

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito antitumoral e antimetastático da PLA₂ Lys-49 BthTX-I, de *Bothrops jararacussu*, em
adenocarcinoma pulmonar de células não-pequenas

Gabriel de Oliveira Sousa

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Veridiana de Melo Rodrigues Ávila
Instituto de Biotecnologia
Co-orientador (a): Msc. Vinícius Queiroz Oliveira
Instituto de Biotecnologia

Uberlândia - MG
Março - 2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito antitumoral e antimetastático da PLA₂ Lys-49 BthTX-I, de *Bothrops jararacussu*, em adenocarcinoma pulmonar de células não-pequenas

Apresentado como requisito para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II do Curso de Biotecnologia - Bacharelado da Universidade Federal de Uberlândia.

Homologado pela coordenação do Curso de Biotecnologia em __/__/__.

Prof^a. Rute Magalhães Brito

Uberlândia - MG
Março – 2026

DEDICATÓRIA
Ao meu finado *conatus*.

“The hardest part of ending is starting again”

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Enickson, pelo apoio, direção, pelos conselhos, pelo bom gosto por música e por todo o carinho.

À minha mãe, Francineide, por todo o cuidado, a solicitude, o amor e pelas fotos.

Ao meu irmão, Bernardo, pelas brincadeiras, os abraços, pela saudade.

A todos esses, por terem me proporcionado o melhor, desde a educação básica, até a minha aventura longe de casa. Por me ensinarem a ser uma pessoa boa, a cuidar de mim e dos outros, a prezar pela saúde, a buscar sempre o melhor, a trabalhar para conquistar o meu lugar e minhas coisas, a ser independente. Por serem meu exemplo de esforço, honestidade, empatia e simpatia. Pelo amor e pelo crescimento que semearam em mim, para ser quem sou hoje.

À minha namorada, Maria de Fátima, por estar ao meu lado durante os tempos difíceis, por me dar seu calor nas tempestades, por me escutar e também pelo silêncio. Por todo o companheirismo nos momentos bons e fáceis, pelas lágrimas e sorrisos, pelo aconchego, pelos almoços e jantares, pelas manhãs, tardes e noites, pelos cafés, pelas jogatinas, pelos presentes. Por todo o amor, respeito e cumplicidade que construímos ao longo dessa jornada que, por sorte, compartilhamos.

Aos meus tios, Mônica e Fábio, por toda a hospitalidade ao me receberem em sua casa, tornando mais suave o caminho que trilhei na minha vida nova, longe de casa. Pelos cuidados, preocupações, conselhos, conversas nos jantares, pela solicitude e carinho.

Aos meus primos, Guilherme e Luis Fernando, pela amizade e companheirismo.

Aos meus avós, Isabel e José Vicente, pelo amor, pelas preces e por todo o interesse pela minha caminhada.

Às minhas tias, Thaila e Franciene, pelos abraços, pelas saudades, mensagens e apoio.

À Fernanda, minha amiga e parceira. Pelas caminhadas pelo campus e além, pelos jogos pela atlética, pelas conversas profundas e outras nem tanto assim, pelos choros e risadas, pelas piadas, pelos lanches, pelas experiências. Por toda essa aventura e o amadurecimento que marcaram nossas vidas.

Aos meus amigos mais antigos, Victor Hugo, Rafael, Elisa, Malu, Letícia e Arthur, que mesmo de longe me apoiaram, encorajaram e ofereceram todo o seu carinho.

Em memória da Sol.

Aos meus amigos da faculdade, Yasmim, Pedro, Jamilly, Maria Clara, Ian, Karllos, Beatriz e Geovanna, por estarem do meu lado desde o início, pelas risadas, pelas discussões pós-prova, pelos desabafos, pelos trabalhos em grupo, pelo bolo de aniversário, pelas confraternizações ao longo dos anos, pelas fofocas, pelas festas, pelos almoços no RU, pelas viagens de intercâmbio, pelas sonecas na biblioteca. Por todo o companheirismo e por crescerem junto comigo.

Aos colegas do Campus Umuarama, pelos momentos, risadas e experiências que tornaram o dia a dia mais leve e memorável.

Aos parceiros no Campus Educa, pelos jogos de basquete, vôlei e handebol, pela torcida de garganta rouca, pelas aventuras no CIA, pela responsabilidade e experiência de fazer parte de uma empresa comandada por jovens. Por serem parte da minha vida esportiva e social.

Aos amigos do LABITOX, Emanuelle, Lorena, Peaga, Ana Cláudia e Tianinha, pelas conversas entre experimentos, pelos almoços e assuntos de todos os dias, por compartilharem suas experiências e expertises, pelas reuniões de sexta, pelo conforto nos dias ruins, pela alegria nos dias bons. Por toda a ajuda e contribuição para o meu desenvolvimento como cientista e pessoa.

Aos meus parceiros de IC, Léo e Anna, por dividirem a vida e a bancada, os experimentos e resultados, as vitórias e derrotas. Pelas conversas, pelas discussões científicas, pelas dores de cabeça, por ensinar e ser ensinado, por compartilharmos o caminho como pesquisadores.

A todos os acadêmicos do Bloco 2E, que foi minha terceira casa durante muito tempo, pela ajuda, pela solicitude, pela gentileza e por todo o suporte.

Ao Vinícius, por ser meu coorientador e amigo, pelos conselhos, pelas conversas sobre basquete, pelos treinos na academia, pelas risadas, pelas experiências, pelo conhecimento e expertise acadêmica, pela companhia diária no laboratório.

À Professora Renata, pelas histórias, o sorriso aconchegante e pela disposição de sempre. Por todo o conhecimento e experiência que compartilhou, por me apresentar primeiro ao LABITOX.

À Doutora Lorena Polloni, que chegou na reta final, mas fez toda a diferença. Pela solicitude, pelo conhecimento, pelo companheirismo, pelas risadas, pelos artigos e conselhos, pelo conforto e pé no chão.

À Professora Veridiana, que me acolheu e guiou. Pela sinceridade, pelo carinho, pelo cuidado, pela atenção. Por ter sido minha base e minha referência de acadêmica, cientista, professora e pessoa. Pelas broncas e reconhecimentos, pela insistência, pelos ensinamentos diários, por me fazer pensar por mim mesmo e caminhar com meus próprios pés. Pela paciência e compreensão nos meus momentos de pouca fé e desânimo. Por me fazer enxergar o quão valioso é o caminho e o que ele me proporcionou. Por ter estado do meu lado até aqui.

A todos que eternizaram esta jornada, que estará marcada em mim pelo resto da vida.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela estrutura, pelos docentes e pelas oportunidades. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar este e meus outros projetos e por contribuir para a grandeza que o país está finalmente reconhecendo, a pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Câncer de pulmão: epidemiologia, fatores de risco e diagnóstico.....	9
1.2 Etiologia do câncer: bases moleculares com ênfase na metástase.....	10
1.3 Tratamentos atuais e limitações.....	15
1.4 Peçonhas de serpentes como fonte de biomoléculas	16
1.5 Fosfolipases A ₂ de peçonhas ofídicas com atividade antitumoral.....	18
1.6 Bothropstoxina-I de <i>Bothrops jararacussu</i>	22
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 Isolamento e purificação da BthTX-I	27
3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	27
3.3 Cultivo celular	28
3.4 Ensaio de citotoxicidade por MTT	28
3.5 Ensaio de liberação de LDH	28
3.6 Ensaio de formação de colônias	29
3.7 Inibição da adesão celular.....	29
3.8 Ensaio de Wound Healing	30
3.9 Migração celular por ensaio Transwell.....	30
3.10 Análise e tratamento de dados	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Isolamento da BthTX-I.....	31
4.2 Atividade citotóxica e antiproliferativa	32
4.3 Atividade antimetastática.....	34
5. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

RESUMO

As peçonhas de serpentes constituem uma fonte rica de proteínas e peptídeos com diversas atividades biológicas, muitas das quais têm sido exploradas como biomoléculas com potencial terapêutico. Neste estudo, a proteína BthTX-I, uma enzima homóloga a fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, foi purificada por cromatografia de troca catiônica em CM-Sepharose Fast Flow. Posteriormente, seus efeitos citotóxicos e antimetastáticos foram avaliados em células de adenocarcinoma pulmonar de células não pequenas (A549), utilizando células epiteliais pulmonares não tumorais (BEAS-2B) como controle. A citotoxicidade da BthTX-I foi inicialmente avaliada por meio dos ensaios de MTT, liberação de LDH e clonogenicidade. No ensaio de MTT, observou-se redução significativa da viabilidade de ambas as linhagens em concentrações superiores a 1,56 µg/mL (Índice de Seletividade (IS) = 0,425). Já no ensaio de liberação de LDH, a BthTX-I promoveu maiores danos de membrana nas células A549 em comparação às células BEAS-2B na menor concentração avaliada (0,39 µg/mL). De maneira semelhante, o ensaio de clonogenicidade revelou redução significativa da capacidade proliferativa das células A549 na concentração de 0,39 µg/mL, sem efeitos nas células da linhagem BEAS-2B. Interessantemente, a BthTX-I causou um leve efeito inibitório sobre a adesão celular em todas concentrações e linhagens avaliadas. Por fim, o potencial antimetastático foi investigado por meio dos ensaios de migração celular por Wound Healing e Transwell, nos quais foi observada inibição significativa da migração das células A549 na menor concentração testada (0,39 µg/mL), indicando efeito seletivo sobre a linhagem tumoral. Em conjunto, os resultados demonstram que a BthTX-I apresenta potencial antitumoral contra células de adenocarcinoma pulmonar, promovendo redução da viabilidade, proliferação e migração celular de forma seletiva em baixas concentrações.

Palavras-chave: Fosfolipases A₂; peçonhas de serpentes; citotoxicidade; A549.

ABSTRACT

Snake venoms constitute a rich source of proteins and peptides with diverse biological activities, many of which have been explored as biomolecules with potential therapeutic applications. In this study, the protein BthTX-I, a phospholipase A₂-like enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*, was purified by cation-exchange chromatography using CM-Sepharose Fast Flow. Subsequently, its cytotoxic and antimetastatic effects were evaluated in non-small cell lung adenocarcinoma cells (A549), using non-tumor lung epithelial cells (BEAS-2B) as a control. The cytotoxicity of BthTX-I was initially assessed using MTT, LDH release, and clonogenic assays. In the MTT assay, a significant reduction in cell viability was observed in both cell lines at concentrations above 1.56 µg/mL (Selectivity index (SI) = 0.425). In contrast, the LDH release assay showed that BthTX-I induced greater membrane damage in A549 cells compared to BEAS-2B cells at the lowest concentration tested (0.39 µg/mL). Similarly, the clonogenic assay revealed a significant reduction in the proliferative capacity of A549 cells at 0.39 µg/mL, with no significant effects observed in BEAS-2B cells. Interestingly, BthTX-I caused a slight inhibitory effect on cell adhesion at all tested concentrations in both cell lines. Finally, the antimetastatic potential was investigated through cell migration assays (Wound Healing and Transwell), in which a significant inhibition of A549 cell migration was observed at the lowest tested concentration (0.39 µg/mL), indicating a selective effect on the tumor cell line. Taken together, these results demonstrate that BthTX-I exhibits antitumor potential against lung adenocarcinoma cells by reducing cell viability, proliferation, and migration in a selective manner at low concentrations.

Keywords: Phospholipase A₂; snake venom; cytotoxicity; A549.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PULMÃO: EPIDEMIOLOGIA, FATORES DE RISCO E DIAGNÓSTICO

O câncer constitui atualmente um dos maiores desafios para a saúde pública mundial, devido à sua elevada incidência e mortalidade. Segundo dados da Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), em sua estimativa mais recente, realizada em 2022, o número de novos casos de câncer no mundo aproximou-se de 20 milhões, e mais de 9,7 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença (Bray *et al.*, 2024).

No Brasil, a estimativa feita pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o triênio de 2026-2028 é de 581 mil novos casos – excluindo os tumores de pele não melanoma, que possuem alta incidência e baixa letalidade (INCA, 2026). Dos 33 tipos de câncer listados pela IARC, o câncer de pulmão é o mais incidente e letal, com quase 2 milhões de casos (13,2% do total) e mais de 1,8 milhão de vítimas no mundo em 2022 (Bray *et al.*, 2024).

O câncer de pulmão, segundo dados estimados em 2023 no Brasil pelo INCA, é a terceira neoplasia mais incidente em homens (7,5%) – atrás dos cânceres de próstata, cólon e reto – e quarta em mulheres (6,0%) – atrás dos cânceres de mama, cólon e reto e colo do útero; ainda assim, foi a segunda mais letal em ambos os sexos em dados de 2021, registrando 16 mil mortes entre os homens (13,2%) – apenas 0,3% atrás da mortalidade do câncer de próstata – e 13 mil em mulheres (11,7%), aproximadamente (INCA, 2026).

O tabagismo é a principal causa prevenível da doença, responsável por mais de 80% dos casos de câncer de pulmão no Ocidente (Thandra *et al.*, 2021). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2025, cerca de 1,3 bilhão de pessoas no mundo – o que corresponde a aproximadamente 16% da população global – utilizam produtos derivados do tabaco. Estudos epidemiológicos indicam que o consumo contínuo dessas substâncias está associado a elevada mortalidade, sendo responsável por mais da metade das mortes entre indivíduos que mantêm o hábito de fumar ao longo da vida (Thandra *et al.*, 2021; OMS, 2025).

Fatores ambientais também contribuem para os casos desta neoplasia, como a exposição ao radônio, gás radioativo de origem natural – resultante da degradação do urânio presente no solo e em rochas – que pode se acumular em residências. A exposição crônica a esse gás constitui uma importante causa de câncer de pulmão no mundo e a principal entre indivíduos que não apresentam histórico de tabagismo (OMS, 2023; Cheng *et al.*, 2021; Rodríguez-

Martínez *et al.*, 2018).

