

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Kimberly Borges Evangelista

**Cultura celular de linhagens celulares tumorais e análise proteômica
baseada em espectrometria de massas: análise do efeito de veneno
da serpente *Bothrops jararaca***

São Paulo

2022

Kimberly Borges Evangelista

**Cultura celular de linhagens celulares tumorais e análise proteômica baseada
em espectrometria de massas: análise do efeito de veneno da serpente
*Bothrops jararaca***

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção de título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientador: Leo Kei Iwai

São Paulo

2022

Catlogação na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)

Evangelista, Kimberly Borges

Cultura celular de linhagens celulares tumorais e análise proteômica baseada em espectrometria de massas: análise do efeito de veneno da serpente bothrops jararaca / Kimberly Borges Evangelista ; orientador(a) Leo Kei Iwai - São Paulo, 2022.

69 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Veneno 2. Espectrometria de massas. 3. Proteoma. 4. Cultura celular I. Iwai, Leo Kei. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

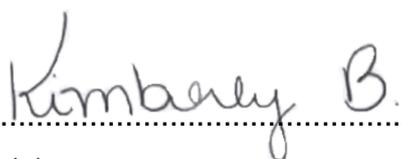
AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Kimberly Borges Evangelista, aluno(a) do Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 30 de janeiro de 2022


.....

aluno(a)

De acordo:.....


Orientador(a):

Agradeço todo o apoio da minha família e dos meus amigos, especialmente dos meus pais e meu marido; por acreditarem em mim e estarem comigo nos momentos de dificuldade. Minha eterna gratidão a todos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Leo Kei Iwai pelo apoio.

Aos colegas e amigos que me auxiliaram diversas vezes.

À Dra. Rosangela Aparecida Wailemann Mansano pela oportunidade e ensinamentos.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

BORGES EVANGELISTA, Kimberly. **Cultura celular de linhagens celulares tumorais e análise proteômica baseada em espectrometria de massas: análise do efeito de veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2022. 69 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

As técnicas de cultura celular são utilizadas desde o começo do século XX e vêm ganhando espaço em diferentes áreas de pesquisa. Um exemplo é na farmacodinâmica, em estudos cujo objetivo é observar o efeito de drogas, biofarmacos e compostos tóxicos, como venenos de serpentes. O veneno de serpentes é composto por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e carboidratos que apresentam uma gama de ações isoladas ou em conjunto. Diversos estudos têm sido realizados a fim de analisar o potencial uso de venenos para o tratamento de doenças tais como o câncer utilizando diferentes metodologias, sendo duas delas: a cultura celular utilizando linhagens celulares tumorais e a proteômica. Proteômica consiste na análise dos conjuntos de proteínas e suas isoformas expressas em uma amostra biológica, podendo ser um organismo, tecido ou célula. A análise proteômica baseada em espectrometria de massas é uma técnica que separa e identifica proteínas por meio da medição de sua massa, medida com base na relação massa/carga de íons em fase gasosa. O presente trabalho busca analisar e caracterizar o perfil morfológico e proteômico das linhagens celulares tumorais sob efeito do veneno da serpente *Bothrops jararaca* a partir da cultura de células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Foram observadas diferentes morfologias entre as diferentes linhagens celulares após tratamento com baixa (0,63 µg/mL) e alta dose sub-citotóxica (2,5 µg/mL) de veneno. A análise por espectrometria de massas permitiu a identificação de diferentes proteínas em cada uma das amostras e a presença de proteínas comuns entre amostras controle e tratadas com as diferentes doses de veneno. Trabalhos subsequentes utilizando doses diferentes de veneno e

tempo de tratamento permitirão melhor caracterizar o perfil proteômico das diferentes linhagens tumorais sob efeito do veneno de *B. jararaca*.

Palavras-chave: Cultura celular. Linhagem celular de câncer. Espectrometria de Massas. Proteoma. Veneno. *Bothrops jararaca*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Família Viperidae e <i>Bothrops jararaca</i>	15
1.2 O veneno da <i>B. jararaca</i>	16
1.3 Potencial terapêutico do veneno	17
1.4 Proteoma do veneno	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 Linhagens celulares	20
3.2 Veneno de <i>B. jararaca</i>	20
3.3 Tratamento das células com veneno de <i>B. jararaca</i> e lise celular	20
3.4 Quantificação de proteínas	21
3.5 Preparação de amostra para análise proteômica - Digestão FASP e dessalinização com <i>Stage tip</i>	21
3.6 Análise proteômica por espectrometria de massas	22
3.7 Identificação de proteínas e busca em banco de dados	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Cultivo de células	24
4.2 Análise morfológica celular do efeito de veneno de <i>B. jararaca</i>	24
4.3 Preparação das amostras para análise proteômica baseada em espectrometria de massas: lise celular e quantificação de proteínas	25
4.4 Análise proteômica	26

5	DISCUSSÃO	38
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Viperidae e *Bothrops jararaca*

Na natureza existem mais de 100 mil espécies de animais venenosos e peçonhentos, podendo ser mamíferos, répteis, anfíbios, insetos e aracnídeos, além de diversas espécies de peixes e moluscos, na qual o veneno desempenha um papel importante na imobilização, inabilitação, digestão da presa e na defesa contra predadores (KINI, 2006; STOCKER, 1990).

No Brasil existem cerca de 392 espécies de serpentes sendo 63 espécies consideradas serpentes peçonhentas (COSTA; BÉRNILS, 2015) que são divididas em duas famílias: a Elapidae que corresponde aos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*, e a Viperidae correspondente aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003; MELGAREJO, 2009).

A família Viperidae estão divididas em quatro subfamílias: Azemiopinae, Causinae, Crotalinae e Viperinae (MCDIARMID; CAMPBELL; TOURÉ, 1999). Elas são conhecidas por apresentarem fosseta loreal (orifício termorreceptor) (UNDERWOOD, 1967) com exceção da subfamília Viperinae. A subfamília Crotalinae é a mais diversificada, apresentando mais de 190 espécies divididas em 29 gêneros (GUTBERLET JUNIOR; CAMPBELL, 2001) dos quais 12 gêneros ocorrem no continente americano: *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Ophryacus*, *Porthidium* e *Sistrurus* (CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde, os acidentes ofídicos constituem um sério problema de saúde pública no Brasil, com média de 26.000 casos ao ano. Cerca de 80% dos acidentes ofídicos são causados por serpentes da família Viperidae, mais especificamente do gênero *Bothrops* (RIBEIRO; JORGE, 1997), podendo levar o indivíduo picado a óbito ou a sequelas capazes de gerar incapacidade temporária ou definitiva para o trabalho e atividades habituais (SINAN, 2021).

A *B. jararaca* é caracterizada pela cabeça em forma de lança e habitam ambientes predominantemente úmidos, relacionado ao domínio morfoclimático da Mata Atlântica. Ela é encontrada em zonas rurais e periferias de grandes cidades e

possui hábito noturno e crepuscular (DIAS, 2013; HARTMANN; HARTMANN; GIASSON, 2003; PINHO; PEREIRA, 2001; RIBEIRO; JORGE, 1997).

1.2 O veneno da *B. jararaca*

O veneno é uma mistura complexa composta por proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e carboidratos que apresentam uma gama de ações isoladas ou em conjunto (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; DOLEY; KINI, 2009; FOX; SERRANO, 2007, 2005, 2008; TANJONI et al., 2005) que resultam em ações hemotóxicas, cardiotoxícas, citotóxicas ou neurotóxicas (JIN; VARNER, 2004; WHITE, 2005).

O veneno da *B. jararaca* apresenta três principais ações: proteolítica, coagulante e hemolítica, sendo a atividade proteolítica um fator importante para caracterização clínica de um acidente botrópico (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003; AZEVEDO MARQUES; HERING; CUPO, 2009; DIAS, 2013), através da degradação de proteínas da matriz extracelular, plasma e superfície celular (LAING et al., 2003). Além disso, o veneno pode causar lesão local tecidual, mionecrose, edema, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico, alteração de coagulação e alterações renais, resultante da ação conjunta da atividade enzimática e tóxica do veneno (BJARNASON; FOX, 1994; CAPRONI, 2009).

Cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno da *B. jararaca* é composta por uma mistura complexa de proteínas sendo que algumas são enzimas como serinoproteinases, metaloproteinases, fosfolipases A2 (FLA2), L-aminoácidos oxidases (LAAOs) e nucleotidases (DIAS, 2013; NICOLAU et al., 2017). As metaloproteinases são enzimas proteolíticas associadas à fibrinólise e coagulação, e estão envolvidas na migração de células e no reparo tecidual, além de estarem relacionados a efeitos patológicos como o câncer (HOOPER, 1994). As serinoproteinases afetam a homeostase e a trombose agindo na cascata de coagulação causando um desequilíbrio homeostático (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). As PLA2 são enzimas capazes de hidrolisar as ligações éster na posição sn2 dos glicerofosfolipídeos, liberando ácido araquidônico, importante para biossíntese de muitos mediadores envolvidos na inflamação, tais como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (CUNHA; FULY; ARAUJO, 2011). As L-aminoácidos

oxidases são flavoenzimas pertencentes à classe de oxiredutases, que produzem o alfa-ceto, peróxido de hidrogênio e amônia (TAN; FUNG, 2008).

1.3 Potencial terapêutico do veneno

Constituintes de venenos de serpentes têm sido isolados e estudados por apresentarem potencial terapêutico no tratamento de diversas doenças como, por exemplo, o Eptifibatide, comercializado como Integrilin, derivado do veneno da serpente *Echis carinatus* e produzido pela Millennium Pharmaceuticals e Schering-Plough e utilizado como uma droga anti-plaquetária (PHILLIPS; SCARBOROUGH, 1997) e o inibidor da enzima conversora de angiotensina I, o Captopril produzido pela Bristol-Myers Squibb cujo componente ativo foi derivado do veneno de *B. jararaca* e que é utilizado no combate à hipertensão e insuficiência cardíaca (CAMARGO et al., 2012; FERREIRA, 1965; ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949).

Além do potencial utilização dos derivados das toxinas de veneno de serpentes no tratamento de diversas doenças (FOX; SERRANO, 2007), existem atualmente diversos trabalhos descrevendo características anti-tumorigênicas do veneno de serpente (JAIN; KUMAR, 2012; MARSH; WILLIAMS, 2005; VYAS et al., 2013). Visando a terapia contra o câncer, o uso de proteínas, peptídeos ou enzimas derivadas do veneno de serpente são analisados para buscar componentes capazes de danificar componentes na membrana celular interferindo no transporte de substâncias ou transdução de sinal através da membrana ou perturbarem a membrana de células cancerosas de modo a afetar a migração e proliferação dessas células (YAMAZAKI; MORITA, 2007).

1.4 Proteoma do veneno

Nos últimos anos, análises do veneno por espectrometria de massas têm permitido esclarecer a composição e a variabilidade de proteínas e peptídeos presentes no veneno de serpentes (FOX; SERRANO, 2008).

Existirem na literatura, inúmeras abordagens envolvendo a caracterização bioquímica e fisiológica da ação do veneno ou derivados isolados de venenos sobre linhagens celulares ou tecidos (BATEMAN et al., 2013; CALDERON et al., 2014; LEIGUEZ et al., 2014; MORA et al., 2005; MOREIRA et al., 2014), porém são poucos os trabalhos mapeando o proteoma de linhagens celulares de câncer após o tratamento com venenos de serpentes.

O desenvolvimento de metodologias e tecnologias mais sensíveis utilizando espectrômetros de massas acoplados a nano-cromatografia líquida de alta eficiência (nano-LC/MS) tem permitido análises proteômicas mais precisas e cobrindo um maior número de proteínas detectadas no mapeamento do proteoma presente em um determinado tipo celular após um estímulo ou estresse. Estas análises permitem entender funções biológicas de proteases, peptidases e peptídeos associados a desordens metabólicas e doenças como o câncer (BARROS et al., 2012a, 2012b; HAVRE et al., 2008; MEST; MENTLEIN, 2005; TAGORE et al., 2009).

