYYLKPL) ₂ K	2852,51
GB2207	(KKWRWWLKAL) ₂ K	2938,65
GB2211	(KKYKAYFKFK) ₂ K	2810,47
GB2214	(KKYKAYFKLK) ₂ K	2742,44
LC2202	(KKYRYNYLKPF) ₂ K	3148,74
LC2203	(KKYRIYPKFL) ₂ K	2820,51
(p-BthTX-I) ₂	(KKYRYHLKPF) ₂ K	2868

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Para tanto, realizou-se a síntese e purificação do peptídeo GB2214, os demais análogos foram doados pelos membros do nosso grupo de pesquisa Lara Cerazi Salvador e Gabriel Felipe Hispagnol Bicho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para desenvolver o trabalho, foram realizados os seguintes procedimentos:

3.1 Síntese do peptídeo

A ferramenta mais utilizada hoje na obtenção de peptídeos é a síntese de peptídeos em fase sólida (MERRIFIELD, 1963). É um método baseado no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, partindo de sua região C-terminal que se encontra ligada covalentemente a uma resina.

Na Síntese de Peptídeos em Fase Sólida foi utilizado o protocolo da química Fluorenilmetiloxycarboxil (Fmoc). Neste, a proteção do grupo alfa-amino é feita pelo Fmoc e as cadeias laterais dos resíduos são protegidas por grupos terc-butil, tritil e terc-butiloxycarbonil, entre outros. O Fmoc é uma base lábil, então a sua retirada do grupo amino (desproteção) ligado à resina é realizada em um meio básico, com solução de 20% 4-metilpiperidina/dimetilformamida (DMF). Após cada etapa de desproteção foi efetuado um teste de ninidrina, reagente que em altas temperaturas reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul (maioria dos aminoácidos) ou castanho (prolina) (Kaiser *et al.*, 1970), permitindo saber se a desproteção foi efetuada com eficiência.

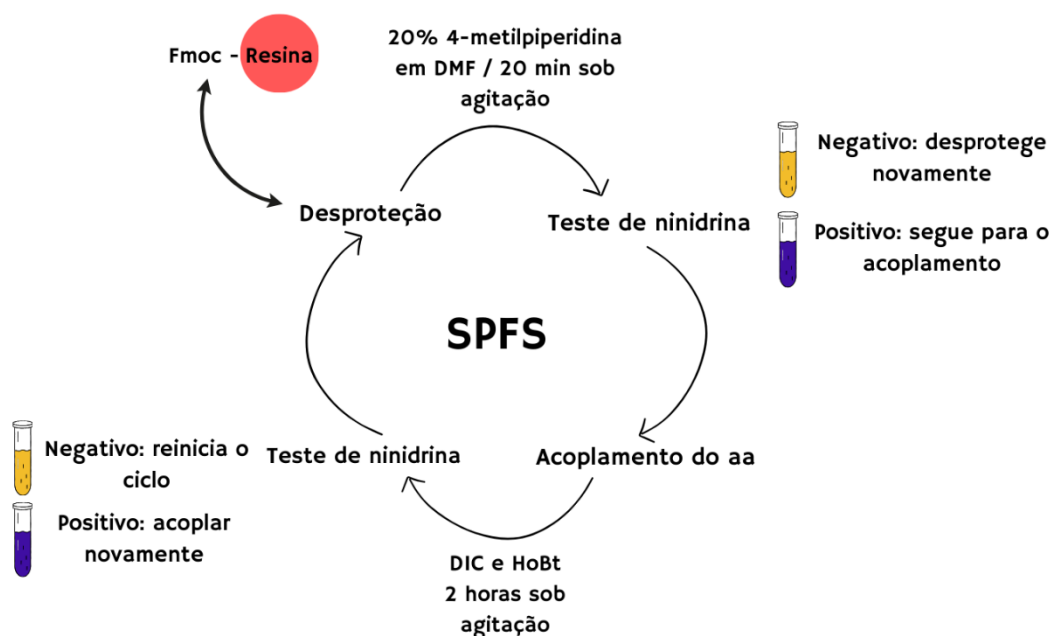
A etapa de acoplamento foi realizada pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc-aminoácido a ser inserido com os agentes acoplantes N,N-diisopropilcarbodiimida (Dic) e N-Hidroxibenzotriazol (HOBt). Nesta reação foram utilizadas três vezes de excesso em relação à quantidade de amino grupo existente na resina, durante duas horas de agitação. Após cada etapa de acoplamento também foi efetuado um teste de ninidrina, mas dessa vez para confirmar se o acoplamento foi efetuado com eficiência.