Portadores da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) também estão mais suscetíveis a desenvolver a neoplasia (Leiter *et al.*, 2023). Obeng-Nyarkoh *et al.* (2025) concluíram, em sua meta-análise dos casos de adultos com DPOC nos Estados Unidos da América – registrados em artigos até julho de 2024 –, que os indivíduos que possuem histórico de tabagismo e enfisema têm maior índice de incidência e mortalidade de câncer de pulmão, independentemente de sexo e etnia. Ademais, infecções causadoras de câncer, como por Papilomavírus Humano e hepatite representam 30% dos casos de câncer em países de baixa e média-baixa renda (OMS; 2025).

O câncer de pulmão é classificado em dois subtipos histológicos primários: câncer de pulmão de células pequenas e de células não pequenas. O último é o subtipo mais comum, representando aproximadamente 85% das neoplasias de pulmão no mundo (Hendriks *et al.*, 2024; OMS, 2023). O carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) é ainda dividido em outros três principais subtipos histológicos, distinguidos pela aparência histológica das células: adenocarcinoma, originado nas glândulas mucosas; carcinoma de células escamosas, originado no epitélio escamoso das vias aéreas; e o carcinoma de grandes células, originado de diversas células indiferenciadas do epitélio pulmonar (Hendriks *et al.*, 2024).

O diagnóstico desta neoplasia é feito a partir de exames como a Tomografia Computadorizada, Ressonância Magnética, Radiografia de tórax (Heidari *et al.*, 2023), entre outros, complementados com exames não invasivos como o PET-SCAN, que indicam o estadiamento do câncer. Algumas técnicas de detecção da doença com imagens utilizando Inteligência Artificial estão em desenvolvimento e vêm gerando resultados, melhorando a eficiência da detecção, análise histopatológica e categorização por meio da chamada *Deep Learning* (Aprendizagem Profunda) (Heidari *et al.*, 2023). Os avanços nos métodos diagnósticos para o câncer se mostram de alta importância, já que as taxas de sobrevivência de cinco anos para a detecção em estágios iniciais sobem de 18% para 56% (INCA, 2022).

1.2 ETIOLOGIA DO CÂNCER: BASES MOLECULARES COM ÊNFASE NA METÁSTASE

Câncer é o nome genérico dado a um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal e desordenado de células (OMS, 2025), formando uma massa de células cancerosas chamada de tumor. O surgimento de uma célula neoplásica (do grego: neo- + -plasis = novo

crescimento) se dá principalmente por alterações não reparadas em seu material genético, oriundas do abuso de substâncias tóxicas como o cigarro, exposição a carcinógenos ou mesmo de condições genéticas, principalmente em proto-oncogenes, causando o comprometimento do controle do crescimento celular (Hanahan; Weinberg, 2000; Hanahan, 2026).

A oncogênese, processo de formação do tumor, é geralmente demorada, passando por três estágios principais (Figura 1A). A iniciação, em que fatores externos – como radiação UV solar e metais pesados (Jomova *et al.*, 2025) – ou internos – falhas na duplicação do material genético na replicação celular, por exemplo – alteram o material genético celular, ativando um perfil altamente replicativo (Hanahan, 2026). Em seguida, a promoção, em que há a ação dos agentes oncopromotores na célula já alterada, os quais aumentam o metabolismo celular – como o mitocondrial, para suprir a demanda energética – e evitam sinais de morte. E por fim, a progressão, estágio de multiplicação desordenada e irreversível das células cancerosas, resultando em uma massa de células que podem comprometer as funções do tecido em que está instalada (Brasil, Ministério da Saúde; INCA, 2020).

Os tumores podem surgir em qualquer local do corpo e são classificados como benignos ou malignos (Figura 1B). O primeiro é formado por células bem diferenciadas – como as do tecido original –, expande-se de forma organizada, com limites bem definidos e é limitado ao crescimento local, podendo comprometer o funcionamento de órgãos próximos ou dos quais foi originado (Boutry *et al.*, 2022; Ministério da Saúde, 2024; INCA, 2020). Já o segundo é característico do câncer, é formado por células indiferenciadas – diferentes do tecido original –, muitas vezes sem função e têm a capacidade de invadir outros tecidos. Ao deslocar-se para a corrente sanguínea, pode ser carreado para outras partes do corpo, ocasionando a metástase (Figura 1C): surgimento de tumor em local diferente do original, sendo a manifestação mais letal do câncer (Ministério da Saúde, 2024; INCA, 2020; Gerstberger *et al.*, 2023). A metástase tumoral está presente em cânceres em estágios avançados, tem mau prognóstico e é a causa primária das mortes por neoplasias (OMS, 2025).

Por surgirem de defeitos no sistema de regulação de homeostase e proliferação das células, variados tipos celulares podem se tornar cancerígenos. Por essa razão, existem centenas de tipos e subtipos de câncer, que se diferenciam pelo órgão de origem e pela natureza celular, como os carcinomas (gerados a partir de células epiteliais), sarcomas (tecido mesenquimal) e linfomas (linfócitos) (Hanahan; Weinberg, 2000; Hanahan, 2026; U.S. National Cancer Institute, 2026).

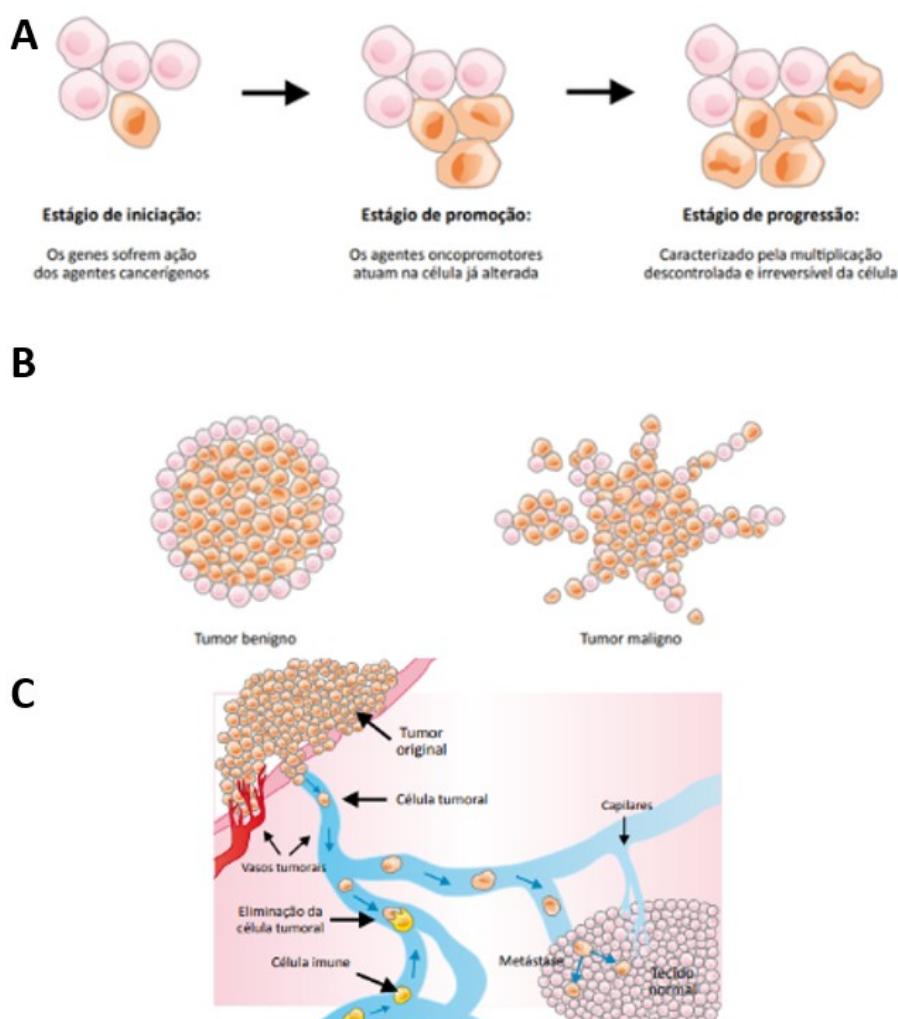


Figura 1: Formação e progressão do câncer. (A) Estágios da formação de tumores. (B) Tipos de tumores. (C) Representação da formação de metástases. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (Brasil), 2011.

Hanahan e Weinberg, 2000, inauguraram um dos conceitos contemporâneos mais influentes da biologia do câncer ao proporem o modelo conhecido como “*The Hallmarks of Cancer*” (Figura 2). Em seu trabalho, os pesquisadores descreveram 6 marcas fundamentais presentes em células cancerígenas, que foram atualizadas ao longo dos anos 2000. Em seu último artigo publicado em 2026, Douglas Hanahan apresentou 9 marcas do câncer, sendo elas: Resistência à morte celular programada, inativação de supressores de crescimento, sustentação de sinais de proliferação, estabelecimento de imortalidade replicativa, desregulação do metabolismo celular, induzir e acessar vasos sanguíneos, desbloqueio de plasticidade fenotípica, evasão da resposta imune e ativação de invasão e metástase (Hanahan, 2026).

Nesse contexto, nota-se que o surgimento e a manutenção dessas características dependem de um sistema responsável por modular o comportamento celular. O principal agente indutor desses processos é o Microambiente Tumoral (MT), um sistema dinâmico composto



Figura 2: “Hallmarks of Cancer”. Fonte: Hanahan, 2026.

pela Matriz Extracelular (ME), células estromais (como fibroblastos), células do sistema imunológico (células T, B, células Natural Killer (NK), etc.), além de diferentes citocinas e quimiocinas (como IL-4, IL-10 e IL-13), que induzem macrófagos a fenótipos pró-tumorais. Esses componentes podem restringir ou promover a progressão tumoral, com a tendência de favorecer o crescimento do tumor ao longo do desenvolvimento da neoplasia (Arner; Rathmell, 2023; Tian *et al.*, 2022; Gerstberger *et al.*, 2023).

O MT apresenta heterogeneidade espacial, principalmente em relação à disponibilidade de nutrientes, composição da ME, perfil de citocinas, entre outros fatores. Essa diversidade de condições microambientais fornece estímulos distintos para diferentes regiões do tumor, atuando como fator determinante para a indução da plasticidade celular e para o aumento da heterogeneidade intratumoral. Assim, tais estímulos promovem diferentes programas de modulação celular, resultando em múltiplos fenótipos tumorais coexistentes (Arner; Rathmell, 2023; Tian *et al.*, 2022; Gerstberger *et al.*, 2023).

A plasticidade celular é um elemento chave para a malignidade tumoral, pois representa a capacidade da célula cancerígena de adaptar seu fenótipo a situações de estresse ou ao ambiente múltiplas vezes. A plasticidade celular não promove alterações genótípicas, mas fenotípicas, em que as células reprogramam sua expressão gênica e seu metabolismo para superar determinadas barreiras. Um tumor agressivo frequentemente é um tumor heterogêneo,

pois sua população celular está muito mais propensa a adquirir características de mobilidade (potencial metastático), resistência ao sistema imunológico ou terapias antineoplásicas e estados adaptativos semelhantes aos de células-tronco (“*stem-like*”) através de modificações epigenéticas – como modulação de cromatina, metilação ou acetilação de histonas e promotores gênicos etc. (Gerstberger *et al.*, 2023).

Como consequência da plasticidade tumoral, subpopulações celulares podem adquirir características como a perda de sua polaridade e ativação da repressão de genes codificadores de moléculas de adesão. Estas alterações garantem maior mobilidade celular, determinando um fenótipo migratório e invasivo, culminando no processo chamado de Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) (Figura 3) (Gerstberger *et al.*, 2023; Hanahan; Weinberg, 2000; Hanahan, 2026). A partir desta translocação, as células tumorais tornam-se aptas a invadir tecidos adjacentes, atingir vasos sanguíneos ou linfáticos, e disseminar-se para diferentes partes do organismo, no processo denominado de metástase. Na circulação, as células podem transitar isoladas ou em “*clusters*” formados por plaquetas, neutrófilos ou outros componentes que contribuem para a evasão do sistema imunológico, dificultando sua eliminação e aumentando o potencial metastático (Gerstberger *et al.*, 2023).

A TEM é o primeiro processo crucial para a formação de metástases, estando diretamente relacionada ao processo de intravasão das células tumorais na circulação sanguínea ou linfática. Para que o tumor seja apto a “colonizar” outros tecidos, é necessária também a extravasão, ou seja, a saída da circulação para o tecido mesenquimal (Arner; Rathmell, 2023; Quail; Joyce, 2013).

Em suma, a metástase é um processo lento e ineficiente que depende de inúmeros processos para prosperar, pesquisas como as de Quail e Joyce, 2013, indicam que aproximadamente 0,01% das células intravasadas tem êxito no estabelecimento de um tumor secundário. Além dos supracitados, tumores necessitam modular a formação de vasos sanguíneos (angiogênese) a fim de obter nutrientes, oxigênio, entre outros recursos para se desenvolver. Também, por meio de processos como liberação de citocinas imunossupressoras e recrutamento de células imunes, as massas carcinogênicas modulam negativamente a resposta imunológica, evadindo-o para que não seja destruído e possa se espalhar para órgãos distantes (Quail; Joyce, 2013; Galassi *et al.*, 2024; Arner; Rathmell, 2023). Nesse viés, a metástase surge como o resultado de um processo multifacetado e altamente complexo de adaptação celular, reforçando a necessidade de abordagens terapêuticas e estratégias biotecnológicas igualmente sofisticadas para mitigar a letalidade associada às neoplasias malignas.