Estudos do efeito do veneno de *B. jararaca* sobre algumas linhagens celulares tumorais já foram realizadas por nosso grupo (KISAKI et al., 2021). O efeito do veneno foi testado sobre linhagens tumorais de mama MCF7 e MDA-MB-231 que apresentam características não metastática e metastática respectivamente, e que se caracterizam por apresentar alto grau de eficiência glicolítica que garante a ligação entre célula tumoral e a matriz extracelular (FURTADO et al., 2012; NEGROMONTE FILHO, 2011), além de serem mais resistentes às drogas terapêuticas (AHMED, 2011). Os resultados mostraram que a partir da análise da classificação funcional das proteínas identificadas sem o tratamento com veneno e com baixa e alta (sub-letal/citotóxica) concentrações de veneno houve mudanças no perfil do conjunto de proteínas na função molecular, processo biológico, componente celular, classe de proteína e via celular (KISAKI et al., 2021).

Baseado no trabalho de Kisaki e colaboradores (2021), analisamos o efeito do veneno de *B. jararaca* como parte do treinamento em diferentes técnicas laboratoriais incluindo cultura celular de linhagens tumorais e preparo de amostras e análise proteômica baseada em espectrometria de massas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar e caracterizar o perfil morfológico e proteômico das linhagens celulares tumorais de mama MCF7 e MDA-MB-231 sob o efeito do veneno de *B. jararaca*.

2.2 Específicos

- Tomar conhecimento de técnicas de cultura celular e bioquímica de proteínas
- Cultivo de linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231
- Análise morfológica por microscopia ótica das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 sob efeito do veneno de *B. jararaca*
- Tomar conhecimento de técnicas de análise proteômica baseada em espectrometria de massas
- Identificação de proteínas por espectrometria de massas do tipo LTQ-Orbitrap Velos.

3 METODOLOGIA

3.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 foram obtidas da Dra Rosângela Aparecida Wailemann Mansano do Laboratório de Ciclo Celular (LECC/CeTICS). As células foram transferidas para uma garrafa T25 contendo 5 mL de meio de cultura. Foram utilizados os meios de cultura DEMEM (*Dulbeccos's Modified Eagle's Medium, Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos*) para o cultivo da linhagem MCF-7 e RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute, Gibco, Nova Iorque, EUA*) sem vermelho fenol para o cultivo da linhagem MDA-MB-231. Os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado e os antibióticos ampicilina a 25 mg/L e estreptomicina a 100 mg/L. As células foram posteriormente transferidas para garrafas T75 com 10 mL de meio de cultura e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O repique das células foi feito sempre que atingiam 70-80% de confluência.

3.2 Veneno de *B. jararaca*

Foi utilizado veneno de *B. jararaca* (lote 01/09-2) extraído e liofilizado pelo departamento de herpetologia do Instituto Butantan e cedida para uso e teste no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada.

3.3 Tratamento das células com veneno de *B. jararaca* e lise celular

As células foram cultivadas em frascos T25 e após atingirem 70-80% de confluência foram carenciadas com DMEM (MCF-7) e RPMI (MDA-MB-231) sem soro fetal bovino por 24 horas. Após esse período, foram adicionadas ao meio de cultura dose baixa (0.63 µg/mL) e dose sub-citotóxica (2.5 µg/mL) de veneno de *B. jararaca* seguindo o mesmo protocolo utilizado por Kisasi et al (2021). Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com PBS gelado e lisadas com 1 mL de ureia 8 M + inibidores de protease e fosfatase (*Halt protease & phosphatase single-use inhibitor cocktail, Thermo Fischer Scientific, Illinois, EUA*). Após a adição da solução de lise, foi utilizado um rodo (raspador de células/ *cell scraper*) para espalhar a solução e coletar o lisado celular da superfície através de força mecânica e transferir o conteúdo para um tubo eppendorff no gelo. A amostra foi agitada em

vórtex por 15 segundos a cada 5 minutos por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 1000 rpm por 30 segundos e uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi separado para quantificação de proteínas. O lisado foi estocado até o preparo da amostra para análise no espectrômetro de massas.

3.4 Quantificação de proteínas

As proteínas obtidas dos lisados celulares foram quantificadas através do método BCA (*Bicinchoninic Acid protein assay, Thermo Fischer Scientific, Illinois, EUA*) em placas de 96 poços. Neste tipo de ensaio, íons de cobre formam complexos com ligações peptídicas, produzindo produtos e cor púrpura que são lidos em espectrofotômetro a 562nm. Diluições seriadas do sobrenadante foram plaqueadas em placa de 96 poços com fundo chato, onde foi adicionada uma mistura de 50:1 de soluções A (bicinconinato de sódio 10g/L, carbonato de cálcio 20 g/L, tartrato de sódio 1,6 g/L, NaOH 4 g/L e bicarbonato de sódio 9,5 g/L): solução B (sulfato de cobre pentahidratado 40 g/L). A placa foi incubada a 37° C por 2 h e a leitura feita em espectrofotômetro FlexStation 3 (*Molecular Devices, California, EUA*) a 562 nm utilizando o software SoftMax Pro (vs 3.0.22). A curva padrão foi feita fazendo-se uma diluição seriada com albumina bovina (BSA) partindo inicialmente de 2 mg/mL a 0.032 mg/mL.

3.5 Preparação de amostra para análise proteômica - Digestão FASP e dessalinização com *Stage tip*

Após condicionamento do filtro para digestão, foram acoplados em tubos de 2 mL e submetidos à centrifugação em todos os passos. Foram adicionados 30 µL da amostra lisada com 200 µL de UA (ureia 8 M em Tris 0,1 M/ HCl pH 8,5) e centrifugados a 14.000 g por 15 minutos. Foram adicionados mais 200 µL de UA, as amostras foram centrifugadas novamente e o *flow-through* descartado. Foram adicionados 100 µL de ditioneitol (DTT) 0,02 M em UA para redução das pontes dissulfeto, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida centrifugados a 14.000 g por 10 minutos. Foram adicionados 100 µL de solução iodoacetamida (IAA) 0,05 M em UA para alquilação das cisteínas, mantidas por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Foram adicionados novamente 100 µL

UA e centrifugados a 14.000 g por 10 minutos. Esse processo foi repetido 3x. Foram ainda adicionados 100 µL de solução ABC (NH₄CO₃ 0,05 M em água MilliQ) e centrifugados a 14.000 g por 10 minutos. Esse passo foi repetido por 3 vezes. Foram adicionados 20 µL de tripsina, quantidade suficiente para se obter uma razão de 1:50 de enzima:proteína e incubado a 37 °C por 18 horas. A reação tripsínica foi interrompida adicionando 30 µL de ácido acético glacial. As amostras de peptídeos resultantes do processo de digestão tripsínica foram submetidas ao processo de dessalinização com *Stage-tip* usando ponteira P-100 com membrana SDB-XC para remoção de sal. As ponteiras foram acopladas em tubos *ependorff* de 2 mL e centrifugadas em todos os passos. Antes de iniciar o *Stage tip*, as membranas foram condicionadas utilizando 20 µL de solução 80% acetonitrila (ACN) e 0,5% ácido trifluoroacético (TFA) (solução B) e 5% ACN e 0,5% TFA (solução A) e centrifugadas a 1000 g por 3 minutos. A amostra foi aplicada ao *Stage Tip* e centrifugada a 800 g por 5 minutos e lavada com 20 µL de solução A e centrifugada a 1000 g por 3 minutos. Os peptídeos retidos na coluna foram eluídos com solução B e centrifugados a 1000 g por 5 minutos. O eluato foi seco em *speedvac* (*Hetovac VR-1, Heto Lab Equipment, Allerod, Dinamarca*) e dissolvido em ácido fórmico 0,1% para subsequente análise em cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (nLC-MSMS).

3.6 Análise proteômica por espectrometria de massas

A proteômica por *shotgun* foi realizada no espectrômetro de massas do tipo LTQ- Orbitrap Velos (*Thermo Scientific, Bremen, Alemanha*) acoplado à cromatografia líquida nLC EASY 1000 (*Thermo Scientific*). Foi realizado o gradiente segmentado com 85 min de 5 - 30% do solvente B (ácido fórmico 0,1% em ACN) seguido por 10 min de 30 - 90% do solvente B, 10 min a 90% de solvente B, 2 min de 90 a 5% do solvente B e equilíbrio por 18 min em 5% de solvente B com fluxo de 200 nL/min em uma pré-coluna (ID 100 µm x OD 360 µm) empacotada com 5 cm de resina C18 com *beads* Jupiter de 10 µm (*Phenomenex Inc., Torrance, California, USA*). Essa pré-coluna foi acoplada a outra coluna analítica (ID 75 µm x OD 360 µm) empacotada com 15 cm de resina C18 com *beads* AQUA de 5 µm (*Phenomenex Inc.*). Os dados foram coletados em um modo dependente de aquisição de dados

(DDA) no qual os cinco íons precursores mais intensos de cada ciclo foram selecionados para fragmentação no tipo dissociação induzida por colisão (CID) por 90 segundos e a voltagem do *nanospray* foi selecionada para 2.3kV com temperatura da fonte de ionização em 250 °C. O tempo de injeção no *ion trap* e no FT-MS foram de 100ms cada, com resolução de 30.000 através do intervalo de m/z de 300-1800.

3.7 Identificação de proteínas e busca em banco de dados

A identificação das proteínas foi realizada utilizando-se o programa Mascot (*Matrix Science, versão 2.4.0, Boston, EUA*) contra o banco de dados *Homo sapiens* do Uniprot baixados em outubro de 2021. Como parâmetros para busca foram utilizados: oxidação da metionina como modificação variável e carbamidometilação da cisteína como modificação fixa. A busca foi realizada com tolerância de 10 ppm para MS e 0,5 Da para MS/MS.