Entre cada passo foram efetuadas lavagens com DMF para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

A etapa de clivagem, que corresponde ao rompimento da ligação do peptídeo com a resina, foi realizada utilizando um coquetel de clivagem contendo água deionizada, triisopropilsilano - TIS (AcrosOrganics®) e ácido trifluoracético - TFA (Merck®) (proporção de 2,5; 2,5; 95% respectivamente; v,v,v), em frasco de acetilação, sob agitação branda por 2 horas. O volume a ser utilizado foi calculado na proporção de

10 mL de solução para cada 1 g de resina. Após a clivagem, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado. Ao final, o peptídeo foi extraído com 70% de solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura e 30% 0,036% de TFA em acetonitrila. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo bruto foi liofilizado e armazenado para posterior purificação e caracterização.

Figura 2: Esquema da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

3.2 Purificação e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A purificação do peptídeo sintetizado foi realizada em modo semipreparativo utilizando um CLAE Shimadzu, em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 2,1 x 25 cm). O grau de pureza da fração foi determinado em um cromatográfico Shimadzu, em uma coluna analítica (0,46 x 25cm) de fase reversa C18 (Kromassil). Os solventes utilizados para a purificação e verificação do teor de pureza do peptídeo foram 0,045 % de TFA em água deionizada (Solvente A) e 0,036 % de TFA em acetonitrila (Solvente B).

3.3 Espectrometria de massas

O espectro de massas foi obtido em um espectrômetro de massas LCQ FLEET ThermoScientific, com injeção direta, em modo de detecção positiva, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Bioquímica e Química Orgânica.

3.4 Avaliação da viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos peptídeos em células tumorais e não tumorais, utilizou-se a técnica de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide), que avalia a concentração de células viáveis após incubação com elemento citotóxico, a partir da quantificação da atividade mitocondrial.

Para tanto, as linhagens MCF-7, MRC-5 e A549 foram cultivadas em meio de cultura suplementada com soro bovino fetal e antibiótico/antimicótico a 37 °C e 5% CO₂. As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular e a concentração de células foi determinada na câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços com meio DMEN High Glucose e 1x10⁶ células, sendo deixadas em estufa de CO₂ por 24 horas para que as células possam aderir à placa.

Depois de 24 horas de cultivo, o meio foi removido e as placas contendo as linhagens foram tratadas com os peptídeos identificados como GB2203, GB2207, GB2211, GB2214, LC2202, LC2203 e (p-BthTX-I)₂, sendo o último o peptídeo comparativo, em diferentes concentrações, 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL, 4µg/mL, 2µg/mL e 1µg/mL. Foi utilizado DMSO 10% em meio como controle e poços sem célula como branco. As placas foram incubadas por 24h.

Após este período, as placas foram tratadas com solução de MTT em meio e incubadas por mais 3 horas para que as células viáveis incorporassem o tetrazolium. Em seguida, o meio com peptídeo contendo a solução de MTT foi retirado e as células são solubilizadas em isopropanol acidificado.

A leitura da intensidade da cor da solução foi realizada em leitor de placas no comprimento de onda de 570nm. Após a leitura, foi realizada a análise estatística dos dados obtidos para a plotagem dos gráficos referentes a viabilidade celular e citotoxicidade das linhagens testadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os processos de síntese, purificação e espectrometria de massas foram realizados para o peptídeo GB2214, sequência (KKYKAYFKLK)₂K, os demais peptídeos foram doados. A análise de viabilidade celular ocorreu para todos os análogos (GB2203, GB2207, GB2211, GB2214, LC2202, LC2203) e peptídeo comparativo (p-BthTX-I)₂.