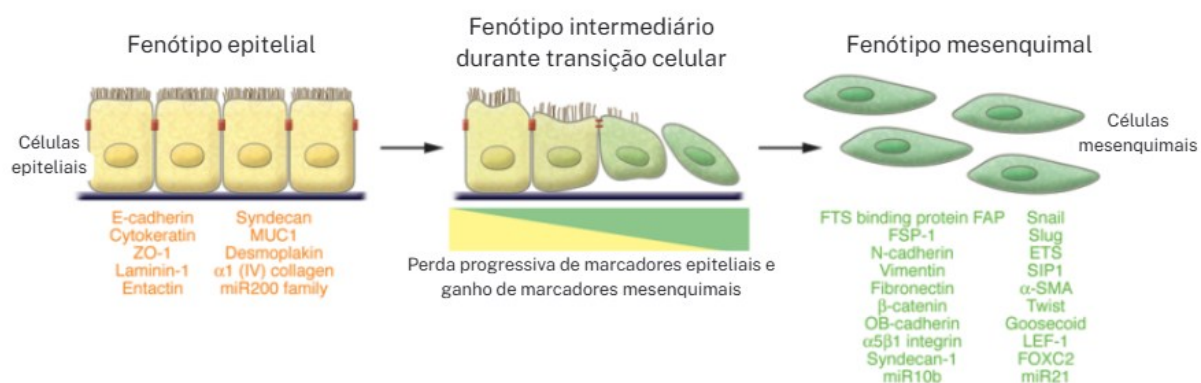


Figura 3: Transição epitélio-mesenquimal. Adaptada de Kalluri; Weinberg, 2009.

1.3 TRATAMENTOS ATUAIS E LIMITAÇÕES

O tratamento para cânceres no geral utiliza uma ou mais técnicas combinadas. Para o tratamento do CPCNP em estágios iniciais, I ou II, é realizada a ressecção cirúrgica do tumor e a realização de técnicas adjuvantes, a fim de eliminar as células tumorais remanescentes. Já nos estágios avançados, III ou IV, a abordagem muda para quimioterapia ou radioterapia (Li *et al.*, 2023). Para leucemias ou linfomas, é feito o transplante de medula óssea (INCA, 2023). Apesar de muitas vezes serem eficazes, esses tratamentos trazem efeitos adversos, como náusea, anemia, leucopenia e trombocitopenia, severos sintomas colaterais na radioterapia como fibrose pulmonar e sangramento ginecológico, entre outros (INCA, 2023).

Estudos feitos pelo Observatório de Oncologia em 2025 mostraram que os gastos públicos do governo brasileiro com tratamento do câncer em 2024 chegaram a 27 bilhões de reais, incluindo custos com procedimentos ambulatoriais e hospitalares – que também incluem tratamentos e cirurgias oncológicas (Simão, 2025). Esse número demonstra o esforço demandado do sistema público de saúde para combater a doença.

Por essas razões, novas abordagens terapêuticas vêm sendo estudadas ao longo dos anos e houve avanços significativos, principalmente no âmbito das terapias direcionadas às células cancerígenas. Estratégias nanobiotecnológicas, em que partículas construídas nanometricamente de materiais diversos – como lipídeos (lipossomas), ouro, óxidos de ferro, entre outros – exploram mecanismos para carrear agentes terapêuticos – como mRNAs, siRNAs e agentes quimioterápicos – diretamente aos tumores, aumentando a eficácia do tratamento ao evitar degradação prévia no organismo, mitigar efeitos adversos por falta de seletividade, entre outras vantagens (Zong *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023). Um exemplo são as nanopartículas lipídicas (NPL), um sistema efetivo de entrega de drogas em cânceres de pulmão, pois podem atravessar a barreira biológica do pulmão. NPL associadas com RNAs de interferência, por exemplo,

foram capazes de reduzir o crescimento de xenoinxertos derivados de pacientes com câncer de pulmão ao bloquear a via PIK3R2-AKT (Li *et al.*, 2023).

Terapias moleculares-alvo também se destacam por inibirem vias oncogênicas específicas – como as do receptor do fator de crescimento epidérmico, que ativa vias de proliferação celular e sobrevivência em CPCNP –, mas que possuem limitações devido à heterogeneidade tumoral e ao surgimento de mutações – como a mutação secundária do gene T790M, comumente observada nesses tratamentos em pacientes com CPCNP –, tornando necessária a combinação de estratégias – como a inibição de vias secundárias ou até com outras metodologias (Liu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023).

A imunoterapia revela uma ampla gama de estratégias de combate ao câncer. O desenvolvimento de drogas baseadas em anticorpos tem possibilitado intervenções mais específicas sobre alvos tumorais. Anticorpos monoclonais podem atuar como bloqueadores de *checkpoints* imunológicos, como o PD-1 presente em linfócitos T e seu ligante PD-L1, frequentemente superexpresso em células tumorais. A interação entre essas moléculas ativa vias celulares que inibem a proliferação e a atividade citotóxica das células T, promovendo a evasão do sistema imunológico pelas células cancerígenas. O bloqueio dessa interação impede a transmissão do sinal supressor e restaura a função dos linfócitos T contra as células neoplásicas (Jiang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021). Esses anticorpos também podem ser conjugados com drogas, unindo a alta especificidade e afinidade do anticorpo ao efeito citotóxico de seus conjugados, evitando toxicidade sistêmica e garantindo maior eficiência no combate às células tumorais (Liu *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o estudo voltado ao desenvolvimento de novas técnicas para o combate ao câncer é imprescindível para contornar os desafios impostos principalmente pela heterogeneidade tumoral. Além disso, a busca pela seletividade e especificidade se mostra importante para evitar efeitos tóxicos sistêmicos. Nesse viés, moléculas naturais – derivadas de plantas e animais – detém potencial como agentes eficazes e pouco tóxicos, podendo ser usados em combinação com técnicas já utilizadas no tratamento do câncer (Sauter, 2020).

1.4 PEÇONHAS DE SERPENTES COMO FONTE DE BIOMOLÉCULAS

As peçonhas de serpentes são compostas por diversas proteínas que representam de 90 a 95% do seu peso bruto, possuindo caráter enzimático e/ou toxicológico (Offor; Piater, 2023; Waheed *et al.*, 2017). Essas peçonhas contêm uma ampla gama de proteínas e peptídeos

encontrados em diferentes combinações e concentrações que, agindo sinergicamente, causam danos locais e sistêmicos em suas vítimas (Estevão-Costa *et al.*, 2018). Cada espécie possui uma composição proteica única em sua peçonha, determinada pela sua idade, sexo, localização geográfica, hábitos e ambiente. O real poder dessa variedade mora na capacidade que uma única peçonha tem de gerar diferentes efeitos tóxicos à vítima, classificados em citotóxicos, hemotóxicos e neurotóxicos (Waheed *et al.*, 2017).

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* são conhecidas por causarem diversos efeitos no local da picada em suas vítimas, como miotoxicidade, hemorragia, necrose, edema, dor e inflamação (Aguiar *et al.*, 2020; Wanderley *et al.*, 2014). As picadas de serpentes desse gênero desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, histamina e serotonina, que atuam diretamente na ativação e sensibilização de nociceptores. Esses mediadores promovem inflamação local e facilitam a transmissão dos estímulos nociceptivos, contribuindo para o desenvolvimento da hiperalgesia observada nos envenenamentos botrópicos (Cavalcante *et al.*, 2021). De acordo com Wanderley *et al.* (2014), a inflamação está diretamente relacionada, embora não seja a única causa, à formação de edemas na região da inoculação da peçonha.

Apesar dos efeitos tóxicos amplamente conhecidos, as toxinas de peçonhas de serpente exibem uma variedade de efeitos notáveis, incluindo atividades antimicrobianas (Samy *et al.*, 2023; Muttiah; Hanafiah, 2025), antivirais (Hboub *et al.*, 2024), antiparasitárias (de Moura *et al.*, 2022) e antitumorais (Offor *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2024; Almeida *et al.*, 2025). Essas características têm despertado o interesse de muitos grupos de pesquisas em explorar profundamente a relação estrutura-função dessas moléculas bioativas, com foco em seu potencial terapêutico.

Com o aprimoramento das técnicas de separação e purificação de proteínas tornou-se possível isolar diferentes componentes de peçonhas de serpente, permitindo caracterizá-las e estudar suas propriedades singulares. Os principais tipos de proteínas presentes nas peçonhas botrópicas são: acetilcolinesterases, L-aminoácido oxidases (LAAO), catalases, hialuronidases, desintegrinas, proteinases e fosfolipases A₂ (PLA₂) (Offor; Piater, 2023; Waheed *et al.*, 2017). Dentre estas, as PLA₂ se destacam por sua abundância e por estarem frequentemente associadas à miotoxicidade, à indução de inflamação e formação de edema, recrutamento de leucócitos e hiperalgesia (Moreira *et al.*, 2011; Zuntini *et al.*, 2023; Aguiar *et al.*, 2020; Cavalcante *et al.*, 2021). Além disso, essas enzimas são amplamente estudadas como agentes terapêuticos contra diversas doenças, sejam elas parasitárias (Grabner *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2019),

microbianas (Samy *et al.*, 2012), virais (Teixeira *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021) ou neoplásicas (Azevedo *et al.*, 2019; Polloni *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2024; Marques *et al.*, 2025).

1.5 FOSFOLIPASES A₂ DE PEÇONHAS OFÍDICAS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

Um dos componentes singulares das peçonhas de serpente são as Fosfolipases A₂. Essas enzimas fazem parte da família de fosfolipases, que são divididas em 5 subgrupos (A₁, A₂, B, C ou D) de acordo com a posição em que realizam a hidrólise de glicerofosfolipídeos (Figura 4). Enzimas do grupo A₂ são acil-hidrolases e catalisam a quebra de ligações éster na posição sn-2, liberando ácidos graxos – principalmente o Ácido Araquidônico (AA) – e lisofosfolipídeos (Aloulou *et al.*, 2018; Sampat *et al.*, 2023). Ainda, as PLA₂ são classificadas de acordo com sua origem ou função: Fosfolipases A₂ citosólicas (cPLA₂), Fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂), Fosfolipases A₂-independentes de Cálcio (iPLA₂), Fosfolipases A₂ lisossomais, Fosfolipases A₂ adiposas e Acetil-hidrolases 2 do fator de ativação plaquetária (PAF-AH₂) (Aloulou *et al.*, 2018). As Fosfolipases A₂ de peçonhas de serpente (svPLA₂) são classificadas como PLA₂ secretadas e subdivididas entre dois grupos, a partir da família de serpentes que foram isoladas: Grupo I, encontradas em membros das famílias *Elapidae* e *Colubridae*; e Grupo II, enzimas das serpentes da família *Viperidae* (Sampat *et al.*, 2023).

Por serem enzimas, as PLA₂ possuem sítio catalítico responsável pela sua ação lipolítica, e nesse sítio encontra-se, de maneira essencial, o íon cálcio (Ca²⁺), cuja presença é indispensável para a estabilização do complexo enzima substrato (Figura 5) e para a clivagem da ligação éster. Em algumas isoformas, podem estar associados outros íons divalentes, como os de zinco (Zn²⁺) ou magnésio (Mg²⁺) que atuam na estabilização estrutural ou na modulação da atividade enzimática (Santos *et al.*, 2024).

Existem dois grupos principais de svPLA₂ descritas nas peçonhas botrópicas: as variantes Asp-49 e Lys-49. As svPLA₂ Asp-49 apresentam ácido aspártico na posição 49, característica que propicia sua atividade catalítica dependente de Ca²⁺. Essas enzimas hidrolisam fosfolipídios de membrana, liberando AA, que atua como precursor para a síntese de eicosanoides, como prostaglandinas e leucotrienos, importantes mediadores inflamatórios. Além disso, svPLA₂ podem exercer efeitos neurotóxicos ao interferirem na membrana pré-sináptica, alterando a liberação de neurotransmissores e contribuindo para bloqueio

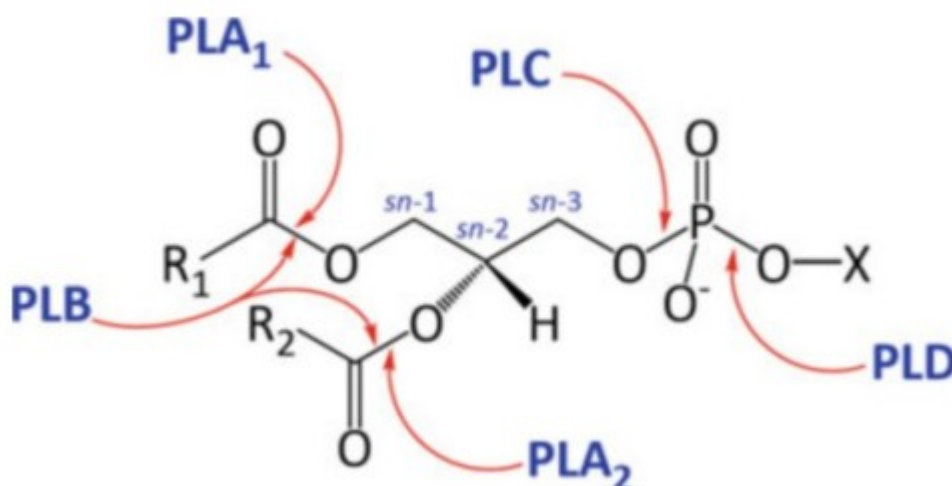


Figura 4: Posições de hidrólise de glicerofosfolípidos de diferentes tipos de fosfolipases A₂. Fonte: Aloulou *et al.*, 2018.

neuromuscular. As svPLA₂ homólogas Lys-49 possuem estrutura semelhante às svPLA₂ Asp-49, porém contêm uma Lisina na posição 49, o que impossibilita a ligação dos íons catiônicos ao sítio ativo e inibe sua atividade catalítica (Santos *et al.*, 2024; Ward *et al.*, 2002). Não obstante, as svPLA₂ homólogas Lys-49 agem por perturbação da membrana celular por vias Ca²⁺-independentes e também possuem atividade miotóxica (Ward *et al.*, 2002).