4 RESULTADOS

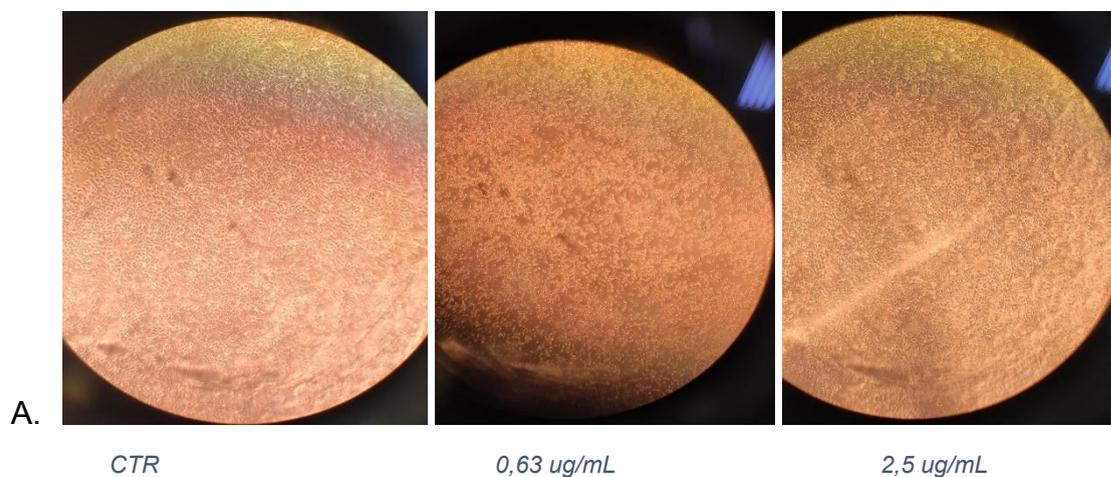
4.1 Cultivo de células

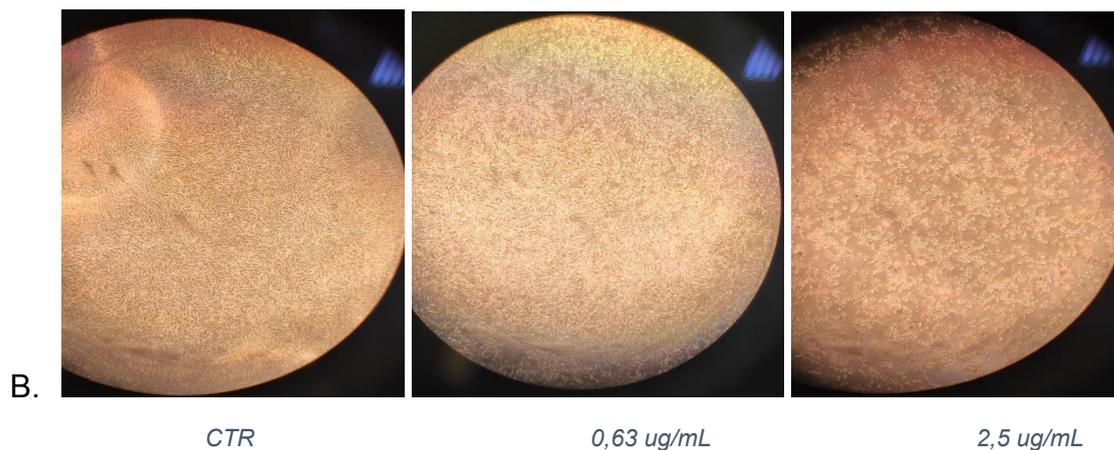
O cultivo celular das células MCF-7 e MDA-MB-231 permitiu verificar que as células crescem de formas diferentes. A linhagem MCF7 cresce mais lentamente comparada à linhagem MDA-MB-231. Enquanto a célula da linhagem MDA-MB-231 demorava cerca de 3 dias para atingir uma confluência de 80%, a célula da linhagem MCF7 demorava cerca de 4 a 5 dias.

4.2 Análise morfológica celular do efeito de veneno de *B. jararaca*

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas com $1,5 \times 10^5$ e 1×10^5 , respectivamente, em garrafas T25. Após as células atingirem 80% de confluência, as células foram carenciadas de soro por 24 h e tratadas com PBS (controle), 0,63 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *B. jararaca* por 24 h. Verificamos que as células da linhagem MDA-MB-231 tiveram maior quantidade de morte celular onde as células diminuíaam de tamanho, ficavam menos confluentes e desgrudavam da placa, enquanto a linhagem MCF-7 apresentou um número reduzido de células desprendidas da placa (Figura 1)

Figura 1 - Imagens das células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) tratadas com PBS (Controle), 0,63 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *B. jararaca* por 24h





Fonte: própria autora, 2022.

Nota: A. linhagem celular MCF-7; B. linhagem celular MDA-MB-231.

4.3 Preparação das amostras para análise proteômica baseada em espectrometria de massas: lise celular e quantificação de proteínas

As linhagens celulares foram lisadas respeitando o total de 24 horas a partir do tratamento com PBS ou veneno. Inicialmente as amostras foram quantificadas utilizando o método do kit BCA.

Tabela 1 - Concentração de proteínas totais

Réplica	Concentração do veneno/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	MCF-7/ μg	MDA-MB-231/ μg
1	0 (controle)	0,403	0,388
	0,63	0,661	0,425
	2,5	0,652	0,196
2	0 (controle)	0,717	0,770
	0,63	0,670	0,236
	2,5	0,787	0,484
3	0 (controle)	0,684	0,730
	0,63	0,755	0,475
	2,5	0,827	0,241

Fonte: própria autora, 2022.

Total de proteínas em microgramas obtidas em cada condição (controle tratado com PBS e 0,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno de *B. jararaca*) nas diferentes réplicas biológicas.

4.4 Análise proteômica

A análise das amostras por espectrometria de massas das três réplicas de cada uma das condições permitiu a identificação de 69 a 862 proteínas nas células MCF7 e 20 a 705 proteínas nas células MDA-MB-231 (Tabela 2). A lista de todas as proteínas identificadas em cada uma das amostras está na nuvem e pode ser baixada através do link: <<https://drive.google.com/drive/folders/1-vfnxwLp0IShTW5Kpz2iaXku6HU4VGQX?usp=sharing>>.

Tabela 2 - Total de proteínas identificadas nas amostras

Réplica	Concentração de veneno/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	MCF7	MDA-MB-231
1	0	72	238
	0,63	862	20
	2,5	741	663
2	0	69	25
	0,63	668	240
	2,5	640	286
3	0	104	156
	0,63	692	36
	2,5	366	705

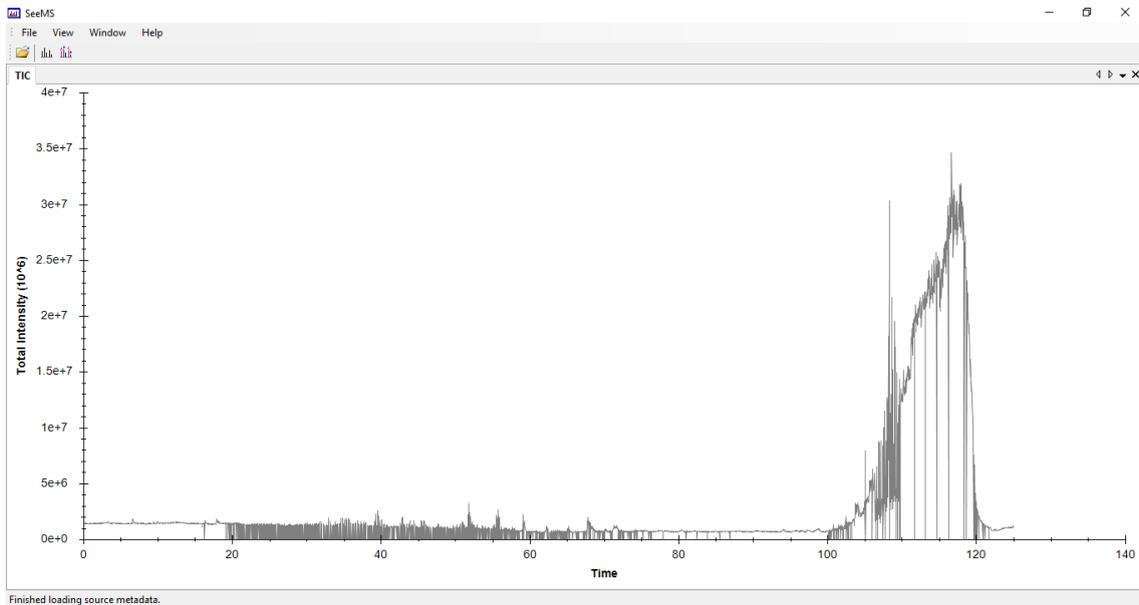
Fonte: própria autora, 2022.

Número de proteínas identificadas em cada uma das condições testadas (controle tratado com PBS e veneno a 0,63 mg/mL e 2,5 mg/mL)

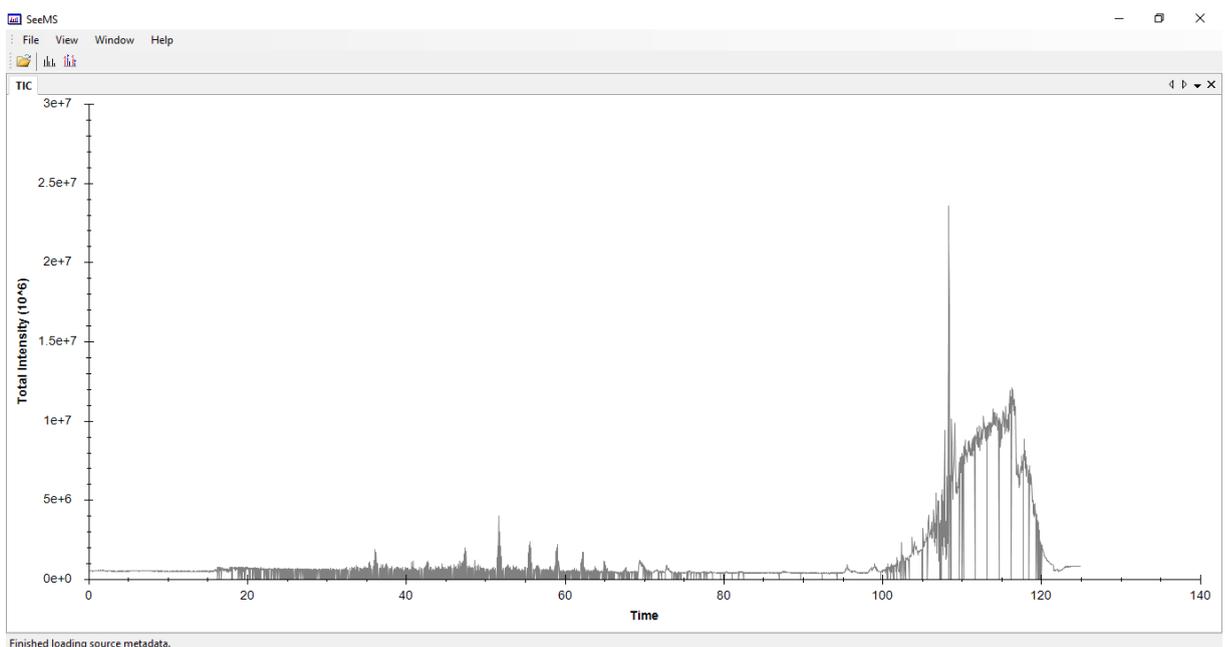
O perfil de TIC (Total ion count, ou contagem total de espectros em inglês) dos dados de MS1 de cada uma das amostras são mostrados nas Figuras 2A-2R.

Figura 2 - Perfil de contagem total de espectros de cada uma das amostras analisadas.

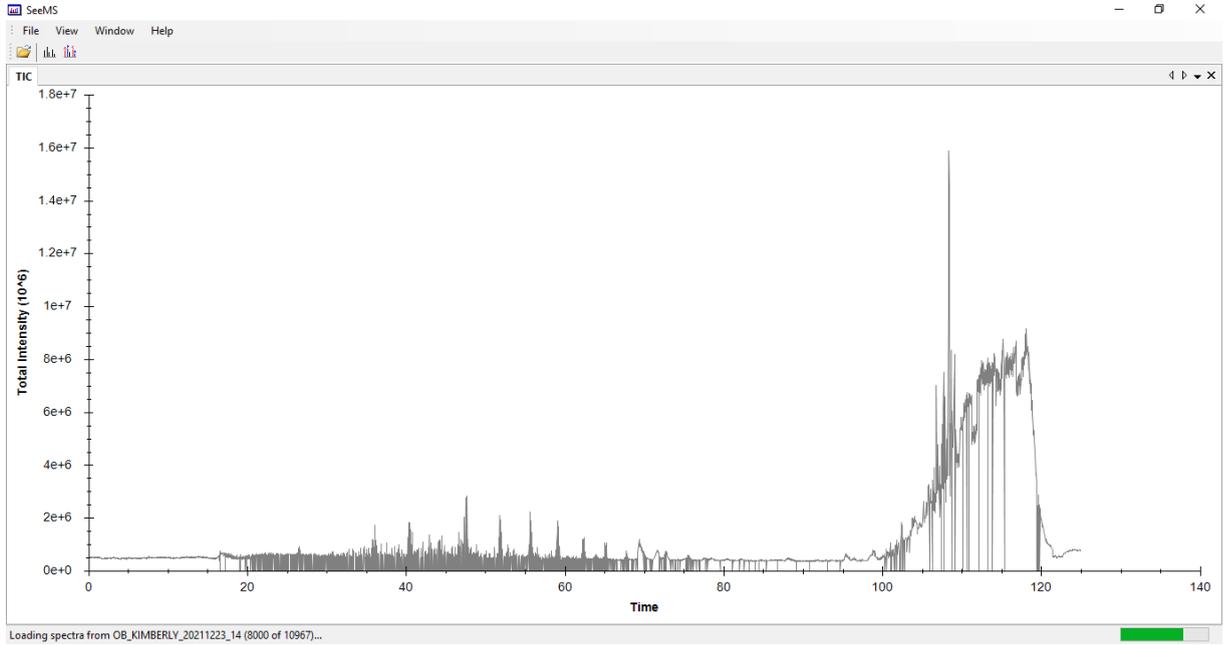
A. MCF7, controle, réplica 1.