4.1 Síntese do peptídeo

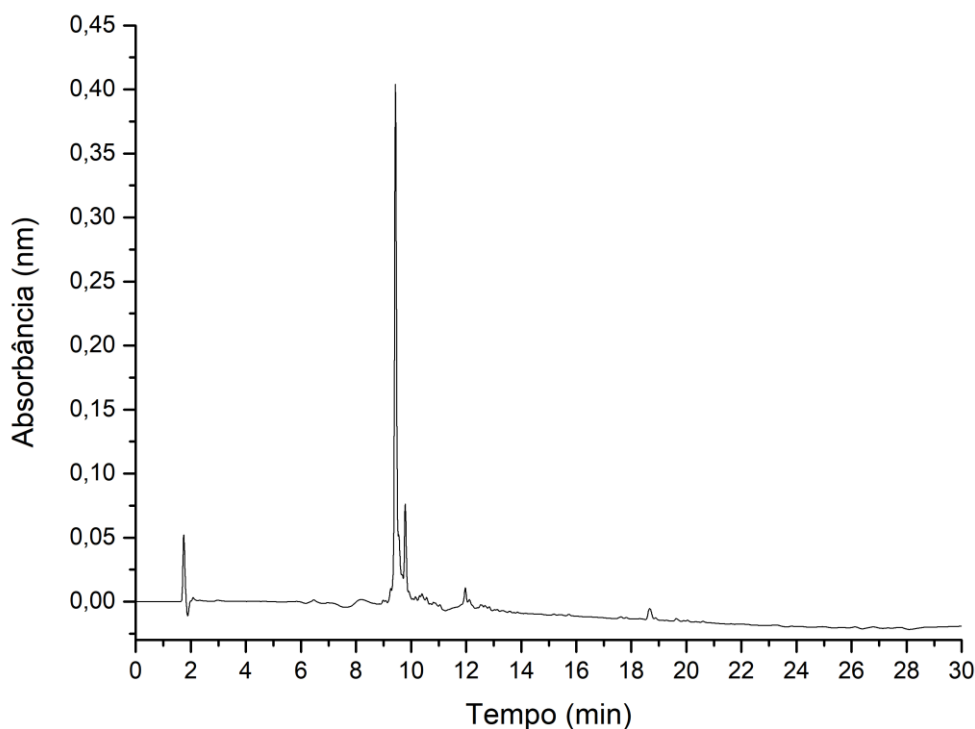
O peptídeo de código GB2214, sequência (KKYKAYFKLK)₂K e peso molecular 2742,44g/mol foi sintetizado a partir da metodologia SPFS (MERRIFIELD, 1963) conforme descrito anteriormente, utilizando a resina Rink amida, partindo de um resíduo de lisina como ponto de ramificação, portanto, a síntese começou com Fmoc-Lys(Fmoc)-OH.

Após o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos, o peptídeo foi pesado e metade da massa foi guardada para posterior utilização. A outra metade foi desprotegida com a solução de desproteção 20% piperidina/dimetilformamida (DMF). Com a fração desprotegida, realizou-se o processo de clivagem, utilizando um coquetel de clivagem composto por água deionizada, triisopropilsilano (TIS) e ácido trifluoracético (TFA), na proporção de 2,5; 2,5 e 95% respectivamente; v,v,v, em frasco de acetilação, sob agitação branda por 2 horas. Posteriormente, o peptídeo foi precipitado com éter gelado, sonificado e centrifugado, em sequência, por três vezes, para eliminar os reagentes presentes no sobrenadante. Após a precipitação, o peptídeo foi extraído em uma solução contendo 70% de solução 0,045% de TFA em água e 30% de solução 0,036% de TFA em acetonitrila, sonificado e centrifugado, em sequência, por três vezes. O sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado e identificado como GB2214 bruto.

4.2 Purificação e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Antes de realizar a purificação, o peptídeo GB2214 bruto foi analisado por um cromatógrafo Shimadzu, em coluna analítica (0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 (Kromassil) em gradiente de 5-95% de solvente B em 30 minutos (0,036% de TFA em ACN, v/v) para a análise do grau de pureza e estabelecer a porcentagem necessária de solvente B durante a purificação em coluna de fase reversa, considerando o tempo decorrido após a injeção e o pico de interesse (Figura 3).

Figura 3: Perfil cromatográfico do peptídeo GB2214 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30 minutos.



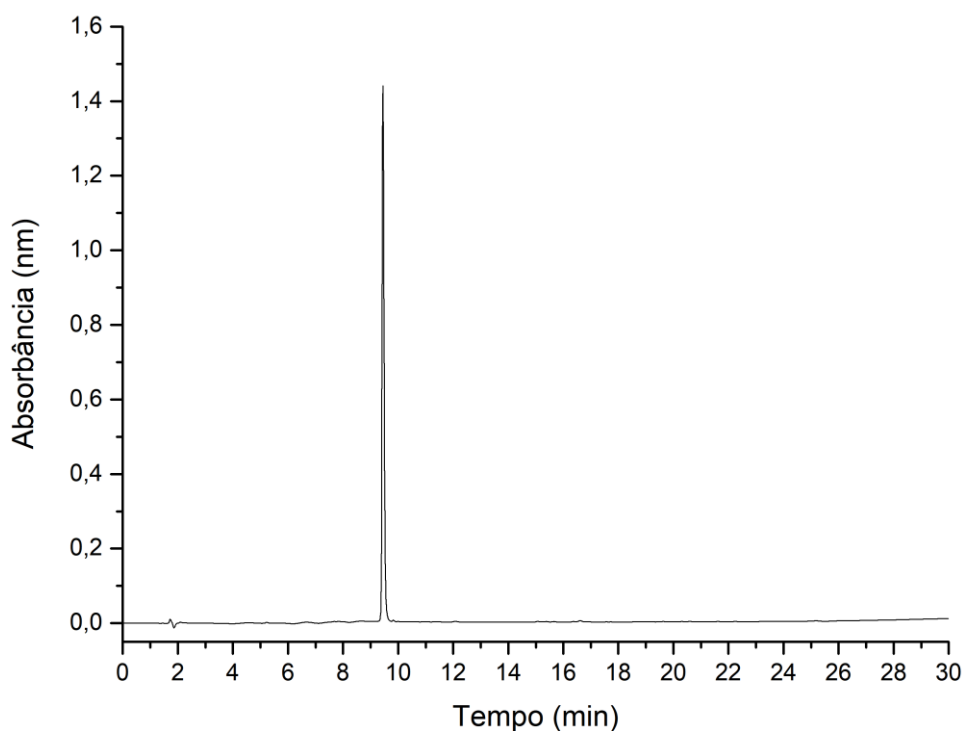
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O pico de interesse, relativo ao peptídeo GB2214 possui tempo de retenção em torno de 9,42 minutos. Considerando o gradiente linear de 5-95% de solvente B em 30 minutos, com uma variação de 3% de solvente B por minuto, pode-se inferir que o peptídeo GB2214 possui eluição por volta de 30% de solvente B, portanto, para a