As svPLA₂ são amplamente referenciadas na literatura e seu potencial é notável, possuindo ações antimicrobianas, antiparasitárias, antitumorais, além de possível aplicação no tratamento de doenças, como as cardiovasculares. O estudo de Frangieh *et al.* (2021) descreve que determinadas svPLA₂ podem contribuir para efeitos hipotensivos sistêmicos. Esse mecanismo está associado à indução da liberação de histamina por mastócitos, que atua predominantemente sobre receptores H1, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A atividade bactericida das svPLA₂, especialmente contra bactérias Gram-positivas, é revisada por Samy *et al.* (2012). Segundo os autores, as PLA₂ e seus peptídeos derivados da porção C-terminal (resíduos 115-129) apresentam potente ação antimicrobiana. Entre as hipóteses para a origem do efeito bactericida estão a “despolarização fatal” da membrana bacteriana, a formação de poros físicos, a alteração da distribuição de lipídeos na bicamada fosfolipídica e o dano a alvos intracelulares após a internalização da proteína ou peptídeo.

Ademais, diversos estudos demonstram a atividade antiparasitária de svPLA₂. A BmatTX-IV, isolada de *Bothrops matogrossensis*, apresentou IC₅₀ de 11,9 µg/mL para *Leishmania (Leishmania) infantum* e 13,8 µg/mL para *Trypanosoma cruzi*, enquanto exibiu menor citotoxicidade frente a fibroblastos murinos (IC₅₀ = 81,2 µg/mL), indicando boa seletividade (Alfonso *et al.*, 2019). De modo semelhante, a BmajPLA₂-II, isolada de *Bothrops*

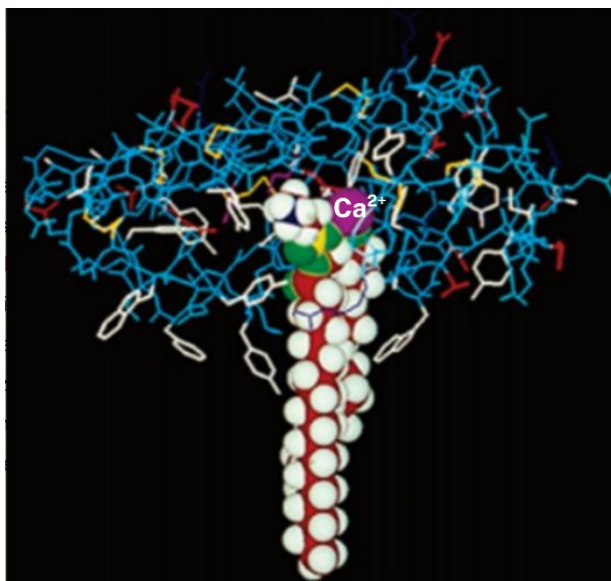


Figura 5: Representação do substrato (modelo de esferas) ligado a uma Fosfolipase A₂ (modelo de bastões) com o auxílio do íon cálcio (representado em roxo). Fonte: Khan; Ilies, 2023.

marajoensis, apresentou atividade anti-Leishmania (7-29%) e contra *T. cruzi* (3-31%) entre as concentrações de 6,25 e 100 µg/mL, além de efeito antimalárico contra *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ = 6,41 µg/mL), com índice de seletividade aproximado de 23,4 em relação à linhagem hepática HepG2 (Grabner *et al.*, 2017). Ainda, PLA₂ isoladas de *Bothrops pauloensis* e *Crotalus durissus terrificus* apresentaram atividade anti-helmíntica – gênero *Strongyloides* – e antiviral – *Chikungunya virus* –, respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021).

Na última década, o potencial terapêutico das svPLA₂ vem sendo demonstrado nos mais diversos âmbitos, especialmente no tratamento de células cancerígenas (Azevedo *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2024; Marques *et al.*, 2025). Azevedo e colaboradores (2019) demonstraram os efeitos *in vitro* da atividade antitumoral da BthTX-II, PLA₂ Asp-49 isolada de peçonha de *Bothrops jararacussu*, sobre células de câncer de mama (MDA-MB-231), com redução significativa da viabilidade celular, atingindo cerca de 50% de inibição nas concentrações mais altas (>100 µg/mL). A toxina também comprometeu a capacidade migratória em 57% e 50% nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, respectivamente, em relação às células controle (linhagem MCF10A). Além disso, em ensaio de invasão, a capacidade invasiva das células tumorais foi reduzida, correspondendo a 60% e 92% nas respectivas concentrações avaliadas. Além disso, a toxina induziu morte celular por apoptose, evidenciada pela modulação de proteínas reguladoras do ciclo celular e de marcadores associados à integridade mitocondrial, indicando o possível envolvimento da via intrínseca apoptótica. Ademais, os experimentos indicaram menor impacto sobre células não tumorais utilizadas como controle, apontando para um perfil de seletividade, fator imprescindível na busca por

novas terapias contra o câncer.

Estudos realizados com a Crotoxina (CrTX), a molécula pioneira de svPLA₂ isolada de *Crotalus durissus terrificus*, revelaram o expressivo potencial biotecnológico dessa classe de enzimas. A revisão de Almeida *et al.* (2023) lista uma ampla gama de efeitos citotóxicos dessa toxina em diferentes linhagens de câncer – incluindo mama, pulmão e cólon –, com destaque para células que apresentam maior expressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), nas quais há indícios de modulação e fosforilação do receptor pela CrTX. Enquanto alguns trabalhos relatam atividade pró-apoptótica da toxina em tumores de mama com receptor de estrogênio positivo (RE+), pulmão e esôfago, por exemplo, outros estudos apontam ação antiapoptótica e indutora de necrose na linhagem de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) (Almeida *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2025). Essas evidências ressaltam tanto o caráter multifacetado da atividade antitumoral da toxina quanto a heterogeneidade metabólica das neoplasias, inclusive entre tumores originados no mesmo órgão, mas com fenótipos distintos.

Santos *et al.* (2024) mostraram os efeitos *in vitro* da atividade antitumoral da MjTX-II, uma PLA₂ Lys-49 isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, no câncer de pulmão – especificamente na linhagem A549 –, reduzindo sua proliferação, adesão (55 e 64% nas concentrações de 20 e 40 µg/mL, respectivamente) e migração. Esses testes, exceto o de migração vertical *Transwell*, apresentaram seletividade quanto a linhagem saudável de pulmão BEAS-2B. Além disso, em testes com Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (linhagem HUVEC), os tratamentos com a toxina reduziram a adesão, migração e, principalmente, a sua capacidade angiogênica, característica fundamental no crescimento e manutenção de massas cancerígenas.

Nesse contexto, compreende-se o potencial das svPLA₂ como candidatas a agentes antitumorais, uma vez que podem exercer citotoxicidade seletiva sobre células tumorais, além de atuar por múltiplos mecanismos, como indução de apoptose, necrose, modulação do ciclo celular, inibição da migração e da angiogênese, que interferem diretamente na progressão tumoral e na formação de metástases. Assim, torna-se fundamental ampliar os estudos acerca dessas toxinas, isoladas de diferentes peçonhas de serpentes, a fim de elucidar seus mecanismos moleculares, explorar sua seletividade e possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento das neoplasias.

1.6 BOTHROPSTOXINA-I DE *Bothrops jararacussu*



Figura 6: Serpente *Bothrops jararacussu*. Foto por Breno Hamdan. Fonte: Brazil; Lira-da-Silva, 2010.

A *Bothrops jararacussu* (Figura 6) pertence à família *Viperidae* e pode ser encontrada entre o sul da Bahia, norte de Santa Catarina e centro-sul do Mato Grosso, também em territórios da Argentina, Paraguai e Bolívia (Brazil; Lira-da-Silva, 2010; Milani *et al.*, 1997). Esta é a maior serpente brasileira de seu gênero, podendo atingir de 2,2 a 2,5 metros de comprimento. É ainda a serpente com maior quantidade de peçonha encontrada em suas glândulas – chegando a até 1 grama de peso bruto (Brazil; Lira-da-Silva, 2010; Milani *et al.*, 1997).

A Bothropstoxina-I (BthTX-I – Figura 7A) é uma das principais toxinas da peçonha de *B. jararacussu* compreendendo cerca de 25% do conteúdo proteico total (Soares *et al.*, 2000). É uma PLA₂ homóloga Lys-49, organizada como um homodímero com 137 aminoácidos em cada cadeia e massa molecular de 13,7 kDa (da Silva *et al.*, 2015; Bezerra *et al.*, 2019; The Uniprot Consortium, 2025). Suas cadeias possuem 7 pontes dissulfeto distribuídas entre os resíduos 42 e 137 (The Uniprot Consortium, 2025), são compostas por 4 alfa-hélices e 1 folha- β (Figura 7B), essas também responsáveis por manter a interface dos homodímeros, especificamente pela interação eletrostática da alfa-hélice N-terminal de uma cadeia com a folha- β da outra. Esse contato também funciona como uma “dobradiça” molecular, que permite o trânsito da molécula em conformações denominadas de “aberta” e “fechada”, fenômeno que altera a situação de exposição de regiões envolvidas na interação com membranas (da Silva

Nesse contexto, Gebrim e colaboradores (2009) utilizaram a região C-terminal da BthTX-I para sintetizar peptídeos perturbadores de membrana que apresentaram citotoxicidade *in vitro* sobre células de adenocarcinoma mamário (SKBR3) e de leucemia linfoblástica aguda de células T (Jurkat). Além disso, estudos *in vivo* com esses peptídeos também apontaram redução tumoral de até 79% após 60 dias em modelos murinos de sarcoma (S180).

Apesar da ausência de atividade catalítica, PLA₂ homólogas Lys-49 como a BthTX-I têm sido descritas em diferentes trabalhos exibindo maior atividade antitumoral do que sua isoforma Asp-49 em determinados modelos experimentais. Em estudo conduzido por Sasovsky *et al.* (2024), foram comparadas as atividades citotóxicas e antimetastáticas de duas PLA₂ isoladas de *Bothrops diporus*, uma PLA₂ Asp-49 cataliticamente ativa e outra homóloga Lys-49 cataliticamente inativa, utilizando a linhagem murina de carcinoma mamário LM3. Os resultados evidenciaram que a isoforma Lys-49 apresentou efeitos significativamente superiores, especialmente àqueles relacionados a ação metastática. No ensaio de adesão celular, a Lys-49 promoveu aproximadamente 75% de redução na capacidade invasiva na concentração de 50 µg/mL, enquanto a Asp-49 atingiu cerca de 10%. De modo semelhante, nos ensaios de migração celular, a Lys-49 – a uma concentração de 25 µg/mL – reduziu a migração em cerca de 70% no modelo de migração horizontal por *Wound Healing* e aproximadamente 60% no modelo de migração vertical por *Transwell*, enquanto a Asp-49 obteve inibições próximas de 20% com a mesma concentração.

Ademais, evidências experimentais também sugerem maior efeito citotóxico das isoformas cataliticamente inativas de PLA₂. Em estudos conduzidos com a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, foram testadas as toxinas BnSP-6, PLA₂ homóloga Lys-49 de *Bothrops pauloensis*, e a BthTX-II, PLA₂ Asp-49 de *Bothrops jararacussu*. Enquanto a BnSP-6 apresentou IC₅₀ de 52,24 µg/mL, a PLA₂ cataliticamente ativa não atingiu 50% de inibição nas concentrações testadas (6,25 - 100 µg/mL), indicando IC₅₀ superior a 100 µg/mL (Silva *et al.*, 2018; Azevedo *et al.*, 2019). Murakami *et al.* (2011) compararam os efeitos citotóxicos da BPII, PLA₂ homóloga Lys-49, e de uma PLA₂ Asp-49, ambas isoladas de *Protobothrops flavoviridis*, sobre células leucêmicas humanas (Jurkat). Os resultados confirmaram maior atividade citotóxica da isoforma cataliticamente inativa, uma vez que a PLA₂ Asp-49 não foi capaz de induzir morte celular nas condições experimentais avaliadas, enquanto a BPII promoveu efeitos citotóxicos de maneira tempo e dose-dependente.

Diante do exposto, a BthTX-I demonstra potencial biotecnológico no contexto antitumoral, evidenciados por sua capacidade de induzir morte celular e atuar em mecanismos

associados à progressão tumoral, como adesão, migração e angiogênese. Embora cataliticamente inativa, sua região C-terminal rica em resíduos catiônicos confere elevada afinidade por membranas tumorais aniônicas, favorecendo sua desestabilização. Além disso, a mais evidente citotoxicidade frequentemente observada entre as PLA₂ homólogas Lys-49 em comparação às Asp-49 reforça que a atividade antineoplásica dessas toxinas pode estar mais relacionada a propriedades estruturais e interações de membrana do que à atividade enzimática; porém, a literatura ainda carece de estudos dessa toxina sobre linhagens carcinogênicas como o câncer de pulmão.

Portanto, a fim de corroborar com a busca por novas terapias contra o câncer de pulmão – a mais letal neoplasia no mundo (Bray *et al.*, 2024) –, com ênfase na prevenção da metástase, é imprescindível o estudo de biomoléculas naturais com potencial antitumoral e antimetastático, que contribuem ainda para a redução de efeitos colaterais. Neste cenário, a BthTX-I emerge como um modelo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer baseadas em toxinas isoladas de peçonhas de serpentes. Neste trabalho, buscamos caracterizar, de maneira pioneira, o potencial antitumoral e antimetastático da BthTX-I sobre linhagens de adenocarcinoma pulmonar de células não-pequenas (A549).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citotóxicos da BthTX-I sobre células de carcinoma pulmonar humano (A549) e células epiteliais pulmonares não neoplásicas (BEAS-2B), investigando sua influência sobre a viabilidade celular, bem como sobre os processos de adesão e migração celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e avaliar a homogeneidade da Fosfolipase A₂ homóloga Lys49 (BthTX-I) proveniente da peçonha de *Bothrops jararacussu*;
- Investigar os efeitos da BthTX-I sobre a viabilidade de células de carcinoma pulmonar e de células epiteliais pulmonares não tumorais;
- Analisar o impacto da BthTX-I na sobrevivência celular;
- Avaliar a capacidade da BthTX-I de interferir em processos celulares associados à progressão tumoral, especialmente adesão e migração celular.