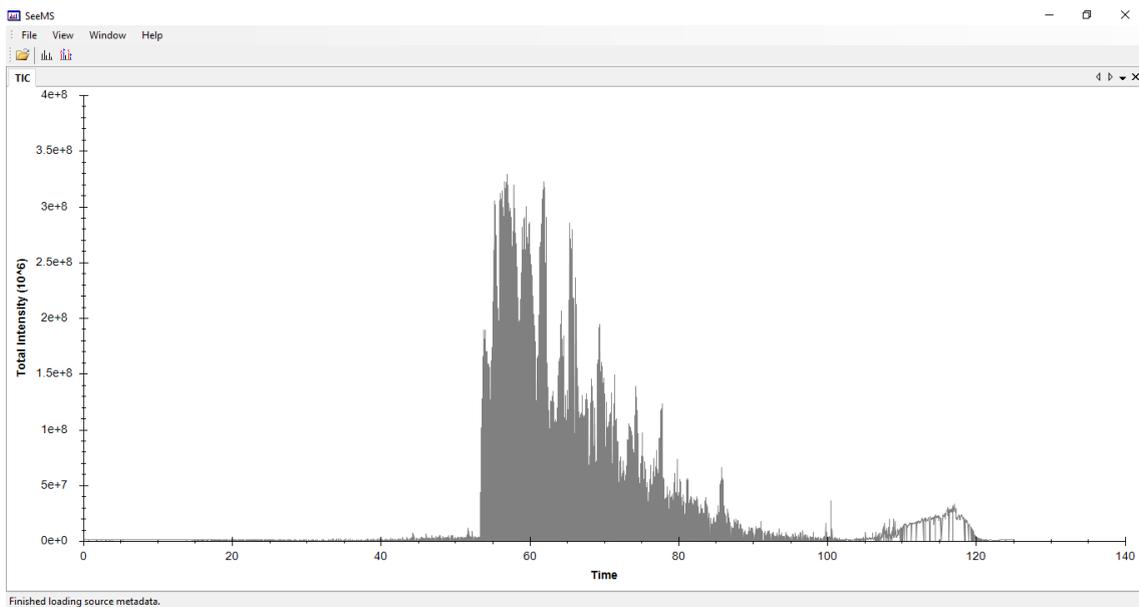
B. MCF7, controle, réplica 2.



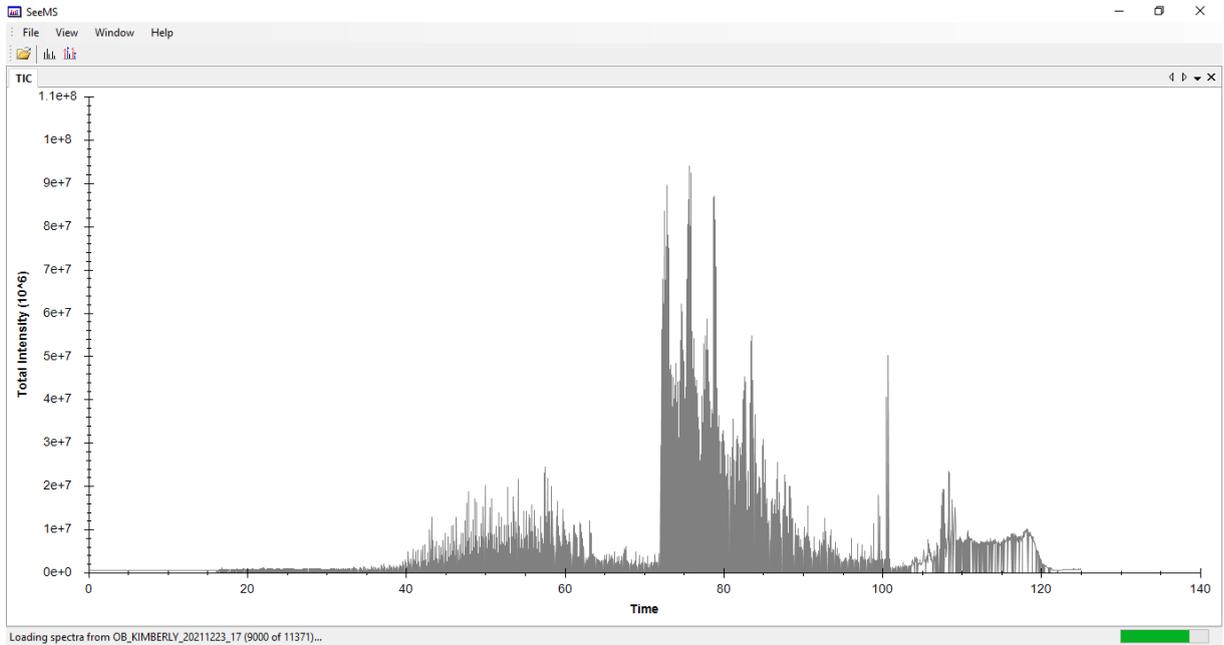
C. MCF7, controle, réplica 3.



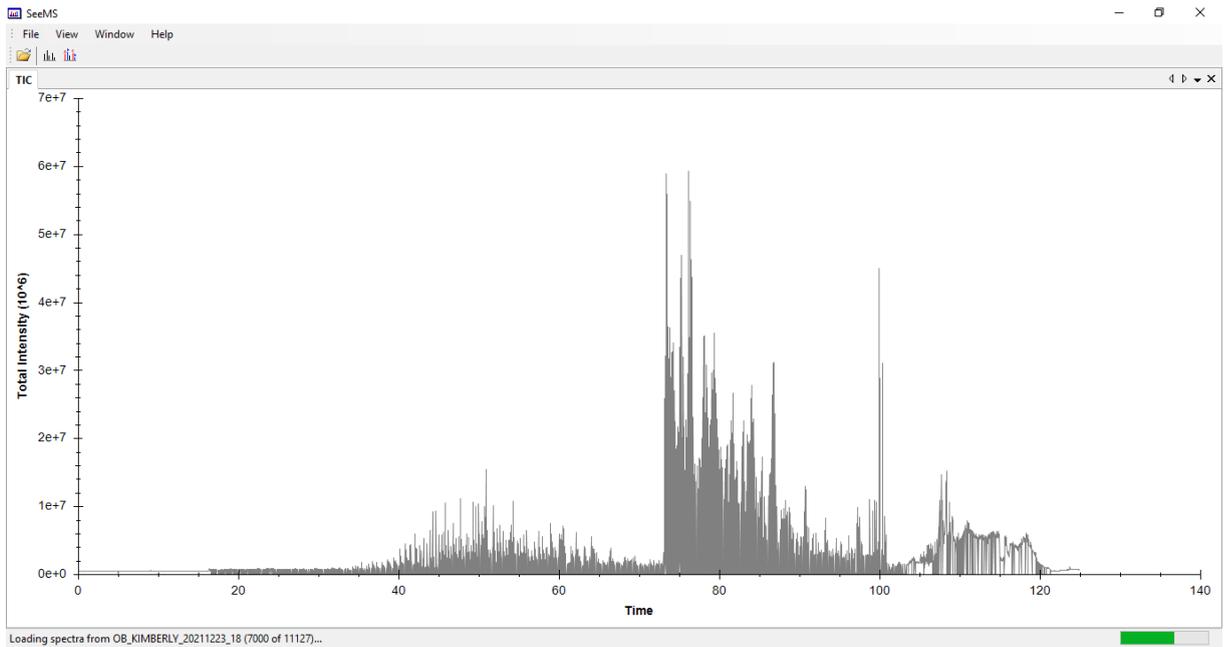
D. MCF7, tratado com veneno 0,63 µg/ mL, réplica 1



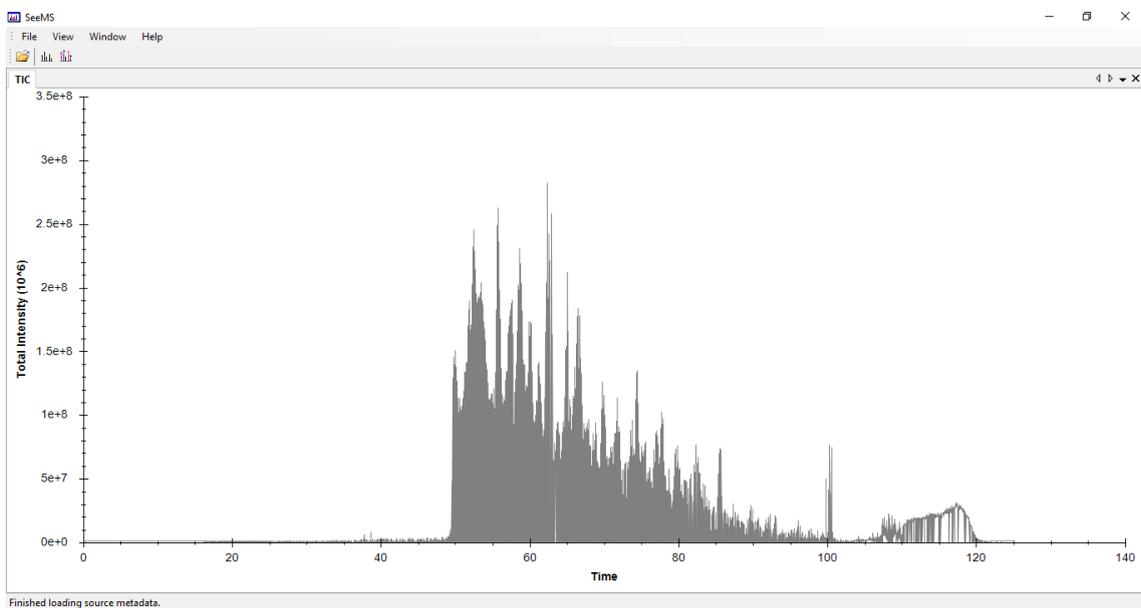
E. MCF7 tratado com 0,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno, réplica 2.