purificação do peptídeo foi utilizado um gradiente de 5-60% de solvente B em 120 minutos.

A purificação do peptídeo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, no modo semipreparativo, utilizando coluna C18 (Phenomenex 2,1 x 25 cm) em gradiente 5-60% de solvente B em 120 minutos. Após a purificação, a fração de interesse foi acompanhada em cromatógrafo analítico para a determinação do grau de pureza. Como pode-se observar, o peptídeo foi purificado com sucesso, com alto grau de pureza (Figura 4).

Figura 4: Perfil cromatográfico do peptídeo GB2214 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30 minutos.



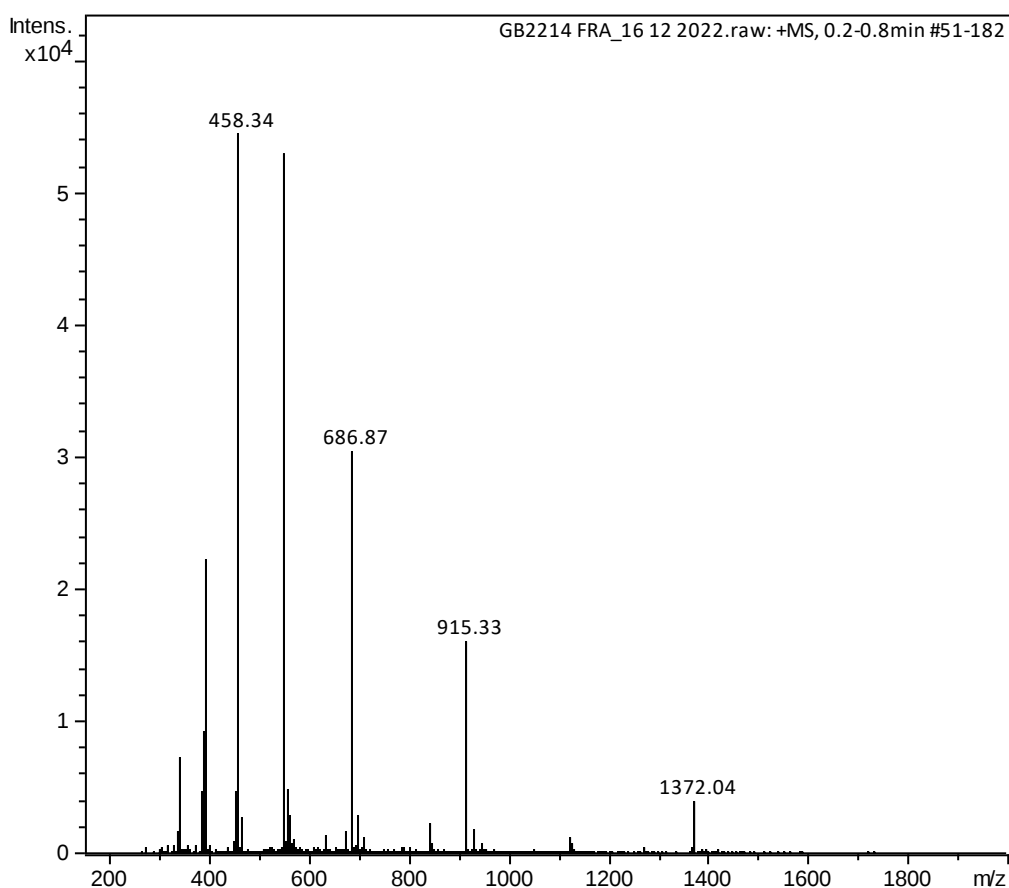
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.3 Espectrometria de massas

Posteriormente, para analisar a massa molar do peptídeo GB2214 puro e confirmar a obtenção da molécula de interesse, realizou-se a espectrometria de massas.