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DA PEÇONHA E PURIFICAÇÃO DA BthTX-I

A peçonha bruta foi coletada da serpente *Bothrops jararacussu* mantida no Banco de Venenos da Fiocruz Rondônia/UNIR, Porto Velho, RO, sob autorização de licenças do governo local: CGEN/AFCAB61; SISBIO 64385-1; IBAMA nº 27131-3 e CGEN/CNPq 010627/2011-1. Este estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A2C2534. A purificação da BthTX-I foi feita de acordo com metodologia descrita por Azevedo *et al.* (2019), com modificações. Brevemente, 200 mg de peçonha foram homogeneizados em 2,0 mL de tampão Bicarbonato de Amônio (NH_4HCO_3) 0,05M em pH 7,8, ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M. Após completamente diluída, a solução foi centrifugada a 3000 g por 10 minutos a 4°C, seu sobrenadante recuperado foi então aplicado em resina de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow (Cytiva, Brasil) em coluna cromatográfica de proporções 300 x 10 mm. A corrida foi realizada a um fluxo de 9 mL/h de tampão de Bicarbonato de Amônio 0,05M, pH 7,8, coletando-se aproximadamente 1,5 mL por tubo a cada 11 minutos. As absorbâncias de cada tubo foram lidas em espectrofotômetro (GENESYS 50; Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA) a 280 nm e o gráfico plotado via Microsoft Excel (Microsoft 365, versão 16.0). O pico relativo à BthTX-I foi separado, liofilizado, ressuspendido, dosado (Bradford, 1976) e aliquotado para posterior utilização nos experimentos.

3.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para determinar a pureza das amostras de BthTX-I, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (#4561096, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) com a presença de SDS-PAGE. Cerca de 10 µg de amostra foram dissolvidos em 15 µL de tampão de amostra contendo 10% do agente redutor beta-mercaptoetanol. A corrida foi realizada no sistema de eletroforese Mini-PROTEAN® Tetra Vertical para Mini Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) a 160V, 30 mA por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Após, as bandas de proteína foram coradas em solução de *Coomassie Brilliant Blue* G-250® 0,25% (m/v), metanol 45% e ácido acético 10% (v/v) por 4 h. Por fim, o excesso de corante foi retirado por imersão em solução descorante de ácido acético 7% (v/v) e etanol 30% (v/v) até que as bandas estivessem visíveis. Como referência das massas das bandas, foi utilizado um padrão molecular com as seguintes proteínas: β-galactosidase, 116

kDa; albumina sérica bovina, 66,2 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; lactato desidrogenase, 35 kDa; REase Bsp98I, 25 kDa; lisozima, 14,4 kDa.

3.3 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares brônquicas epiteliais humanas imortalizadas (BEAS-2B) (CRL-3588TM; Manassas, VA, EUA) e de carcinoma pulmonar (A549) (CCL-185TM; Manassas, VA, EUA) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), cultivadas em garrafas de cultura celular e mantidas em incubadora à 37°C e 5% de CO₂, com meio RPMI-1640 completo (Sigma, Brasil), sendo este suplementado com L-glutamina 2 mM, bicarbonato 0,2% (m/v), 1% de penicilina/estreptomicina, Hepes 25mM e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Sigma, Brasil).

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5). As linhagens celulares A549 e BEAS-2B foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 3×10^4 células/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ para permitir a adesão celular. Após esse período, o meio foi substituído por meio completo contendo diferentes concentrações de BthTX-I (0,39-100 µg/mL), enquanto o grupo controle recebeu apenas meio RPMI completo, conforme descrito por Polloni *et al.* (2021).

Após 24 h de incubação (37°C, 5% de CO₂), foram adicionados 10 µL por poço de solução de MTT (5 mg/mL), e as placas foram incubadas por mais 3 h para permitir a formação de cristais de formazan resultantes da redução metabólica do MTT por células viáveis. Em seguida, 100 µL de solução contendo SDS 10% e HCl 0,01M foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. Após 24 h, a densidade óptica foi determinada a 570 nm utilizando leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA).

3.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

O ensaio de liberação da enzima LDH foi realizado de acordo com metodologia descrita por Legrand *et al.* (1992), com modificações. As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços (3×10^4 células/poço) por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, um novo meio contendo BthTX-I (0,39; 6,25 e 25 µg/mL) ou meio (controle negativo) foi adicionado e incubado sob as mesmas condições por 24 h, e os meios foram então coletados. Seguindo as

instruções do kit Desidrogenase Láctica LDH UV (Bioclin), foi produzida uma solução de trabalho com 4 partes do reagente 1 – referente ao substrato tamponado (Tampão < 200 mmol/L, Piruvato < 6 mmol/L, estabilizante e conservante) – para 1 parte do reagente 2 – referente à coenzima (Tampão < 100 mmol/L, NADH < 5 mmol/L e conservante). 20 µL dessa solução foram adicionados em cada meio correspondente aos tratamentos e controles em outra placa de 96 poços. Após incubação de 1 minuto em leitora de placas previamente aquecida a 37°C, a mistura foi lida a 370 nm e os valores verificados com intervalo de 2 minutos. Os valores obtidos foram colocados na equação presente no kit após adaptação para a leitura em microplaca ($LDH (U/L) = \Delta A/min \times 5250 - \Delta A$: diferença das absorbâncias nos dois tempos ($A1 - A2$); min = tempo em minutos entre as leituras) e em seguida analisados.

3.6 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

A capacidade multiplicativa das células A549 e BEAS-2B foi testada a partir do ensaio de clonogenicidade – ou formação de colônias – de acordo com Polloni *et al.* (2021). As células foram semeadas em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço) e tratadas com BthTX-I (0,39; 6,25 e 25 µg/mL) ou meio RPMI 1640 (grupo controle) por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e replaqueadas em microplacas de 6 poços (100 células/poço) e incubadas por 2 semanas a 37°C e 5% de CO₂. Terminada a incubação, o meio foi removido e os poços lavados cuidadosamente com PBS 1x, as células então foram fixadas com metanol 100% (mantido em freezer a -4°C por 10 minutos) por 10 minutos e coradas, utilizando os três reagentes presentes no Kit Panótico Rápido (Laborclin; Vargem Grande, PR, Brasil): Reagente 1 (contendo 1g de triarilmetano por 1000 mL de metanol), Reagente 2 (contendo 1g de xantenos por 1000 mL de água deionizada) e Reagente 3 (contendo 1g de tiazinhas por 1000 mL de água deionizada), adicionando 1 mL do reagente por poço por 5 segundos, nessa ordem, lavando com PBS 1x ao final. As colônias foram observadas e aquelas que continham mais de 50 células foram contabilizadas.

3.7 INIBIÇÃO DE ADESÃO CELULAR

Para avaliar a inibição da adesão celular pela BthTX-I, células de A549 e BEAS-2B (3×10^4 células/poço) foram pré-incubadas com diferentes concentrações de BthTX-I (0,39 e 6,25 µg/mL) ou meio (grupo controle) por 30 minutos a 37°C, elas foram então incubadas durante 3 h a 37°C em 5% de CO₂. As células não ligadas foram removidas por lavagem com PBS e as

células aderidas quantificadas pelo ensaio MTT conforme descrito anteriormente.

3.8 ENSAIO DE WOUND HEALING

A inibição da migração das linhagens foi medida por ensaio de cicatrização de feridas segundo metodologia descrita por Jung (2013) com modificações de Gimenes *et al.* (2017). As células foram semeadas em placas de 24 poços (3×10^5 células/poço) e, após 24 h, o meio foi descartado e foi realizado um corte na monocamada com a ponta de ponteira de 200 μ L para produzir uma região sem células. Após, as células foram tratadas com a BthTX-I (0,39 e 6,25 μ g/mL) ou com meio controle por 24 e 48 horas. O resultado foi observado em microscópio óptico invertido e fotografado utilizando câmera do modelo 2K48MP (Digilab, Brasil). Três pontos distintos de cada poço foram escolhidos e fotografados diariamente (0, 24 e 48 horas) e analisadas manualmente pelo software ImageJ online, onde calculou-se a área da ferida nos três tempos.

3.9 MIGRAÇÃO CELULAR POR ENSAIO TRANSWELL

Para avaliar a inibição da migração e invasão celular, foi utilizada a câmara Transwell com membrana de 8 μ m de acordo com Oliveira *et al.* (2026). As células foram pré-incubadas com a BthTX-I (0,39 e 6,25 μ g/mL) por 30 minutos 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 adicionado meio com 10% de SFB como quimioatrativo para as células no compartimento inferior. Nos grupos controle negativo, a camada inferior foi preenchida com meio de cultura sem soro fetal bovino. O excesso de células na parte superior da câmara Transwell foram retiradas com auxílio de um *swab* e as células migradas foram coradas com Kit Panótico Rápido (Laborclin, Brasil), como descrito anteriormente, fotografadas e contadas.

3.10 ANÁLISE E TRATAMENTO DE DADOS

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism Software versão 8.0. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As variáveis foram analisadas com testes específicos, paramétricos ou não paramétricos, de acordo com a distribuição dos dados. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é a neoplasia mais letal e uma das que mais acometem pessoas no mundo todo, porém, como muitos tumores, seu tratamento ainda resulta em problemas sistêmicos que afetam a qualidade de vida do paciente devido à invasividade e exposição a substâncias tóxicas não seletivas às células cancerígenas. Por isso, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da toxina homóloga a Fosfolipase A₂ Lys-49 BthTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* sobre células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) e células epiteliais alveolares normais humanas (BEAS-2B).

4.1 ISOLAMENTO DA BthTX-I

Para avaliar os efeitos antitumorais e antimetastáticos da BthTX-I nas linhagens de pulmão, esta proteína foi primeiramente purificada da peçonha de *B. jararacussu* por cromatografia em CM-Sepharose de acordo com Andrião-Escarso *et al.* (2000 e 2002). O perfil cromatográfico revela 6 frações nomeadas CM1 a CM6 (Figura 8A). A homogeneidade da PLA₂ BthTX-I (fração CM6) foi analisada por SDS-PAGE (Figura 8B), revelando a presença de uma banda única na faixa de 14 kDa, correspondente à massa molecular da BthTX-I.

A BthTX-I possui ponto isoelétrico de 8,2 (da Silva *et al.*, 2015) e, portanto, está parcialmente protonada e possui carga geral positiva no tampão escolhido – Bicarbonato de Amônio, pH 7,8 – associando-se fortemente à resina, a qual possui natureza aniônica (carregada negativamente). Por isso, a toxina é eluída apenas na maior concentração de tampão Bicarbonato de Amônio (0,5M). A fração CM6 (correspondente à BthTX-I) apresentou um pico uniforme e bem acentuado, indicando boa separação da toxina dos outros componentes da peçonha. O conteúdo dos tubos da fração CM6 foram recolhidos, concentrados por liofilização e dosados. O retorno aproximado de toxina após a cromatografia foi de 17%: 34 µg isolados de BthTX-I de 200 µg totais (peçonha bruta aplicada à coluna). Foi realizada a análise de homogeneidade da amostra por eletroforese, apresentada na Figura 8B. A terceira coluna do gel é referente à fração CM6, apresentando homogeneidade e posição próxima ao peso molecular da BthTX-I (~14 kDa), indicando bom isolamento e homogeneidade da amostra.

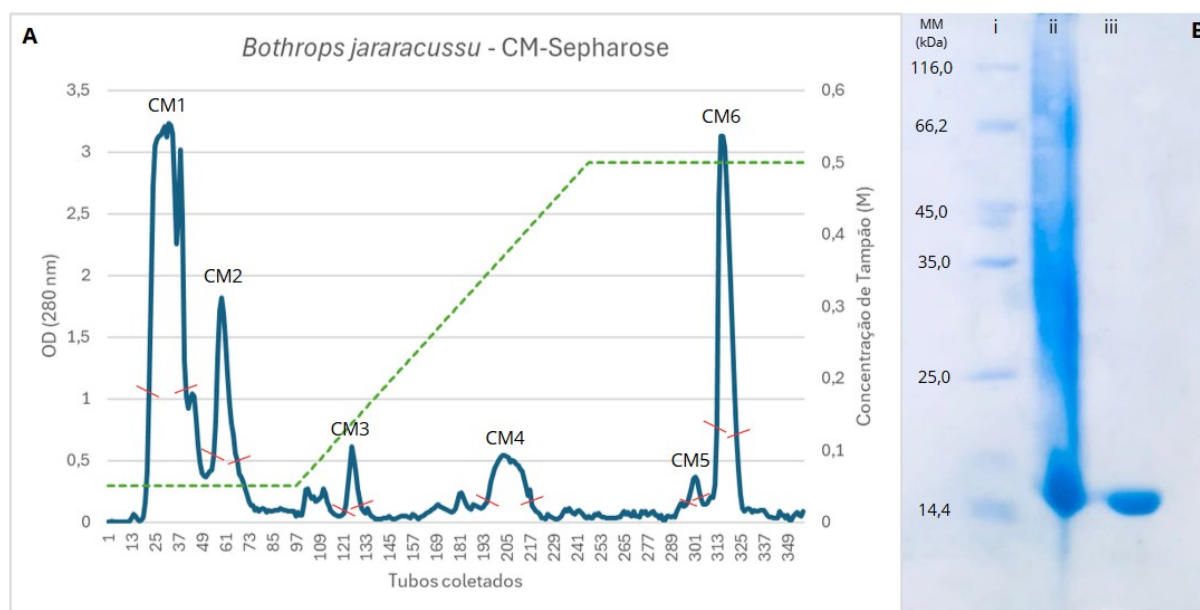


Figura 8. Purificação da BthTX-I da peçonha de *Bothrops jararacussu*. (A) Cromatografia de troca iônica em resina CM-Sepharose fast flow equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (0,05M). A eluição ocorreu com tampão bicarbonato de amônio (0,5M) em um fluxo de 9,0 mL/h a 25°C. O pico CM6 representa a toxina homóloga a PLA₂ Lys-49, BthTX-I. As linhas em vermelho representam as posições dos cortes para separação dos tubos de cada fração. (B) SDS-PAGE 12,5% com (i) padrão de massa molecular: β-galactosidase, 116 kDa; albumina sérica bovina, 66,2 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; lactato desidrogenase, 35 kDa; REase Bsp98I, 25 kDa; lisozima, 14,4 kDa; (ii) peçonha bruta de *B. jararacussu*; e (iii) fosfolipase BthTX-I.