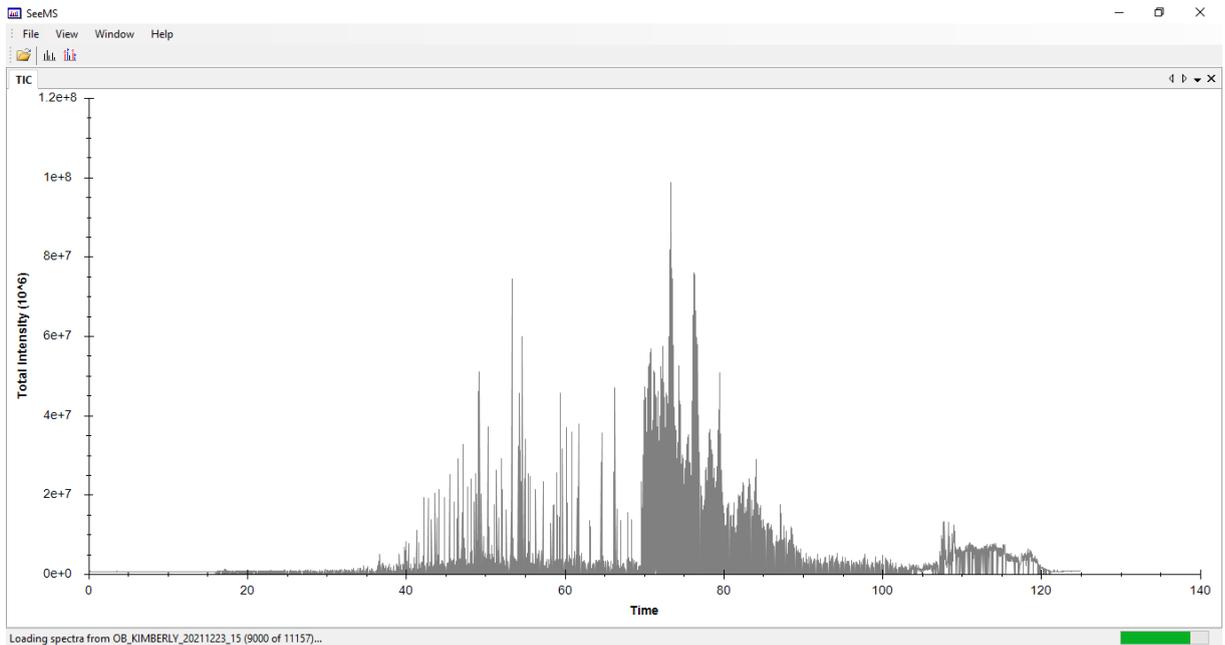
F. MCF7 tratado com 0,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno, réplica 3.



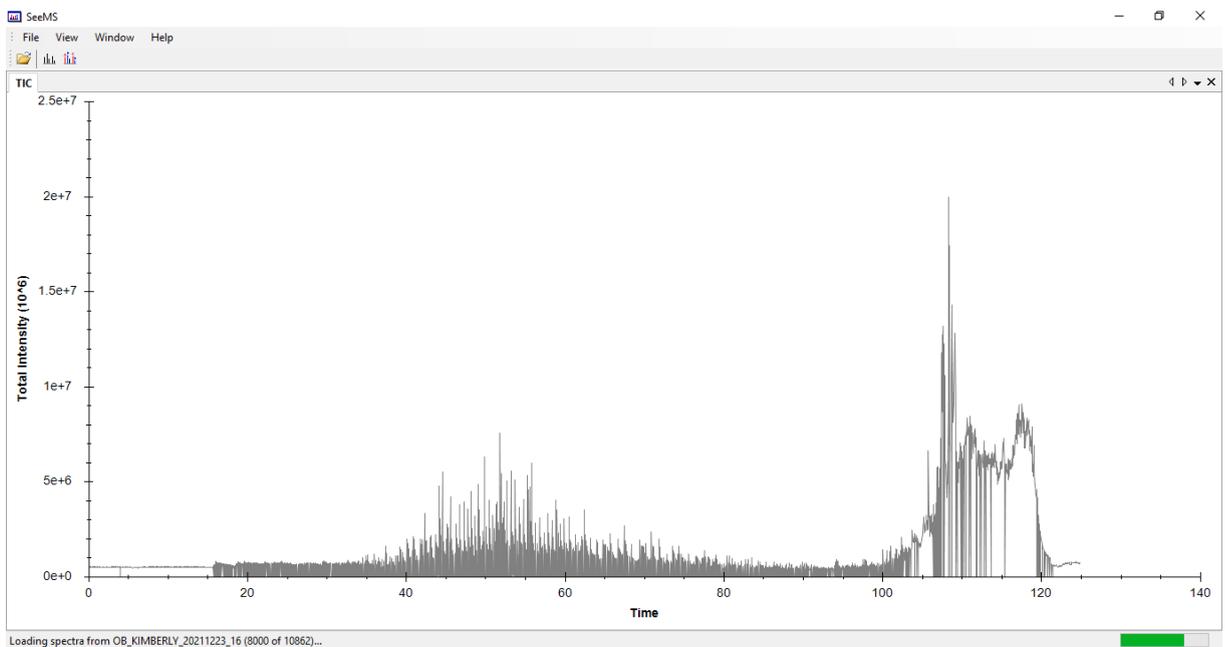
G. MCF7, tratado com veneno a 2,5 µg/mL, réplica 1.



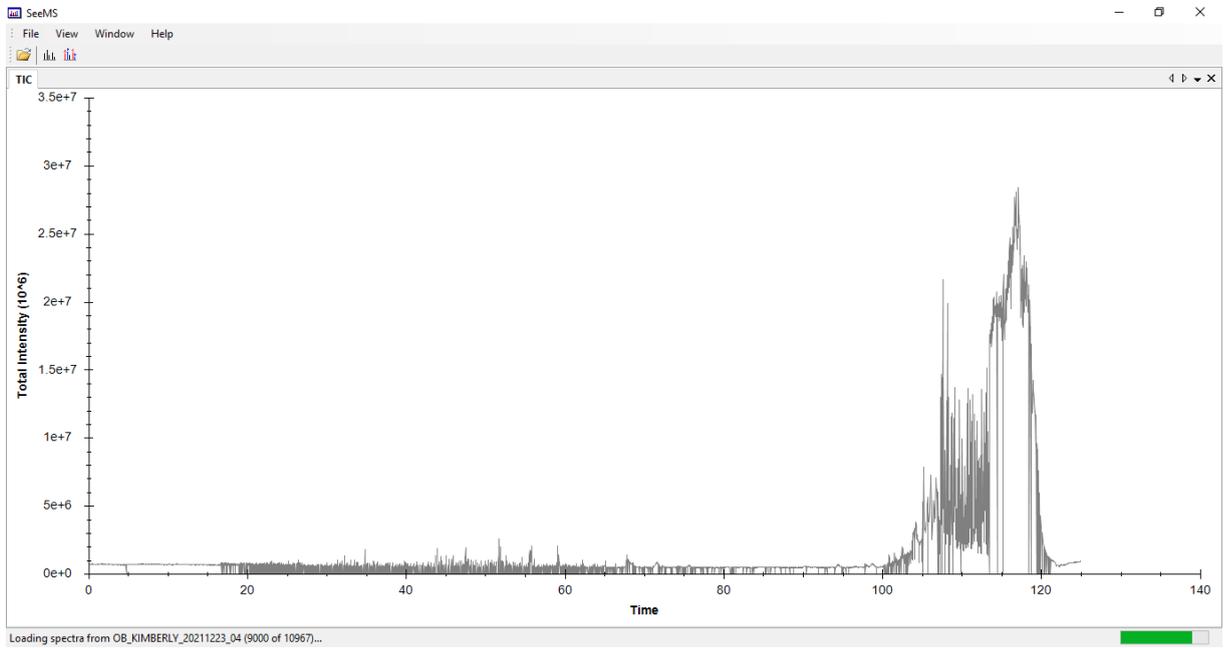
H. MCF7 tratado com 2,5 µg/ mL de veneno, réplica 2.



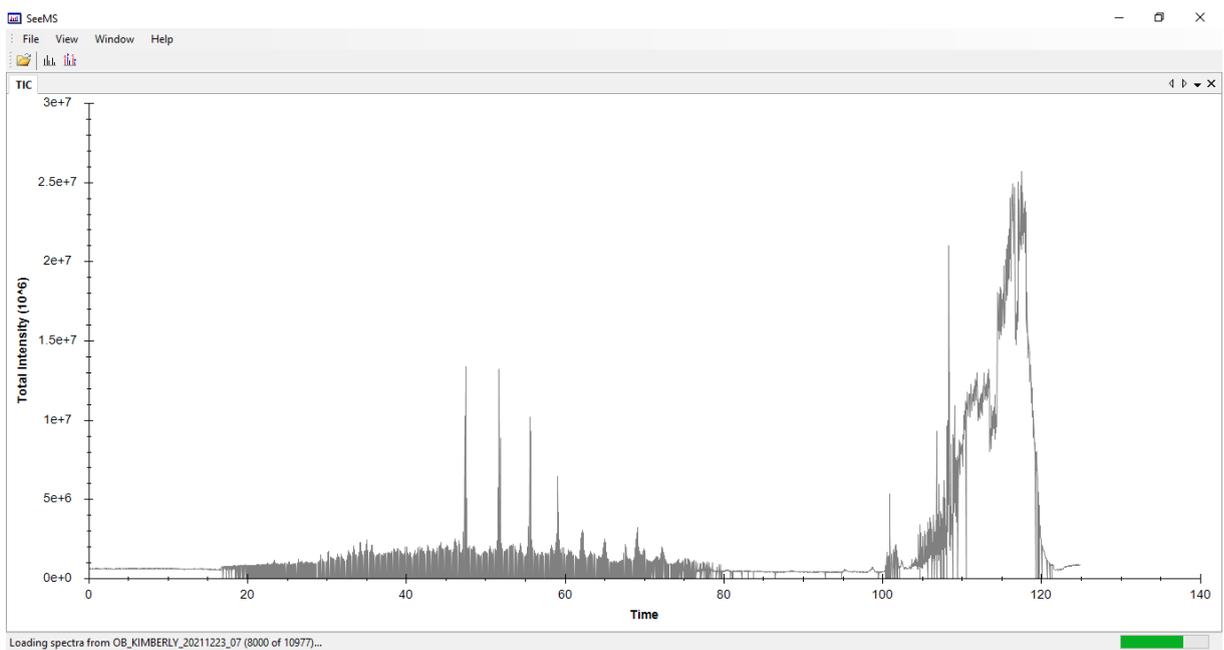
I. MCF7 tratado com 2,5 µg/ mL de veneno, réplica 3.



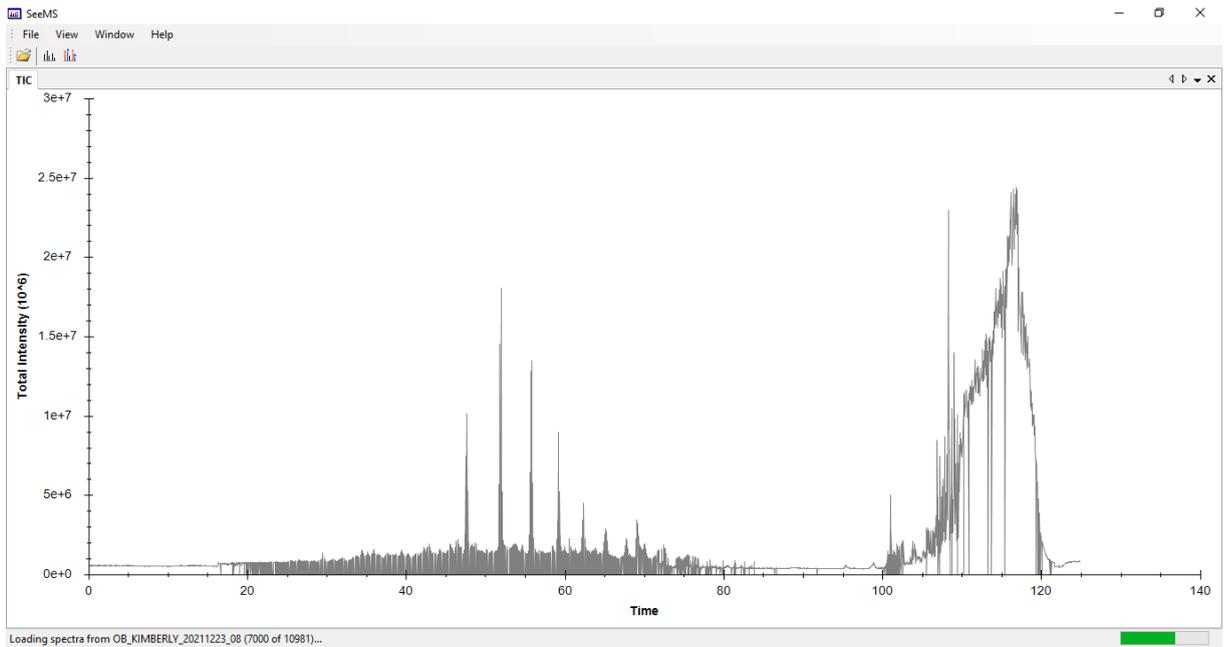
J. MDA-MB-231, controle, réplica 1.