Analisando o espectro de massas do peptídeo GB2214 puro (Figura 5), é possível observar os picos com razão massa/carga 1372,04Da, correspondendo ao pico 2+, 915,33Da, correspondendo ao pico 3+, 458,34Da, correspondendo ao pico 6+ e 686,87Da, correspondendo ao pico 4+, portanto, pode-se concluir que o peptídeo foi purificado corretamente.

Figura 5: Espectro de massas do peptídeo GB2214 puro.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

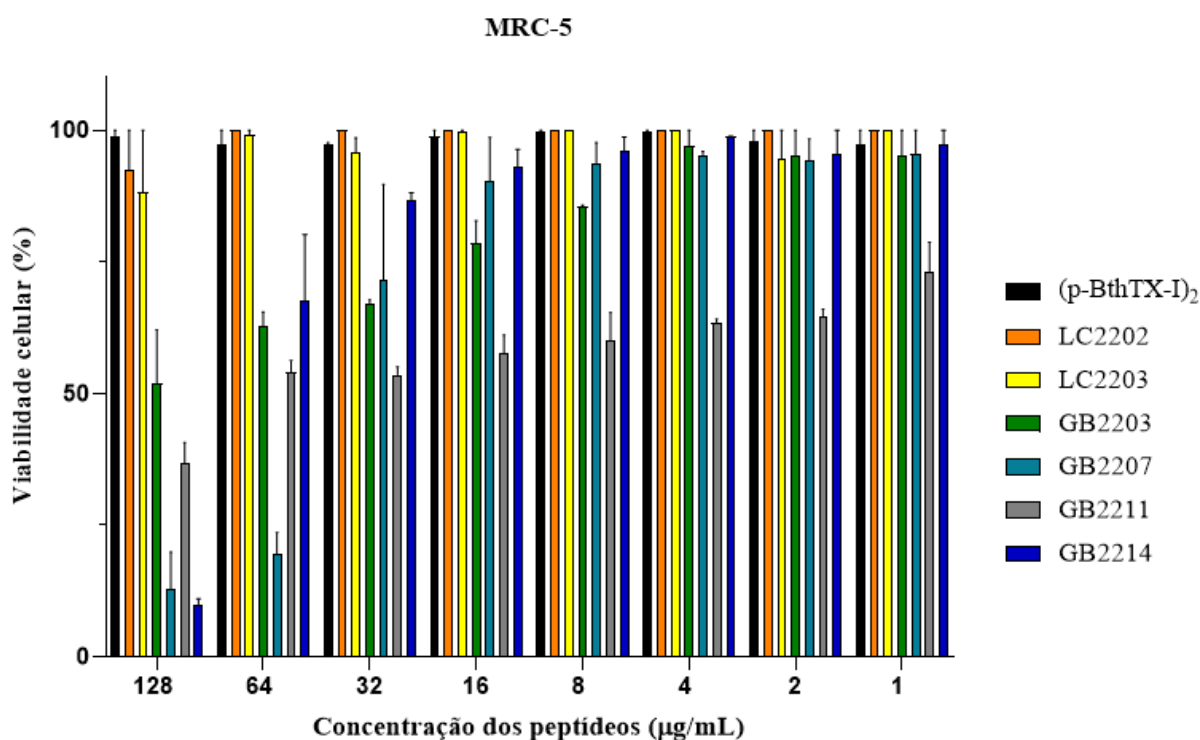
4.4 Avaliação de viabilidade celular

A viabilidade celular das linhagens MRC-5, A549 e MCF-7 foram avaliadas para os sete peptídeos: GB2203, GB2207, GB2211, GB2214, LC2202, LC2203 e (p-BthTX-I)₂, nas concentrações de 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL, 4µg/mL, 2µg/mL e 1µg/mL. As placas foram tratadas com os peptídeos por 24 horas para avaliar a atividade citotóxica.

Para a linhagem MRC-5, uma célula não tumoral de pulmão, é possível observar que em concentrações mais altas os peptídeos GB2207, GB2211 e GB2214 demonstram toxicidade. As porcentagens de viabilidade para a concentração de 128µg/mL, foram 12,86%, 36,86% e 9,96%, respectivamente. Nas demais concentrações, observa-se que há um aumento na porcentagem de células vivas. Para a concentração de 64µg/mL, GB2207 apresenta uma certa toxicidade, com uma viabilidade de 19,44%, os demais peptídeos já não são mais considerados tóxicos. LC2202 e LC2203 apresentam comportamento semelhante ao peptídeo de controle (p-BthTX-I)₂, não demonstrando toxicidade para a célula não tumoral em nenhuma das concentrações testadas.

Em geral, nas concentrações mais baixas, todos os peptídeos testados se comportaram de maneira semelhante peptídeo comparativo, não apresentando toxicidade para a linhagem MRC-5, como pode ser observado na Figura 6.