4.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA

A citotoxicidade induzida pela BthTX-I sobre as linhagens de pulmão foi testada, à priori, por ensaio de MTT, nas concentrações de 0,39 a 100 µg/mL. Os resultados demonstram diferença estatística significativa em ambas as linhagens a partir de 1,56 µg/mL (Figura 9). Interessantemente, o efeito citotóxico avaliado por este ensaio foi mais expressivo na linhagem não tumoral (BEAS-2B), apresentando IC₅₀ de 7,547 em contraste com o IC₅₀ de 17,74 sobre células da linhagem A549 (IS = 0,425). Cedro *et al.* (2018) observaram resultados semelhantes com a BJ-PLA₂-I (PLA₂ Asp-49) de *Bothrops moojeni*, que induziu maior citotoxicidade a células não-tumorais – células mononucleares do sangue periférico (PBMC) – em relação às células de leucemia promielocítica humana (HL-60) e de carcinoma hepático humano (HepG2). No entanto, outros estudos realizados com toxinas PLA₂ homólogas Lys-49 em células tumorais evidenciaram caráter seletivo dessas moléculas (Silva *et al.*, 2018; Azevedo *et al.*, 2016).

O ensaio de MTT avalia a atividade metabólica celular por meio da redução do sal tetrazólio por redutases mitocondriais (Kumar *et al.*, 2018), podendo superestimar a viabilidade celular em linhagens tumorais devido à sua elevada atividade mitocondrial durante a incubação com o substrato.

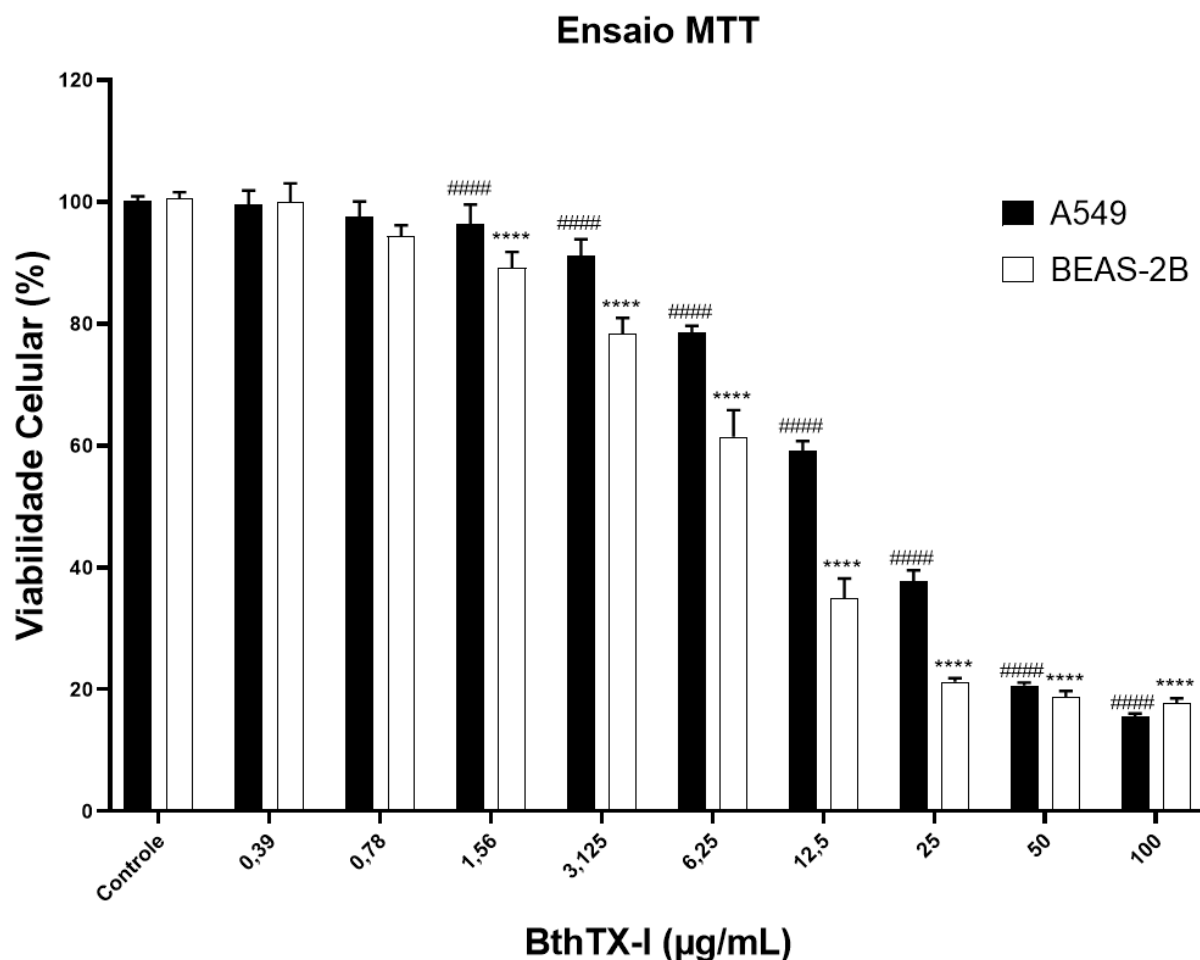


Figura 9. Ensaios de citotoxicidade por MTT. Células das linhagens A549 e BEAS-2B foram cultivadas em meio RPMI contendo FBS 10% em microplacas de 96 poços (3×10^4 células/poço) e tratadas com diferentes concentrações de BthTX-I (0,39-100 µg/mL) ou meio completo (controle) por 24 horas. Após, foram adicionados 10 µL de solução PBS contendo MTT 5 mg/mL por 3 horas. Os cristais de formazan foram dissolvidos com 100 µL de solução contendo 10% SDS e 0,01N de Ácido Clorídrico (HCl) em PBS por 18 horas. A absorbância foi determinada utilizando uma leitora de placas (MultiskanGO, Thermo Scientific™) a um feixe de 570 nm. Os dados estão apresentados em porcentagem. A estatística foi analisada comparando os tratamentos e seus respectivos controles (#: A549; *: BEAS-2B). #####p<0,0001; ****p<0,0001.

Com base nos resultados de viabilidade celular, as concentrações testadas foram classificadas em três categorias de citotoxicidade: baixa ou ausente (> 80% de viabilidade; 0,39-3,125 µg/mL), intermediária (80-40% de viabilidade; 6,25 e 12,5 µg/mL) e alta (< 40% de viabilidade; 25-100 µg/mL). A partir dessa classificação, foi selecionada uma concentração representativa das categorias de baixa ou ausente e média citotoxicidade: 0,39 µg/mL e 6,25 µg/mL, respectivamente. A escolha dessas concentrações buscou representar cada faixa de citotoxicidade, minimizando a interferência de efeitos citotóxicos nos ensaios posteriores.

A fim de corroborarmos os efeitos citotóxicos da BthTx-I sobre as duas linhagens em estudo, a dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) também foi avaliada. A liberação de LDH no meio extracelular é um marcador amplamente utilizado para a detecção de morte celular, principalmente nos estágios de necrose e apoptose tardia. A LDH é uma enzima envolvida no metabolismo glicolítico, que permanece confinada ao interior celular em

condições fisiológicas. Quando há perda da integridade da membrana plasmática – seja por dano estrutural direto, aumento de permeabilidade ou ruptura completa – a enzima é liberada para o meio extracelular (Kabakov *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018). Dessa forma, a quantificação da atividade de LDH no sobrenadante de culturas celulares constitui um método de avaliação do dano de membrana e citotoxicidade direta, como indicativo de morte necrótica ou de estágios finais de apoptose. O ensaio de LDH foi realizado com as concentrações previamente definidas (0,39, 6,25 e 25 µg/mL) e estão apresentados na Figura 10A.

Em contraste com os resultados obtidos no ensaio de MTT, observou-se aumento significativo na liberação de LDH na linhagem tumoral quando tratada com a menor concentração da toxina (0,39 µg/mL; $p < 0,05$), enquanto não foi detectada diferença estatisticamente significativa na linhagem não tumoral. Em concentrações mais elevadas, os resultados de ambos os ensaios (MTT e LDH) mostraram-se concordantes, indicando elevada citotoxicidade da toxina em ambas as linhagens celulares.

De maneira semelhante, o ensaio de formação de colônias complementa a avaliação de citotoxicidade, pois reflete a capacidade de recuperação da linhagem frente ao tratamento com a toxina, demonstrando se há reversibilidade do dano causado pela molécula (Adan *et al.*, 2016). Este ensaio foi realizado com as mesmas concentrações selecionadas anteriormente e os resultados estão apresentados na Figura 10B. Pôde-se observar diminuição estatisticamente significativa na formação de colônias da linhagem tumoral em relação ao seu controle sem tratamento nas concentrações (0,39 µg/mL; $p < 0,01$ e 6,25 µg/mL; $p < 0,0001$). Ensaios clonogênicos realizados por Santos e colaboradores (2024) com a mesma linhagem (A549) tratada com uma PLA₂ homóloga Lys-49 de *Bothrops moojeni*, MjTX-II, evidenciam efeitos antiproliferativos semelhantes em concentrações mais elevadas de toxina (40 µg/mL) e mostrando seletividade à célula tumoral.

Em síntese, a BthTX-I demonstrou potencial antitumoral seletivo na menor concentração testada (0,39 µg/mL). Posteriormente, foi avaliada a atividade antimetastática da toxina nas concentrações de 0,39 e 6,25 µg/mL.

4.3 ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA

Estudos recentes na literatura evidenciam o caráter antimetastático de PLA₂ homólogas Lys-49 em células de câncer (Azevedo *et al.* 2019; Proleón *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2024). Portanto, para avaliar este potencial da toxina BthTX-I, ensaios de adesão e migração celular –

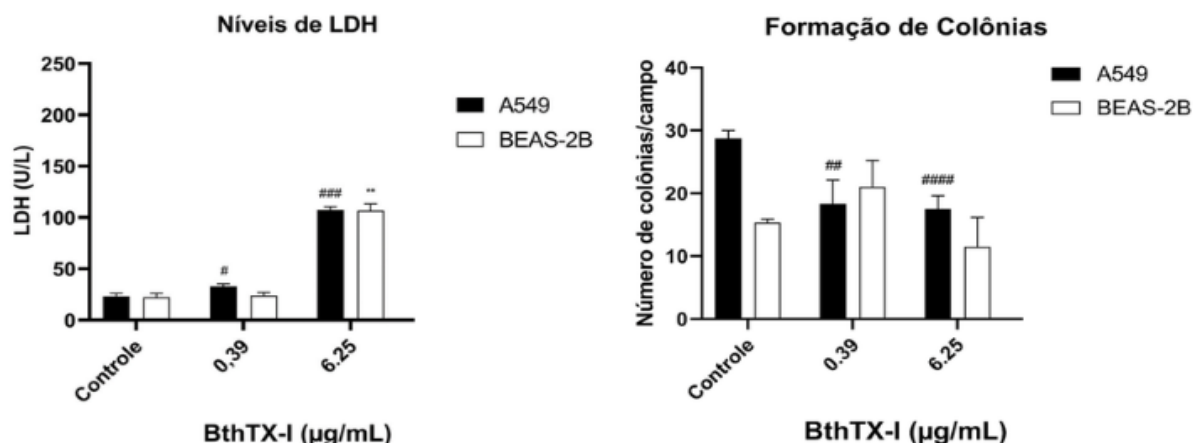


Figura 10. Ensaios complementares de citotoxicidade. (A) Ensaio de morte por liberação de LDH. Células das linhagens A549 e BEAS-2B foram cultivadas em microplacas de 96 poços (3×10^4 células/poço) por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, um novo meio contendo BthTX-I (0,39 e 6,25 µg/mL) ou 10% FBS (controle negativo) foi adicionado e incubado sob as mesmas condições por 24 horas, e o sobrenadante então foi coletado. A LDH presente no sobrenadante foi quantificada seguindo as instruções do kit Desidrogenase Láctica LDH UV (Bioclin) em leitora de placas previamente aquecida a 37°C a 370 nm. Os dados estão apresentados em Unidades Enzimáticas/Litro. (B) Ensaio de formação de colônias. Células das linhagens A549 e BEAS-2B foram semeadas em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço) e tratadas com BthTX-I (0,39 e 6,25 µg/mL) ou meio completo (grupo controle) por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e replaqueadas em microplacas de 6 poços (100 células/poço) e incubadas por 2 semanas a 37°C e 5% de CO₂. Por fim, as células foram fixadas com metanol frio e coradas utilizando o Kit Panótico Rápido (Laborclin; Vargem Grande, PR, Brasil). As colônias que possuíam mais de 50 células foram contadas. Os resultados estão apresentados como número de colônias/poço. A estatística foi analisada comparando os tratamentos e seus respectivos controles (#: A549; *: BEAS-2B). #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001; ####p<0,0001; **p<0,01; ****p<0,0001.