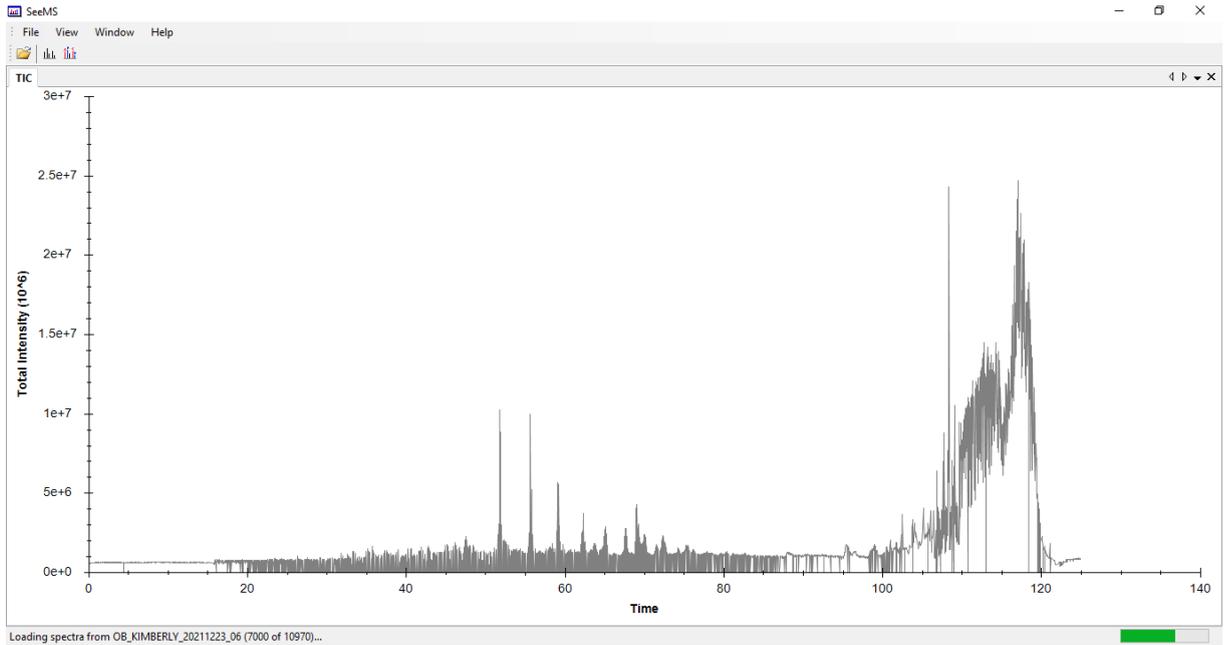
K. MDA-MB 231 controle, réplica 2



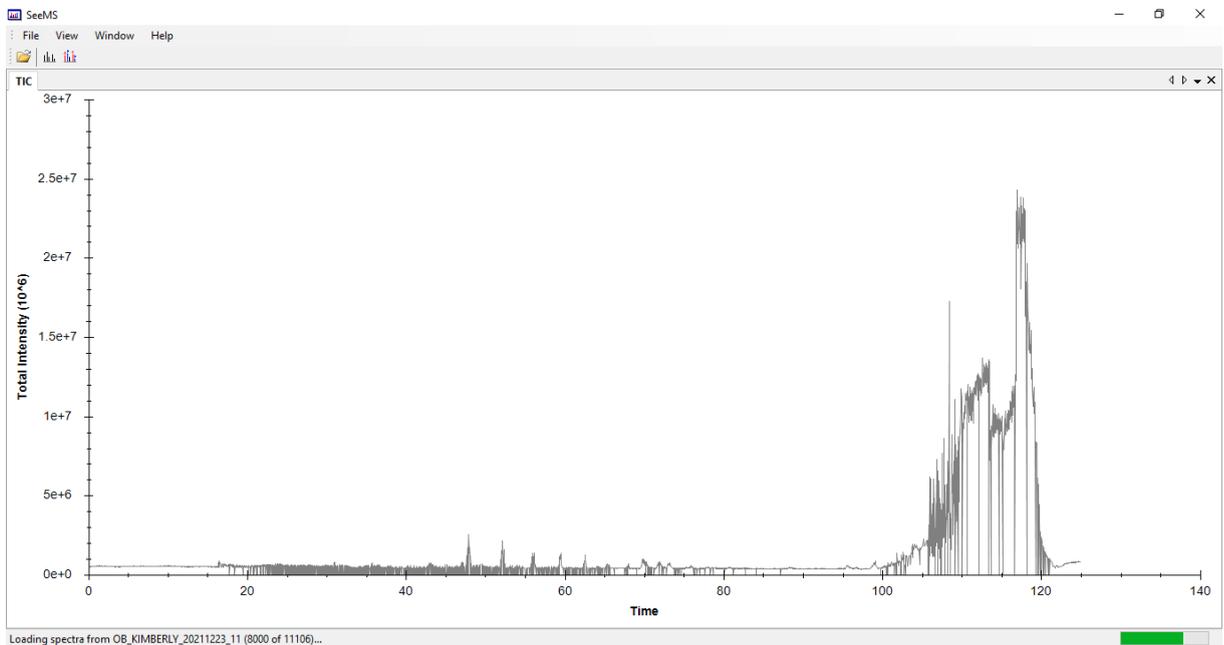
L. MDA-MB 231 controle, réplica 3.



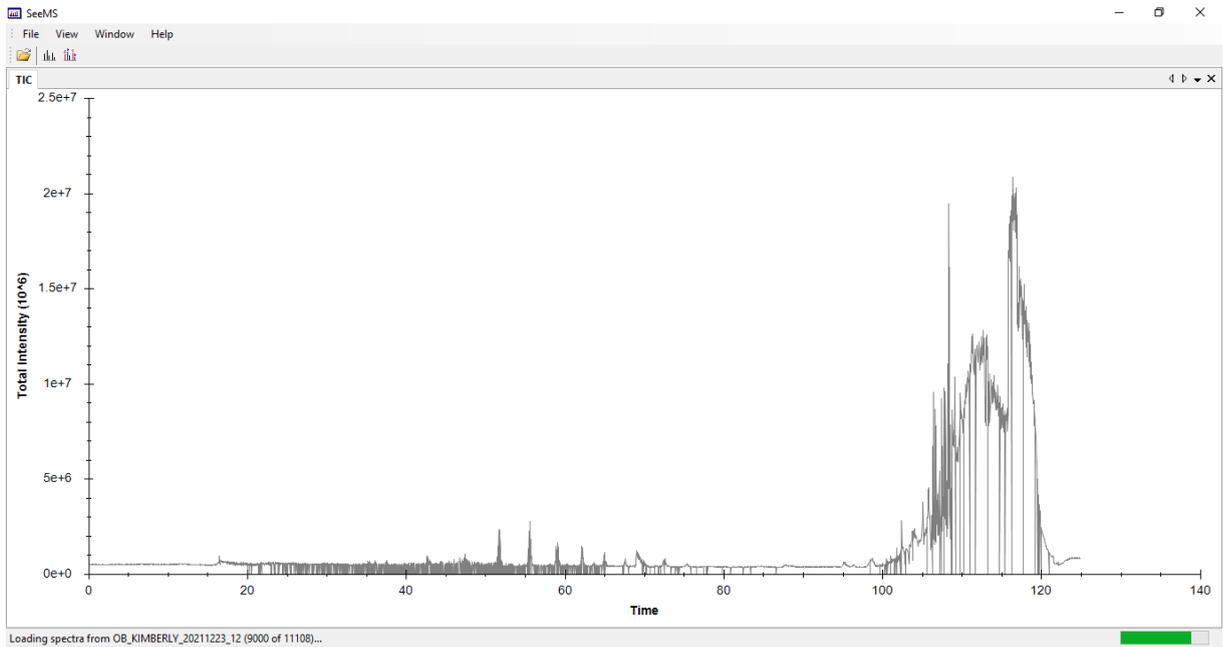
M. MDA-MB-231, tratado com veneno 0,63 µg/ mL, réplica 1.



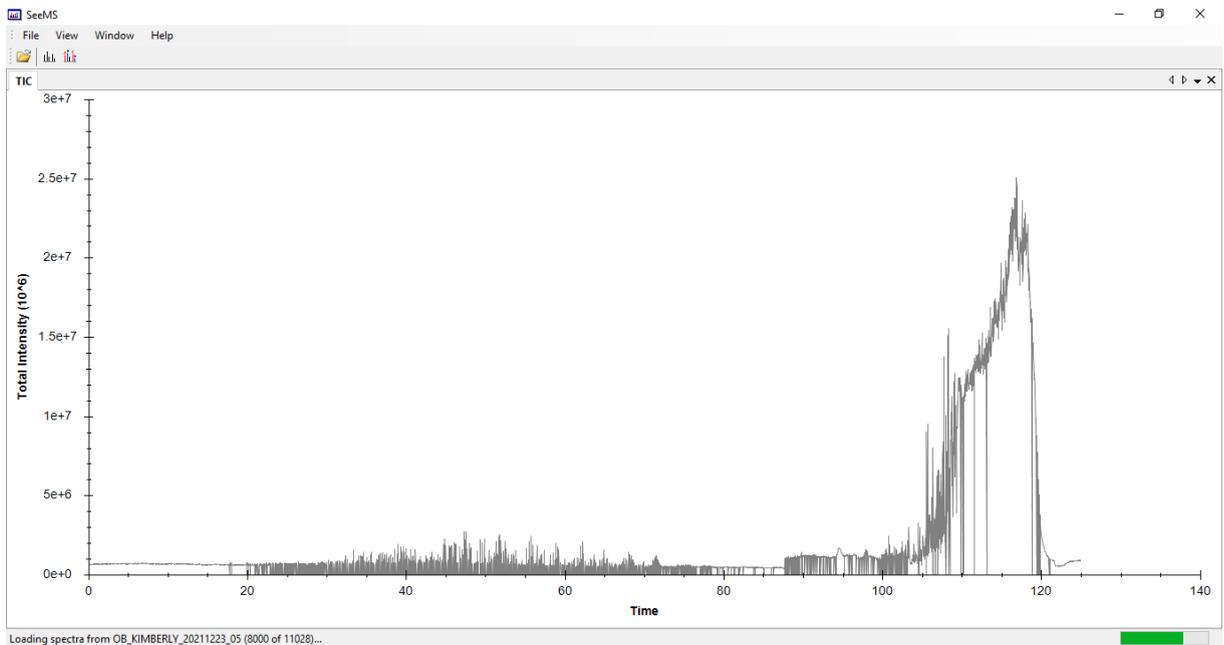
N. MDA-MB-231, tratado com 0,63 µg/ mL de veneno, réplica 2.