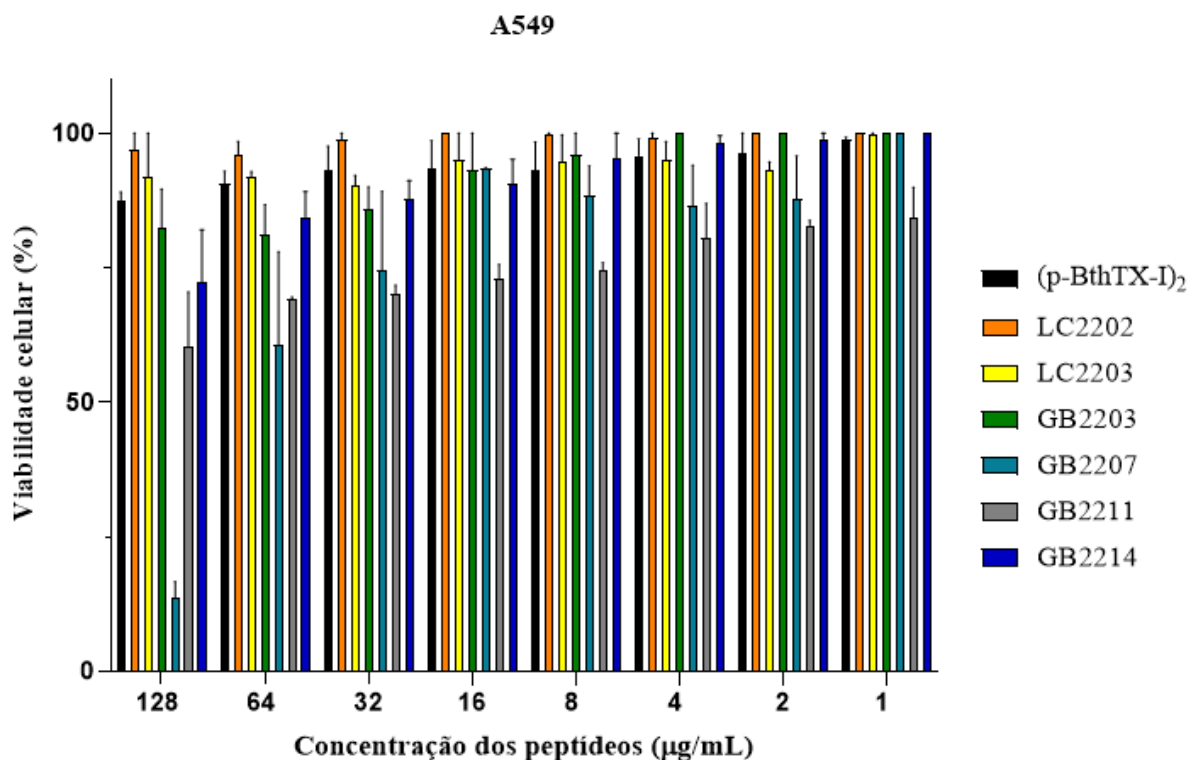
Figura 6: Avaliação da viabilidade celular da linhagem MRC-5 em 24h de tratamento com os peptídeos.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Para a linhagem A549, uma célula tumoral de pulmão, é possível observar que na maior concentração, 128µg/mL, o peptídeo GB2207 demonstra atividade antitumoral, com 13,54% de viabilidade celular, porém, na concentração 64µg/mL a porcentagem de viabilidade aumenta para 60,77% e para concentrações menores, observa-se que o peptídeo não é tóxico para essa linhagem. Os demais análogos, não apresentam toxicidade para a linhagem A549, apresentando porcentagens de viabilidade celular altas e ainda maiores para concentrações mais baixas. Resultado que se aproxima com o peptídeo comparativo, (p-BthTX-I)₂, que mantém uma viabilidade celular acima de 90% para todas as concentrações (Figura 7).

Figura 7: Avaliação da viabilidade celular da linhagem A549 em 24h de tratamento com os peptídeos.