Wound Healing e Transwell – foram realizados. As duas concentrações avaliadas (0,39 e 6,25 µg/mL) geraram leves efeitos inibitórios na adesão celular de ambas as linhagens, em que os valores permaneceram acima de 80% de adesão. No entanto, a concentração de 0,39 µg/mL, promoveu efeito inibitório estatisticamente significativo apenas na linhagem tumoral (Figura 11).

Ainda, os resultados dos ensaios de migração reforçam o efeito seletivo quando foi utilizada a concentração de 0,39 µg/mL. Na Figura 12 estão representados os resultados do ensaio de Wound Healing, em que se observou avanço gradual no fechamento das feridas ao longo de 24 e 48 horas. As células tumorais apresentaram redução significativa na capacidade migratória horizontal após 48 horas de tratamento em todas as concentrações. Comportamento semelhante foi observado no ensaio de migração em Transwell (Figura 13), em que a menor concentração testada (0,39 µg/mL) foi efetiva na redução do deslocamento vertical das células A549, não refletindo em mudanças significativas na migração da linhagem BEAS-2B. Interessantemente, não houve inibição significativa na concentração de 6,25 µg/mL.

Santos *et al.* (2024) demonstraram que a MjTX-II, uma PLA₂ homóloga Lys-49 isolada de *Bothrops moojeni*, reduziu a adesão de células de adenocarcinoma pulmonar A549 em 55% e 64% nas concentrações de 20 e 40 µg/mL, respectivamente. Além disso, houve diminuição

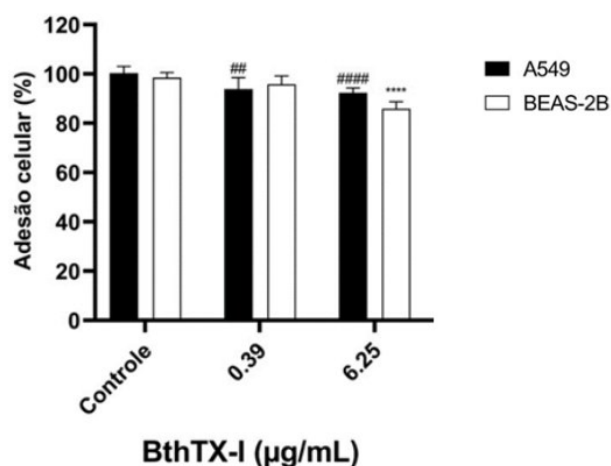


Figura 11. Ensaio de adesão celular. As linhagens A549 e BEAS-2B (3×10^4 células/poço) foram pré-incubadas com diferentes concentrações de BthTX-I (0,39 e 6,25 µg/mL) ou meio completo (grupo controle) por 30 minutos a 37°C, elas foram então incubadas durante 3 horas a 37°C em 5% de CO₂. Os dados estão apresentados em porcentagem. A estatística foi analisada comparando os tratamentos e seus respectivos controles (#: A549; *: BEAS-2B). ^{##}p<0,01; ^{####}p<0,0001; ^{****}p<0,0001.

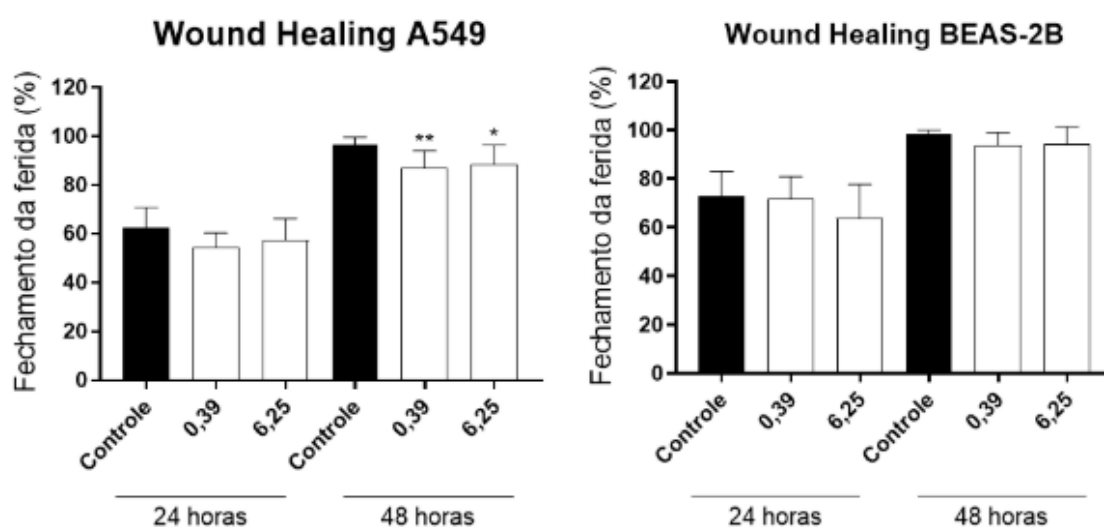


Figura 12. Ensaio de migração Wound Healing. Células das linhagens A549 (A) e BEAS-2B (B) foram cultivadas em placas de 24 poços (3×10^5 células/poço) e, após 24 horas, o meio foi descartado e foi realizado um corte na monocamada com a ponta de ponteira de 200 µL para produzir uma região sem células. Após, as células foram tratadas com a BthTX-I (0,39 e 6,25 µg/mL) ou com meio controle por 48 horas. O resultado foi observado em microscópio óptico invertido e fotografado utilizando câmera do modelo 2K48MP (Digilab, Brasil) nos três tempos (0, 24 e 48 horas). A estatística foi analisada comparando os tratamentos e seus respectivos controles. ^{*}p<0,05; ^{**}p<0,001; ^{***}p<0,000.

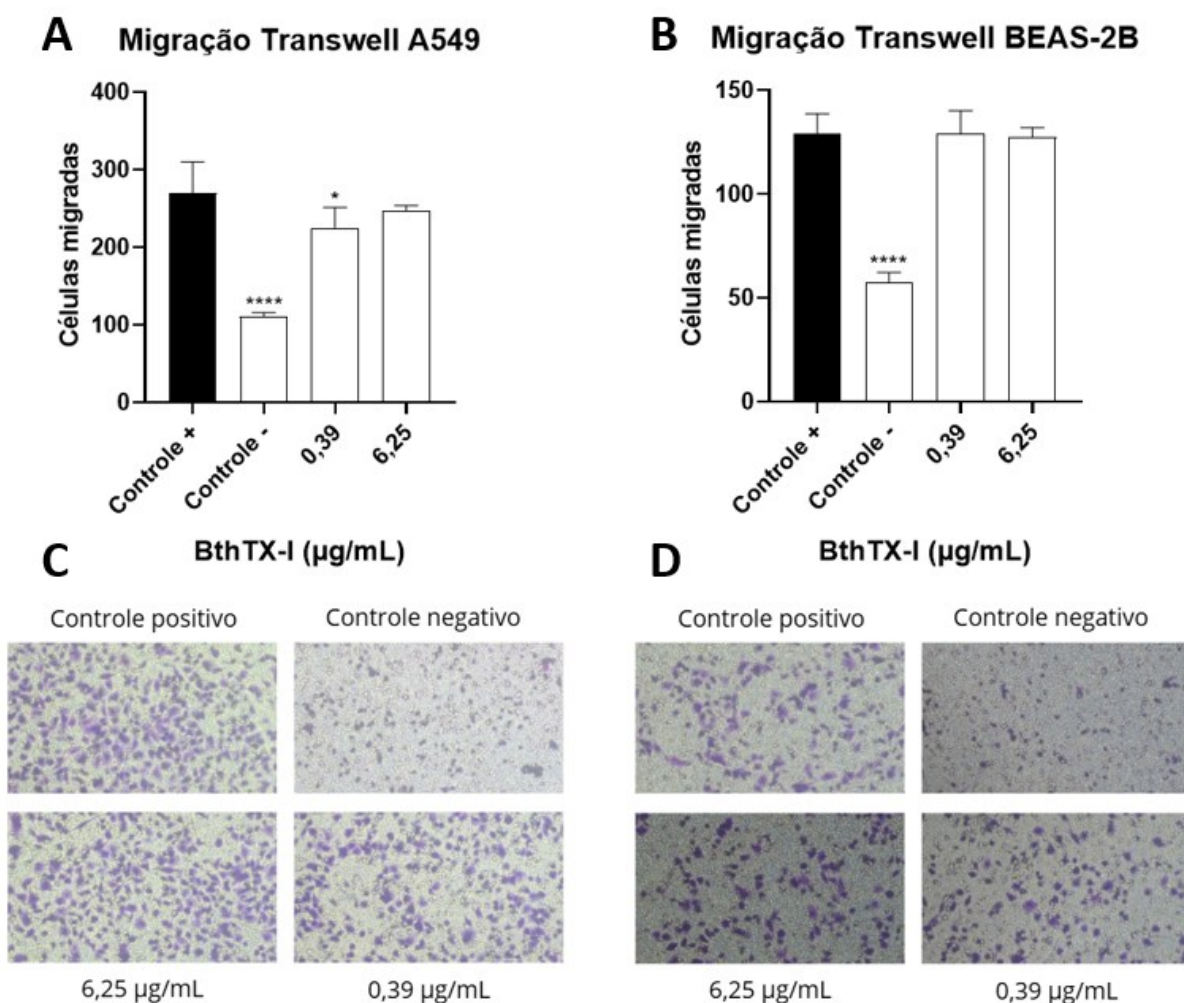


Figura 13. Ensaio de migração por Transwell. Células da linhagem A549 (A) e BEAS-2B (B) foram pré-incubadas com a BthTX-I (0,39 e 6,25 µg/mL) por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂ em meio de cultura sem SFB. Após a incubação, 7×10^4 célula/poço foram semeadas na parte superior da câmara dos inserts e adicionado meio com 10% de SFB como quimioatrato para as células no compartimento inferior. Nos grupos controle negativo, a camada inferior foi preenchida com meio de cultura sem soro fetal bovino. As células migradas foram coradas com com Panotic Kit (Laborclin, Brasil), fotografadas e contadas. (C e D) Imagens da migração vertical das linhagens A549 e BEAS-2B, respectivamente. As células coradas estão representadas em roxo. A estatística foi analisada comparando os tratamentos e o controle positivo. *p<0,05; ****p<0,0001.

significativa da migração nos ensaios de Wound Healing e Transwell na maior concentração testada (40 µg/mL).

De modo semelhante, Azevedo *et al.* (2016) relataram que uma PLA₂ homóloga Lys-49 isolada de *Bothrops pauloensis* promoveu redução significativa da adesão (60-75% de inibição, entre 3,12 e 50 µg/mL) e da migração em ensaio de Wound Healing na linhagem de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231, especialmente na maior concentração avaliada (50 µg/mL).

A migração celular tumoral é um processo essencial para a metástase e, embora esteja relacionada à adesão celular, envolve mecanismos regulatórios adicionais além da simples capacidade de adesão ao substrato. Estudos demonstram que a dinâmica de adesões focais e o

movimento de integrinas são determinantes para a motilidade celular. Nesse contexto, a ativação da proteína endocítica Rab5 mediada pela fosforilação da Quinase de Adesão Focal (FAK) – enzima superexpressa em tumores e em lisados de tecidos de pacientes com metástase tumoral (Meng *et al.*, 2009) –, desencadeada pela interação entre integrinas e a matriz extracelular, é um passo importante para a migração celular efetiva. A Rab5 participa da endocitose e da reciclagem de integrinas, permitindo a realocação das adesões focais durante o deslocamento celular (Arriagada *et al.*, 2019). Assim, a redução significativa da migração observada nas células A549 nas concentrações testadas, mesmo na inibição sutil da adesão, pode indicar interferência em etapas posteriores do mecanismo migratório.

Ademais, o trabalho de Santos *et al.* (2024) relatou a capacidade da MjTX-II de alterar o padrão do citoesqueleto de actina de células A549, mecanismo também descrito em outros estudos com células tumorais como determinante para a motilidade (Chen *et al.*, 2018; Anupriya; Nandita; Srinivas, 2024), revelando outra possível via de atuação das PLA₂ homólogas Lys-49 na migração celular.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, a BthTX-I foi isolada com sucesso da peçonha de *Bothrops jararacussu* e apresentou homogeneidade. Ademais, a toxina demonstrou potencial antitumoral ao atuar em processos fundamentais para a progressão tumoral e metástase, reduzindo com seletividade a viabilidade, adesão e migração de células de adenocarcinoma pulmonar (A549) na menor concentração avaliada (0,39 µg/mL). Não obstante, futuros estudos acerca da atividade inibitória de invasão em componentes da matriz extracelular e ensaios de apoptose e necrose podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de morte desencadeados pela toxina, bem como sua capacidade de inibir a transição epitélio-mesenquimal do câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>.

AGUIAR, W. S. *et al.* Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, v. 186, p. 67-77, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.030>.

ALFONSO, J. J. *et al.* Isolation, Biochemical Characterization and Antiparasitic Activity of BmatTX-IV, A Basic Lys49-Phospholipase A2 from the Venom of Bothrops matogrossensis from Paraguay. **Curr Top Med Chem**, v. 19, n. 22, p. 2041-2048, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568026619666190723154756>.

ALMEIDA, J. R. *et al.* Snake venom-derived peptides as anticancer candidates: Pioneering next-generation therapies. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, v. 1880, n. 6, nov. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2025.189479>.

ALMEIDA, T. C. *et al.* Cytotoxic effect of crotoxin on cancer cells and its antitumoral effects correlated to tumor microenvironment: A review. **Int J Biol Macromol**, v. 242, part. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124892>.