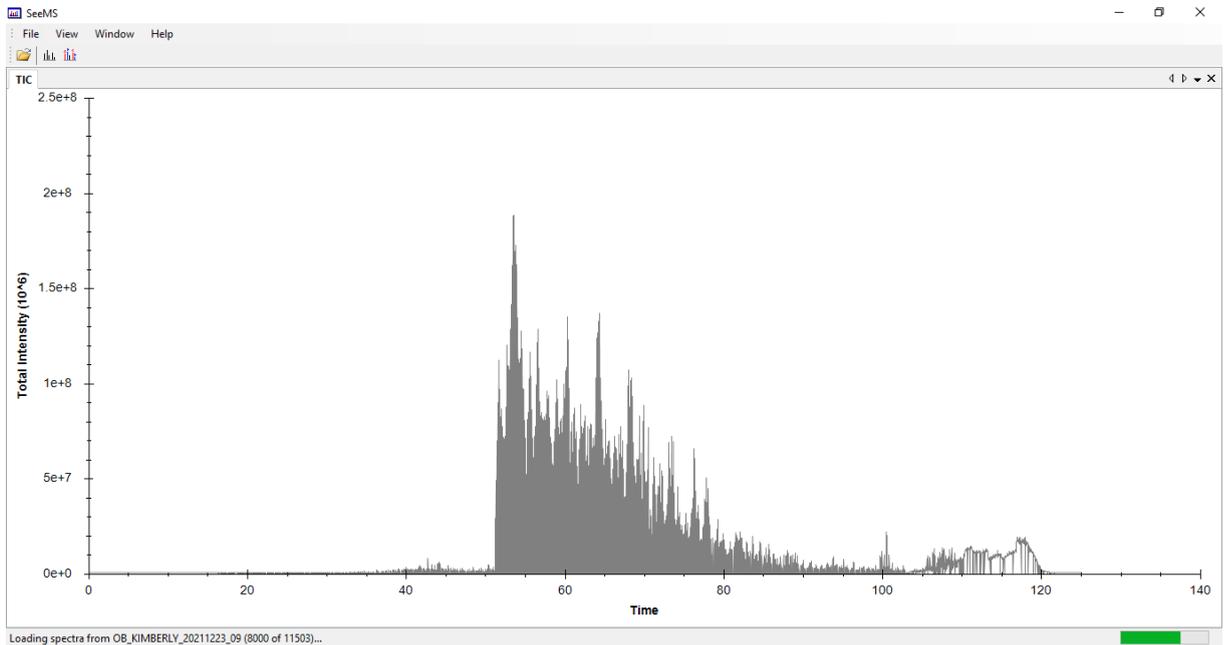
O. MDA-MB-231, tratado com 0,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno, réplica 3.



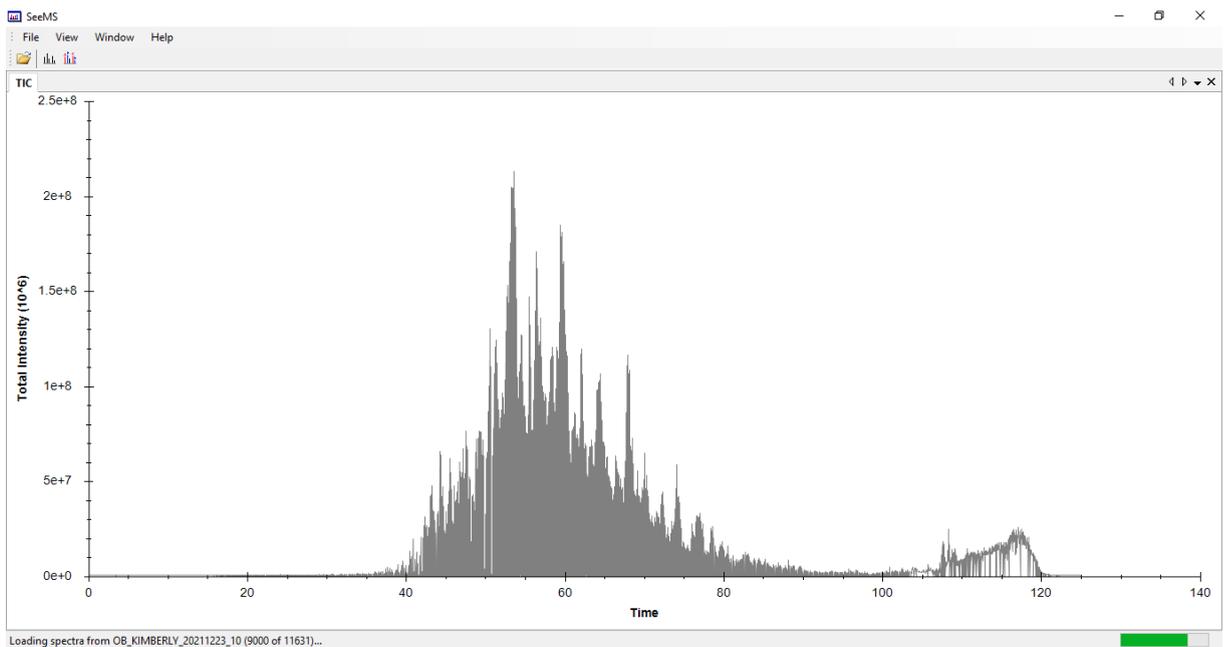
P. MDA-MB-231, tratado com veneno 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, réplica 1.



Q. MDA-MB-231, tratado com veneno 2,5 µg/ mL, réplica 2.



R. MDA-MB-231, tratado com veneno 2,5 µg/ mL, réplica 3.



Fonte: própria autora, 2022.

Análise por espectrometria de massas das amostras de linhagem celular MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com PBS (controle) ou veneno de *B. jararaca*. A-C: MCF-7 tratada com PBS (réplicas 1-3),

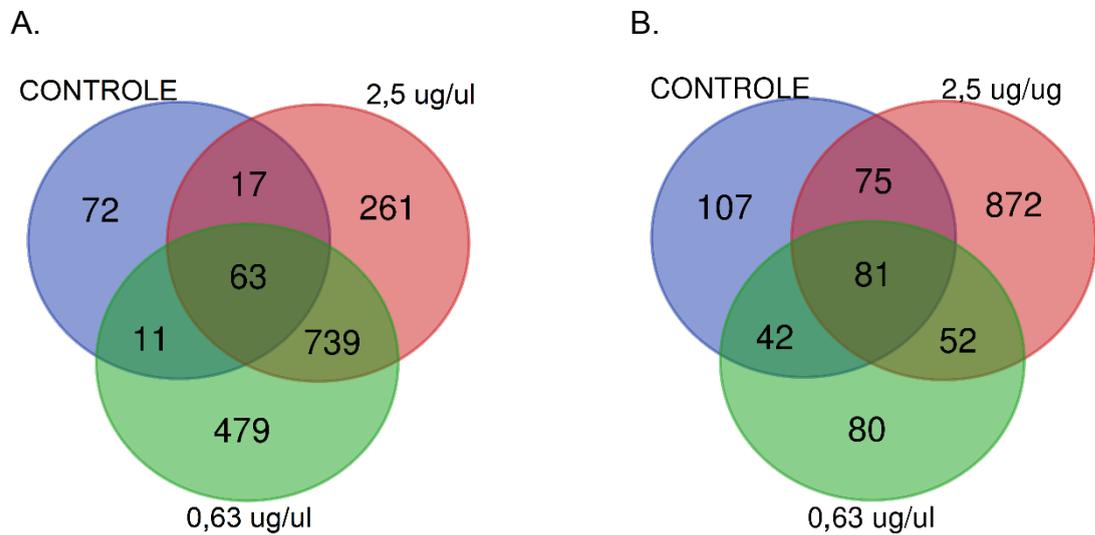
D-F: MCF-7 tratada com 0,63 µg/ mL (réplicas 1-3), G-I: MCF-7 tratada com 2,5 µg/ mL (réplicas 1-3), J-L: MDA-MB-231 tratada com PBS (réplicas 1-3), M-O: MDA-MB-231 tratada com 0,63 µg/ mL (réplicas 1-3), P-R: MDA-MB-231 tratada com 2,5 µg/ mL (réplicas 1-3).

A análise por espectrometria de massas das células MCF7 permitiu a identificação de um total de 163 proteínas diferentes no grupo controle, 1292 proteínas nas amostras tratadas com veneno a 0,63 µg/mL e 1080 proteínas nas amostras tratadas com veneno a 2,5 µg/mL. Nas células MDA-MB-231 identificamos 305 proteínas no grupo controle, 255 proteínas nas amostras tratadas com veneno a 0,63 µg/mL e 1080 proteínas nas amostras tratadas com 2,5 µg/mL.

A análise utilizando o diagrama de Venn das proteínas identificadas nas células MCF7 mostrou 72 proteínas exclusivamente no grupo controle, 479 proteínas nas amostras tratadas com 0,63 µg/mL de veneno e 261 proteínas nas amostras tratadas com 2,5 µg/mL de veneno de *B. jararaca*. Setenta e quatro proteínas foram identificadas em comum entre o grupo controle e tratado com baixa concentração de veneno a 0,63 µg/mL, 813 proteínas em comum entre o grupo de amostras tratadas com baixa e alta dose de veneno, e 80 proteínas em comum entre as amostras controle e tratadas com alta dose de veneno. Sessenta e três proteínas foram identificadas em comum entre todas as 3 condições (Figura 3A).

Nas células MDA-MB-231 a análise mostrou 107 proteínas exclusivamente do grupo controle, 80 proteínas nas amostras tratadas com 0,63 µg/mL de veneno e 872 proteínas nas amostras tratadas com 2,5 µg/mL de veneno. Cento e vinte e três proteínas foram identificadas em comum entre o grupo controle e tratado com baixa concentração de veneno a 0,63 µg/mL, 175 proteínas em comum entre o grupo de amostras tratadas com baixa e alta dose de veneno, e 156 proteínas em comum entre as amostras controle e tratada com alta dose de veneno a 2,5 µg/mL. Oitenta e uma proteínas foram identificadas em comum entre todas as três condições. (Figura 3B).

Figura 3 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas no grupo controle, grupo tratado com baixa (0,63 µg/mL) e alta (2,5 µg/mL) dose de veneno de *B. jararaca* nas células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B)



Fonte: própria autora, 2022.

O diagrama mostra o número de proteínas exclusivas em cada uma das condições bem como as proteínas identificadas em comum entre cada uma das amostras e em comum entre todas as condições.

5 DISCUSSÃO

Um dos objetivos no cultivo das células tumorais *in vitro* é observar a alteração na morfologia e proliferação celular após tratamento com toxinas tais como veneno de serpentes. Por serem células tumorais, elas apresentam um defeito no mecanismo de morte e divisão celular comparado com o de células não tumorais, além de serem mais resistentes ao manejo com fármacos ou no caso do presente estudo, venenos. Dessa forma, esta alternativa acaba sendo muito interessante em ensaios de farmacodinâmica.

A fim de realizar o treinamento com cultura celular e análise proteômica, neste projeto utilizamos como modelo experimental de treinamento as linhagens celulares tumorais de mama: MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7 - câncer de mama não metastático) e MDA-MB-231 (linhagem celular de câncer de mama triplo negativo metastático). Apesar da mesma origem, de serem muito similares e altamente correlatas, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 são diferentes em alguns aspectos importantes. A linhagem MCF-7 é um modelo para terapia hormonal, uma vez que ela é positiva para receptores de estrógeno e progesterona, porém ela é negativa para HER2v (SHIRAZ et al., 2011), considerada pouco agressiva e não invasiva (GEST et al., 2013).

A célula MDA-MB-231 é um modelo ideal para realizar estudos e tratamentos voltados à quimioterapia, uma vez que ela é conhecida por ser triplo negativo, ou seja, ela é negativa para os receptores de estrógeno e progesterona, bem como HER2 (GOLDHIRSCH et al., 2013). Também é mais propenso à ação de agentes citotóxicos, uma vez que ela não possui capacidade íntegra do reparo do DNA por causa da mutação do gene BRCA e TP53. Assim, ambos os tipos celulares apresentam resistência e sensibilidades diferentes a diversos tipos de drogas e tratamentos.

Baseado nos dados do trabalho de mestrado da aluna Carolina Yukiko Kisaki publicados recentemente na revista *Toxicon* (KISAKI et al., 2021), utilizamos estas células como modelo de treinamento no cultivo celular e as concentrações de veneno de B. jararaca determinadas como baixa e alta-dose sub-citotóxica de veneno.

Foram analisadas o efeito do veneno de *B. jararaca* nos dois tipos de linhagens tumorais de mama que mostrou diferentes comportamentos.