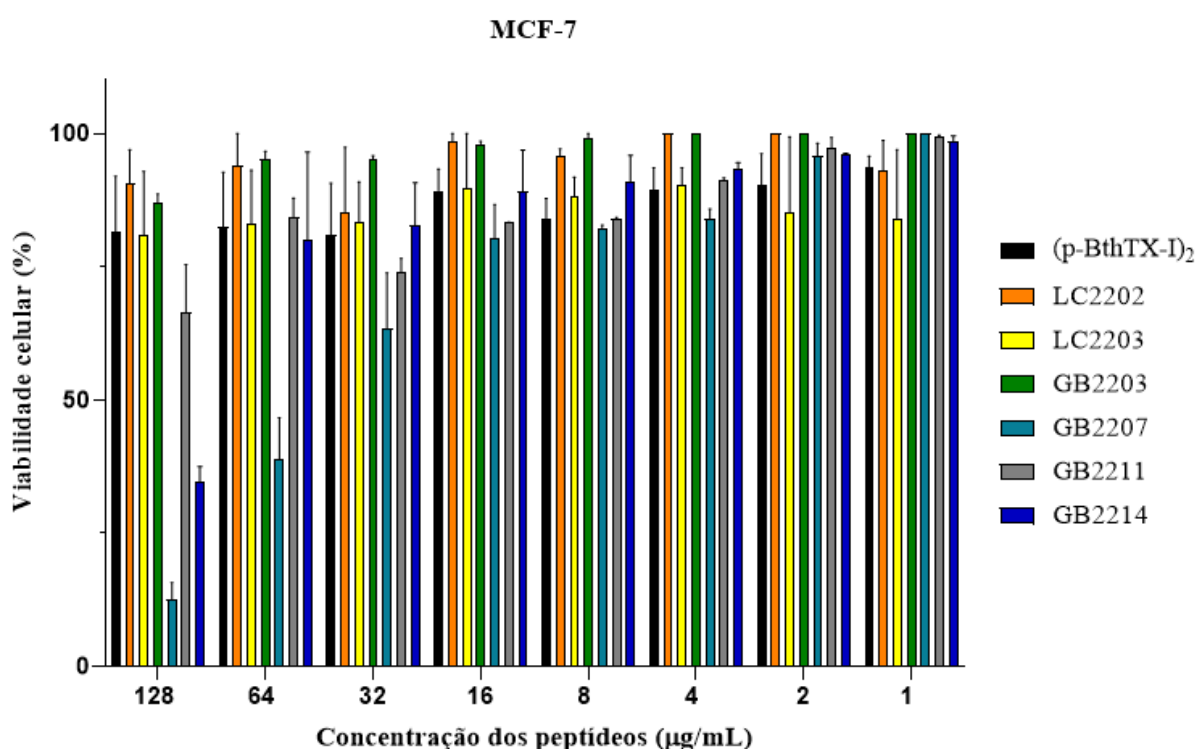
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Para a linhagem MCF-7, célula tumoral de mama, observa-se que em 24h de tratamento, para a maior concentração, o peptídeo GB2207 apresenta potencial antitumoral, com uma viabilidade celular de 12,62%, na segunda maior concentração, ocorre um aumento na viabilidade celular, para 38,81%. O peptídeo GB2214

apresenta uma porcentagem de 34,74% de células vivas. Nas demais concentrações, todos os peptídeos testados não demonstram atividade antitumoral, com porcentagens de viabilidade celular altas.

Como esperado, o peptídeo (p-BthTX-I)₂ manteve altas porcentagens de células viáveis, demonstrando que não é tóxico para a linhagem de célula tumoral MCF-7, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8: Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 em 24h de tratamento com os peptídeos.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

No geral, os peptídeos analisados não demonstraram toxicidade significativa, com exceção de GB2207 para as linhagens A549 e MCF-7, apenas em concentrações altas. Porém, GB2207 e GB2214 apresentaram potencial tóxico para a linhagem de célula não tumoral, MRC-5, nas maiores concentrações. O peptídeo que mais demonstrou citotoxicidade foi o GB2207, de sequência (KKWRWWLKAL)₂K é um análogo do peptídeo p-EM2 que possui em sua sequência três posições compostas por triptofano, que é um aminoácido de caráter apolar, isso faz com que o peptídeo

tenha uma afinidade maior por membranas biológicas, mas não confere seletividade, atingindo todos os tipos de membrana.

Os peptídeos LC2202 e LC2203 apresentaram atividades muito semelhantes ao peptídeo comparativo, para todas as linhagens, em todas as concentrações testadas. Todos os demais peptídeos não apresentaram toxicidade para as células tumorais e não tumorais testadas, principalmente em concentrações mais baixas.

Os resultados obtidos para (p-BthTX-I)₂ foram condizentes com o encontrado em estudos anteriores realizados por Santos-Filho *et al*, o peptídeo não é citotóxico, o que indica uma especificidade para células procarióticas.

5 CONCLUSÃO

Através dos ensaios de viabilidade celular com MTT, verificou-se que os peptídeos (p-BthTX-I)₂, LC2202, LC2203, GB2203 e GB2211 não ocasionaram morte celular nas linhagens MRC-5, A549 e MCF-7. Enquanto em altas concentrações, o peptídeo GB2207 apresentou potencial tóxico para as linhagens A549 e MCF-7, além da linhagem celular não tumoral, MRC-5, que o peptídeo GB2214 também demonstrou toxicidade em altas concentrações. Nas concentrações mais baixas, todos os peptídeos se demonstraram não tóxicos contra as linhagens tumorais e não tumoral.