ALOULOU, A. *et al.* Phospholipases: An Overview. **Methods Mol Biol**, p. 69-105, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_3.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. *et al.* Myotoxic phospholipases A2 in Bothrops snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, ago. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01150-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01150-0).

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. *et al.* Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 4, p. 723-732, ago. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01210-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01210-8).

ANUPRIYA, S.; NANDITA, P.; SRINIVAS, P. SOX4 induces cytoskeleton remodeling and promotes cell motility via N-wasp/ARP2/3 pathway in colorectal cancer cells. **Exp Cell Res**, v. 439, n. 1, jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2024.114059>.

ARNER, E. N.; RATHMELL, J. C. Metabolic programming and immune suppression in the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 421-433, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.01.009>.

ARRIAGADA, C. *et al.* Focal adhesion kinase-dependent activation of the early endocytic protein Rab5 is associated with cell migration. **J Biol Chem**, v. 294, n. 34, p. 12836-12845, ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.008667>.

AZEVEDO, F. V. P. V. *et al.* Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from Bothrops pauloensis venom. **Int J Biol Macromol**, v. 82, p. 671-677, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080>.

AZEVEDO, F. V. P. V. *et al.* Antitumor and antimetastatic effects of PLA2-BthTX-II from Bothrops jararacussu venom on human breast cancer cells. **Int J Biol Macromol**, v. 135 p. 261-273, ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.164>.

BOUTRY, J. *et al.* The evolution and ecology of benign tumors. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, v. 1877, n. 1, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188643>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, mai. 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. **Guia de Animais Peçonhentos do Brasil [recurso eletrônico]**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. 164 p. Disponível em: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2024/05/Guia-Animais-peconhentos-do-Brasil.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2025.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.

BRAZIL, T. K.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Animais peçonhentos. In: BRAZIL, T. K., ed. Catálogo da fauna terrestre de importância médica na Bahia [online]. Salvador: EDUFBA, 2010. pp. 21-100. ISBN: 978-85-232-1166-0. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788523211660.0003>.

CAVALCANTE, J. S. Pain modulated by Bothrops snake venoms: Mechanisms of nociceptive signaling and therapeutic perspectives. **Toxicon**, v. 201, p. 105-114, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.08.016>.

CEDRO, R. C. A. *et al.* Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from Bothrops jararaca snake venom. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 24, nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0170-y>.

CHEN, Z-L. *et al.* AmotP130 regulates Rho GTPase and decreases breast cancer cell mobility. **J Cell Mol Med**, v. 22, n. 4, p. 2390-2403, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13533>.

CHENG, E. S. *et al.* Systematic review and meta-analysis of residential radon and lung cancer in never-smokers. **Eur Respir Rev**, v. 30, n. 159, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1183/16000617.0230-2020>.

CHIOATO, L. *et al.* Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A2. **Biochem J**, v. 366, p. 971-976, set. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj20020092>.

DA SILVA, C. P. *et al.* 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. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, nov. 2015. DOI: 10.1186/s40409-015-0044-5. Disponível em: <
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4632473/>>.

DA SILVA GIOTTO, M. T. *et al.* Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. **Proteins**, v. 30, n. 4, p. 442-454, dez. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980301\)30:4%3C442::AID-PROT11%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980301)30:4%3C442::AID-PROT11%3E3.0.CO;2-I).

DE MOURA, G. A. *et al.* Antitumor and Antiparasitic Activity of Antimicrobial Peptides Derived from Snake Venom: A Systematic Review Approach. **Curr Med Chem**, v. 29, n. 32, p. 5358-5368, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867329666220507011719>.

ESTEVAO-COSTA, M. I. *et al.* Snake venom components in medicine: From the symbolic rod of Asclepius to tangible medical research and application. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 104, p. 94-113, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.011>.

FRANGIEH *et al.* Snake Venom Components: Tools and Cures to Target Cardiovascular

Diseases. **Molecules**, v. 26, n. 8, abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26082223>.

GALASSI, C. *et al.* The hallmarks of cancer immune evasion. **Cancer Cell**, v. 42, n. 11, p. 1825-1863, nov. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.09.010>.

GEBRIM, L. C. *et al.* Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, v. 37, n. 4, p. 222-229, ago. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.010>.

GERSTBERGER, S.; JIANG, Q.; GANESH, K. Metastasis. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1564-1579, abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.003>.

GIMENES, S. N. C. *et al.* Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07082-2>.

GRABNER, A. N. *et al.* BmajPLA2-II, a basic Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasiticidal potential. **Int J Biol Macromol**, n. 102, p. 571-581, set. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.013>.

GUO, X. *et al.* Emerging anticancer potential and mechanisms of snake venom toxins: A review. **Int J Biol Macromol**, v. 269, n. (pt 1), jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131990>.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer—Then and now, and beyond. **Cell**, jan. 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.12.049>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 100,

n. 1, p. 57-70, jan. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

HBOUB, H. *et al.* An in-depth exploration of snake venom-derived molecules for drug discovery in advancing antiviral therapeutics. **Heliyon**, n. 10, n. 18, set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37321>.

HEIDARI, A. *et al.* A new lung cancer detection method based on the chest CT images using Federated Learning and blockchain systems. **Artif Intell Med**, v. 141, jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2023.102572>.

HENDRIKS, L. E. L. *et al.* Non-small-cell lung cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 10, n. 1, set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00551-9>.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer**. Gov.br. [Brasília]: Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br>>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer**. 128 p. Rio de Janeiro: Inca, 2011. Acesso em: 18 mar. 2026.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estatísticas de câncer**. 23 jun. 2022 (atualizado em 04 fev. 2026). Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/>>. Acesso em: 26 fev. 2026.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **INCA estima 781 mil novos casos de câncer por ano no Brasil entre 2026 e 2028**. 10 fev. 2026. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2026/inca-estima-781-mil-novos-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-entre-2026-e-2028>>. Acesso em: 26 fev. 2026.

JIANG, Y. *et al.* PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. **Hum Vaccin Immunother**, v. 15, n. 5, p. 1111-1122, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892>.

JOMOVA, K. *et al.* Heavy metals: toxicity and human health effects. **Arch Toxicol**, v. 99, n. 1, p. 153-209, jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03903-2>.

JUNG, M. *et al.* Mast cells produce novel shorter forms of perlecan that contain functional endorepellin: a role in angiogenesis and wound healing. **J Biol Chem**, v. 288, n. 5, p. 3289-3304, fev. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387811>.

KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell Death and Survival Assays. **Methods Mol Biol**, v. 1709, p. 107-127, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9.

KANG, T. S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J**, v. 278, p. 4544-4576, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>.

KHAN, S. A.; ILIES, M. A. The Phospholipase A2 Superfamily: Structure, Isozymes, Catalysis, Physiologic and Pathologic Roles. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24021353>

KUMAR, P. *et al.* Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2018, n. 6, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>.

KUMAR, P. *et al.* Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2018, n. 6, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.

KUR, I-M.; WEIGERT, A. Phosphatidylserine externalization as immune checkpoint in cancer.

Pflugers Arch, v. 476, n. 12, p. 1789-1802, dez. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02948-7>.

LEGRAND, C. *et al.* Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]. **J Biotech**, v. 25, n. 3, p. 231-243, set. 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90158-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90158-6).

LEITER, A. *et al.* The global burden of lung cancer: current status and future trends. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 20, p. 624-639, jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00798-3>.

LI, Y. *et al.* Advances and challenges in the treatment of lung cancer. **Biomed Pharmacoter**, v. 169, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115891>.

LIU, J. *et al.* Therapeutic Advances in Oncology. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 4, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22042008>.

MARQUES, A. C. *et al.* Antitumor and antiproliferative potential of crotoxin in triple negative breast tumors. **Toxicon**, v. 258, abr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2025.108322>.

MENG, X. N. *et al.* Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer**, v. 101, n. 1, p. 327-334, jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605154>.

MILANI, R. *et al.* Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM**, v. 90, n. 5, p. 323-334, mai. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/qjmed/90.5.323>.

MOREIRA, V. *et al.* A phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in culture: expression of cyclooxygenase-2 and PGE₂ biosynthesis. **Toxicon**, v. 57,

n. 2, p. 288-296, fev. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.004>.

MURAKAMI, T. *et al.* A [Lys⁴⁹]phospholipase A₂ from *Protobothrops flavoviridis* venom induces caspase-independent apoptotic cell death accompanied by rapid plasma-membrane rupture in human leukemia cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 75, n. 5, p. 864-870, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.100783>.

MUTTIAH, B.; HANAFIAH, A. Snake Venom Compounds: A New Frontier in the Battle Against Antibiotic-Resistant Infections. **Toxins (Basel)**, v. 17, n. 5, mai. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins17050221>.

OBENG-NYARKOH, P. I. *et al.* Lung Cancer Risk in US Adults with COPD: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 20, p. 3399-3421, out. 2025. DOI: <https://doi.org/10.2147/COPD.S531972>.

OFFOR, B. C.; PIATER, L. A. Snake venom toxins: Potential anticancer therapeutics. **J Appl Toxicol**, v. 44, n. 5, p. 666-685, mai. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.4544>.

OLIVEIRA, V. Q. *et al.* Selective Anticancer Effects of a P-I Metalloproteinase from *Bothrops moojeni* Snake Venom (BthMP) on Lung Cancer Cells. **Pharmaceuticals**, v. 19, n. 3, mar. 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph19030428>.

POLLONI, L. *et al.* 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**, v. 72, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105099>.

PROLEÓN, A. *et al.* Functional, immunological characterization, and anticancer activity of BaMtx: A new Lys49- PLA₂ homologue isolated from the venom of Peruvian *Bothrops atrox* snake (Serpentes: Viperidae). **Int J Biol Macromol**, v. 206, p. 990-1002, mai. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.111>.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, nov. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.

RODRIGUES, J. P. *et al.* The Anthelmintic Effect on *Strongyloides venezuelensis* Induced by BnSP- 6, a Lys49-phospholipase A2 Homologue from *Bothrops pauloensis* Venom. **Curr Top Med Chem**, v. 19, n. 22, p. 2032-2040, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568026619666190723152520>.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, A. *et al.* Residential radon and small cell lung cancer. A systematic review. **Cancer Lett**, v. 426, p. 57-62, jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.04.003>.

SAMEL, M. *et al.* Interactions of PLA2-s from *Vipera lebetina*, *Vipera berus berus* and *Naja naja oxiana* venom with platelets, bacterial and cancer cells. **Toxins (Basel)**, v. 5, n. 2, p. 203-223, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins5020203>.

SAMPAT, G. H. *et al.* Unraveling snake venom phospholipase A2: an overview of its structure, pharmacology, and inhibitors. **Pharmacol Rep**, v. 75, p. 1454–1473, nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00543-8>.

SAMY, R. P. *et al.* Snake Venom Phospholipases A2: A Novel Tool Against Bacterial Diseases. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 36, p. 6150-6162, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986712804485791>.

SAMY, R. P. *et al.* Purification of PaTx-II from the Venom of the Australian King Brown Snake and Characterization of Its Antimicrobial and Wound Healing Activities. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 5, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24054359>.

SANTOS, I. A. *et al.* Chikungunya virus entry is strongly inhibited by phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88039-4>.

SANTOS, L. C. *et al.* PLA2-MjTX-II from *Bothrops moojeni* snake venom exhibits antimetastatic and antiangiogenic effects on human lung cancer cells. **Toxicon**, v. 243, mai. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.107742>.

SAUTER, E. R. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 13, n. 3, p. 265-285, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1738218>.

SILVA, M. A. *et al.* Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A2 (PLA2) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells. **Int J Biol Macromol**, v. 118, p. 311-319, out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082>.

SIMÃO, F. **Quanto custa tratar um paciente com câncer no SUS?** Observatório de Oncologia, 17 nov. 2025. Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/estudos/2025/quanto-custa-tratar-um-paciente-com-cancer-no-sus/>>. Acesso em: 23 fev. 2026.

SOARES, A. M. *et al.* Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A2 Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 201-209, jun. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1790>.

SZLASA, W. *et al.* Lipid composition of the cancer cell membrane. **J Bioenerg Biomembr**, v. 52, p. 321-342, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09846-4>.

TEIXEIRA, S. C. *et al.* Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from

snake venoms. **Int J Biol Macromol**, v. 164, p. 616-625, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178>.

THANDRA, K. C. *et al.* Epidemiology of lung cancer. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 25, n. 1, p. 45-52, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. **Nucleic Acids Res**, v. 53, n. D1, p. 609-617, jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>.

TIAN, B.; DU, X.; ZHENG, S.; ZHANG, Y. The Role of Tumor Microenvironment in Regulating the Plasticity of Osteosarcoma Cells. **Int J Mol Sci**, v. 23, dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232416155>.

U.S. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Classification**. SEER Training Modules. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <<https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>>. Acesso em: 14 fev. 2026.

WAHEED, H. *et al.* Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. **Curr Med Chem**, v. 24, n.17, p. 1874-1891, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170605091546>.

WANDERLEY, C. W. S. *et al.* Bothrops jararacussu snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134-147, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.001>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer: fact sheet**. World Health Organization, 3 fev. 2025. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 13 fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lung cancer: fact sheet**. World Health Organization, 26 jun. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>>. Acesso em: 13 fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Radon and health**. World Health Organization, 25 jan. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/radon-and-health>. Acesso em: 13 fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tobacco: fact sheet**. World Health Organization, 25 jun. 2025. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>>. Acesso em: 13 fev. 2026.

ZONG, Y. *et al.* Lipid Nanoparticle (LNP) Enables mRNA Delivery for Cancer Therapy. **Adv Mater**, v. 35, n. 51, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.202303261>.

ZUNTINI, A. C. S. *et al.* The early inhibition of the COX-2 pathway in viperid phospholipase A2-induced skeletal muscle myotoxicity accelerates the tissue regeneration. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 461, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116384>.