Espera-se que os resultados de citotoxicidade dos peptídeos testados possam contribuir para novas pesquisas com o intuito de desenvolver novos fármacos mais eficientes no tratamento de câncer e até doenças infecciosas, visto que há estudos comprovando a atividade tóxica em células procarióticas do peptídeo modelo (p-BthTX-I)₂, e a partir disso, diminuir a mortalidade associada a essas doenças.

REFERÊNCIAS

- ALJABERY, Firas et al. The expression profile of p14, p53 and p21 in tumour cells is associated with disease-specific survival and the outcome of postoperative chemotherapy treatment in muscle-invasive bladder cancer. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2018. p. 530. e7-530. e18.
- ALMEIDA, José R. et al. Lessons from a single amino acid substitution: anticancer and antibacterial properties of two phospholipase A2-derived peptides. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 44, n. 1, p. 46-62, 2021.
- AMBROSIO, Andre LB *et al.* A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 7326-7335, 2005.
- ARAYA, Cindy; LOMONTE, Bruno. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. **Cell biology international**, v. 31, n. 3, p. 263-268, 2007.
- BORGES, Rafael J. *et al.* BthTX-II from bothrops jararacussu venom has variants with different oligomeric assemblies: an example of snake venom phospholipases A2 versatility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 255-266, 2021.
- CUSHMAN, David W.; ONDETTI, Miguel A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589-592, 1991.
- DOS SANTOS, Juliana I. *et al.* Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA2 inhibition. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28521, 2011.
- FERREIRA, Sérgio H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of Bothrops jararaca. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163, 1965.
- FREIRE, Marjorie CLC *et al.* Non-toxic dimeric peptides derived from the bothropstoxin-I are potent SARS-CoV-2 and papain-like protease inhibitors. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4896, 2021.
- GUTIERREZ, José M.; OWNBY, Charlotte L.; ODELL, George V. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake Bothrops asper (Fer-de-Lance). **Toxicon**, v. 22, n. 5, p. 719-731, 1984.
- HOLLAND, Debra R. *et al.* The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 29, p. 17649-17656, 1990.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *et al.* Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

IARC. **Cancer Topics**. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/>. Acesso em 4 set. 2023.

INCA. **Estimativa 2023-2025**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 4 set. 2023.

JOHNSON, Edward K.; OWNBY, Charlotte L. Isolation of a myotoxin from the venom of Agkistrodon contortrix laticinctus (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 243-255, 1993.

KALITA, Bhargab; SAVIOLA, Anthony J.; MUKHERJEE, Ashis K. From venom to drugs: a review and critical analysis of Indian snake venom toxins envisaged as anticancer drug prototypes. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 4, p. 993-1005, 2021.

KORDI, Masoumeh *et al.* Antimicrobial peptides with anticancer activity: Today status, trends and their computational design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 109484, 2022.

LOMONTE, Bruno *et al.* Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29867-29873, 1994.

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

LOMONTE, Bruno; ANGULO, Yamileth; MORENO, Edgardo. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A2 homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 28, p. 3224-3230, 2010.

MARAGANORE, John M. *et al.* A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 22, p. 13839-13843, 1984.

MENDES, Bruno *et al.* Potential use of 13-mer peptides based on phospholipase and oligoarginine as leishmanicidal agents. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 226, p. 108612, 2019.

MERRIFIELD, Robert B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/acidentes-ofidicos/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 4 set 2023.

MOHAMED ABD EL-AZIZ, Tarek; SOARES, Antonio G.; STOCKAND, James D. Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 564, 2019.

NÚÑEZ, Carlos E.; ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1587-1594, 2001.

OFFOR, Benedict C.; PIATER, Lizelle A. Snake venom toxins: Potential anticancer therapeutics. **Journal of Applied Toxicology**, 2023.

OMS. Snakebite evenoming. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab_1. Acesso em: 4 set. 2023.

OPAS. **Cancer**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 4 set. 2023

SANTAMARÍA, Carlos *et al.* Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 807-815, 2005.

SANTOS-FILHO, Norival A. *et al.* Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon**, v. 103, p. 160-168, 2015.

SANTOS-FILHO, Norival A. *et al.* Antibacterial activity of the non-cytotoxic peptide (p-BthTX-I)₂ and its serum degradation product against multidrug-resistant bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1898, 2017.

SANTOS-FILHO, Norival A. *et al.* Effect of C-terminal and N-terminal dimerization and alanine scanning on antibacterial activity of the analogs of the peptide p-BthTX-I. **Peptide Science**, v. 114, n. 2, p. e24243, 2021.

TONELLO, Fiorella *et al.* A Lys49-PLA2 myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophages that involves autocrine purinergic receptor signaling. **Cell Death & Disease**, v. 3, n. 7, p. e343-e343, 2012.

TOKE, Orsolya. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Peptide Science: Original Research on Biomolecules**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.