A observação morfológica das células tratadas com baixa e alta dose de veneno mostrou que as células MCF7 são mais resistentes ao veneno de *B. jararaca* pois pouco mudou a confluência na placa, enquanto as células MDA-MB-231 sofreram maior número de descolamentos de placa.

A proteômica baseada no mapeamento celular estuda a identificação das proteínas em compartimentos celulares específicos e determinação de suas características funcionais. A proteômica também analisa as interações proteína-proteína a fim de caracterizar sistematicamente complexos proteicos, que podem ser importantes no desenvolvimento da doença ou da droga, comparando a nível molecular, o nível proteico das células em situações normais e patológicas (LAMOND; MANN, 1997). Estudos dos efeitos da veneno de serpentes em diferentes linhagens celulares tumorais, tais como as linhagens LS174T (adenocarcinoma colorretal), HCT116 (carcinoma colorretal), HT29 (adenocarcinoma colorretal), HEL92.1.7 (eritroleucemia) e SK-BR-3 (adenocarcinoma de mama), demonstraram que a veneno de serpentes, tais como a *Calloselasma rhodostoma*, *Macrovipera lebetina* e *Bothrops matogrossensis*, inibem significativamente a viabilidade celular, seja com a veneno bruta ou fracionada (TAVARES et al., 2016; ZAKRAOUI et al., 2017). Como parte do presente estudo, amostras de linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de veneno foram preparadas para análise proteômica baseada em espectrometria de massas. Essa análise foi realizada baseando-se no trabalho de Kisaki e colaboradores (2021).

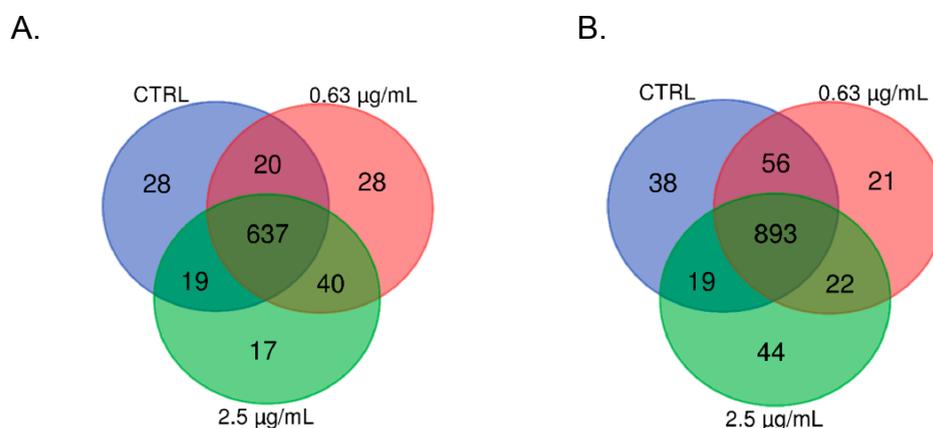
Foram preparadas três réplicas de cada condição e a análise por espectrometria de massas permitiu identificarmos até 862 proteínas em uma única amostra (condição de 0,63 µg/mL na célula MCF7, réplica 1). Porém, em algumas das amostras obtivemos um baixo número de identificação: 20 proteínas na condição 0,63 µg/mL na célula MDA-MB-231, réplica 1, 25 proteínas na amostra controle da célula MDA-MB-231, réplica 2, e 36 proteínas na condição 0,63 µg/mL na célula MDA-MB-231, réplica 3. Aparentemente nessas amostras houve uma possível perda de amostra durante as etapas de modificação química, digestão

tripsínica e dessalinização das amostras. Descartamos problemas no equipamento uma vez que o perfil de TIC dessas amostras (Figuras 2M, 2K e 2O) mostram que praticamente não havia peptídeos nessas amostras. Por outro lado, verificamos que o perfil de TIC das amostras em que foram identificadas mais de 500 proteínas: MCF7 tratada com 0,63 µg/mL de veneno réplicas 1, 2 e 3 (Figuras 2D, 2E e 2F respectivamente), MCF7 tratada com 2,5 µg/mL réplicas 1 e 2 (Figuras 2G e 2H respectivamente) e MDA-MB-231 tratadas com 2,5 µg/mL réplicas 1 e 3 (Figuras 2P e 2R respectivamente) mostraram perfis com inúmeros picos ao longo do tempo (eixo X).

As listas de proteínas identificadas nas três réplicas foram agrupadas e analisadas em conjunto. Essa análise mostrou que identificamos 40, 37 e 52 proteínas exclusivas em cada uma das amostras controle, 358, 251 e 469 proteínas tratadas com 0,63 µg/mL e 242, 223 e 140 proteínas tratadas com 2,5 µg/mL de veneno, respectivamente. Além disso, 63 proteínas foram identificadas em comum em todas as condições na linhagem MCF-7. A análise das amostras da linhagem MDA-MB-231 permitiu identificar 5, 146 e 98 proteínas exclusivas em cada uma das amostras controle, 165, 3 e 15 proteínas tratadas com 0,63 µg/mL e 219, 574 e 649 proteínas nas amostras tratadas com 2,5 µg/mL de veneno. Além disso, 81 proteínas foram identificadas em comum em todas as condições na linhagem MDA-MB-231.

Estes dados diferem bastante dos dados obtidos por Kisasi et al (2021) (Figura 4). Observamos que as amostras referentes ao grupo controle de todas as 3 réplicas em MCF7 não foram satisfatórias, porém, observamos 802 proteínas em comum entre as amostras tratadas com baixa e alta dose de veneno. Dessa forma, cremos que novas preparações de amostra referente ao grupo controle poderiam aumentar as proteínas identificadas em comum entre todas as 3 condições. O mesmo ocorreu com as amostras de MDA-MB-231 onde o número de proteínas em alta e baixa dose se mostraram muito diferentes comparados aos dados pré-existentes. Será necessário que novas amostras sejam preparadas para dados mais precisos.

Figura 4 - Representação diagramática da análise comparativa de proteínas identificadas nas células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) tratadas com PBS (CTRL) em azul, 0,63 µg/mL em vermelho e 2,5 µg/mL em verde de veneno de *B. jararaca*.



Fonte: Kisaki et al, 2021.

Diagrama de Venn das proteínas identificadas em linhagens celulares tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com PBS e veneno de *B. jararaca*.

A análise realizada previamente por Kisaki e colaboradores permitiu identificar inúmeras proteínas cuja abundância aumentou mais de 1,5x ou diminuíram menos de 0,75x. Comparativamente, os autores verificaram que a linhagem celular MCF-7 apresentou um maior número de proteínas que mudaram de abundância comparado com o MDA-MB-231. A análise dessas proteínas mostrou que elas estavam ligadas ao metabolismo e sistema imune/inflamação e as proteínas que mais se destacaram, tais como HEL-S-156an, MCCC2, GSTM3, IARS, Histona H3.2, MTCH2, HEL-S-132-P e MRPL12 estavam relacionadas ao câncer e ligadas às vias de proliferação celular, invasão, metástase, apoptose e resposta ao estresse.

A repetição das análises das amostras que apresentaram baixo número de identificação de proteínas e a continuidade das análises dos dados gerados por espectrometria de massas permitirá uma melhor comparação com os dados obtidos por Kisaki e colaboradores (KISAKI et al., 2021). Além disso, análise de diferentes concentrações e tempos e utilizando diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais e o aprofundamento das análises do perfil das proteínas exclusivas bem como nas proteínas identificadas em comum entre todas as amostras de cada uma das condições e a análise semi-quantitativa das proteínas em comum em todas as

condições permitirá traçar um perfil mais completo do efeito do veneno de *B. jararaca* sobre as linhagens celulares tumorais vs não tumorais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho com cultura de células de linhagens tumorais facilita a manutenção das culturas e é um importante meio de análises farmacodinâmicas. O tratamento com veneno de *B. jararaca* teve resultado satisfatório na análise morfológica, permitindo a visualização das diferenças entre duas linhagens tumorais tanto pré-tratamento com veneno quanto pós-tratamento com veneno. A metodologia para obtenção de amostras para análise por espectrometria de massas deve estar sempre em constante aprimoramento. Os resultados obtidos neste trabalho, em comparação com estudo similar, mostram que durante a obtenção das amostras pode ter ocorrido perda das mesmas, sendo recomendado repetir os experimentos para obter resultados mais contundentes e compatíveis com os descritos na literatura. Uma análise aprofundada utilizando parâmetros adicionais de concentração de veneno e tempos de tratamentos diferentes bem como utilizar diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais poderão traçar um perfil mais completo do efeito do veneno de *B. jararaca* sobre linhagens celulares tumorais vs não tumorais. Este trabalho foi de grande valia para o aprimoramento das técnicas trabalhadas e pôde ser estendido para outras modalidades de formações acadêmicas.

REFERÊNCIAS¹

- AHMED, F. N. **Examination of Mediator composition and p53 in distinct breast cancer lines: MCF7 and MDA-MB-231**. 2011. 28 p. Honors Thesis (Department of Chemistry and Biochemistry) - University of Colorado, Boulder, 2011. Disponível em: <https://scholar.colorado.edu/downloads/t722h933s>. Acesso em: 15 dez. 2021.
- AZEVEDO MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36, n. 2/4, p. 480–489, 2003. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v36i2/4p480-489.
- AZEVEDO MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente Crotálico. *In*: CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 108–115.
- BARROS, C. C. *et al.* Altered glucose homeostasis and hepatic function in obese mice deficient for both kinin receptor genes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40573, 2012a. DOI: 10.1371/journal.pone.0040573.
- BARROS, C. C. *et al.* Bradykinin inhibits hepatic gluconeogenesis in obese mice. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 10, p. 1419–1427, 2012b. DOI: 10.1038/labinvest.2012.105.
- BATEMAN, E. *et al.* The effects of selected Australian snake venoms on tumour-associated microvascular endothelial cells (TAMECs) in vitro. **Journal of venom research**, v. 4, p. 21–30, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24191190>. Acesso em: 18 dez. 2021.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–72, 1994. DOI: 10.1016/0163-7258(94)90049-3.
- CALDERON, L. A. *et al.* Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-19, 2014. DOI: 10.1155/2014/203639.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 42, n. 11, p. 1405–14, 2007. DOI: 10.1002/jms.1242.
- CAMARGO, A. C. M. *et al.* Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516–523, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.07.013.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Two-Volume ed. Ithaca: Comstock Pub. Associates, 2004. 976 p.

CAPRONI, Priscila. **Ação da Bothropstoxina-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o sistema imune**. 2009. 59 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. DOI:10.11606/D.85.2009.tde-29062009-145047. Acesso em: 12 dez 2021.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, v. 4, p. 75–93, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/289504875_Repteis_brasileiros_Lista_de_especies_2015. Acesso em: 19 dez. 2021.

CUNHA, K. C. da S.; FULY, A. L.; ARAUJO, E. G. de. A phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells in vitro. **Toxicon**, England, v. 57, n. 4, p. 580–585, 2011. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.12.021.

DIAS, Gabriela da Silva. **Análise proteômica da variação individual em venenos de filhotes de *Bothrops jararaca***. 2013. 43 p. Dissertação de (Mestrado em Ciências - Toxinologia) - Instituto Butantan, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://repositorio.butantan.gov.br/handle/butantan/3325>. Acesso em: 12 dez. 2021.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851–2871, 2009. DOI: 10.1007/s00018-009-0050-2.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163–9, 1965. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2927–2934, 2007. DOI: 10.2174/138161207782023739.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.012.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 909–920, 2008. DOI: 10.1002/pmic.200700777.

FURTADO, C. M. *et al.* Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30462, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030462.

GEST, C. *et al.* Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. **BioMed Central Cancer**, v. 13, n. 63, p. 1-14, 2013. DOI: 10.1186/1471-2407-13-63.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013. DOI: 10.1093/annonc/mdt303.

GUTBERLET JUNIOR, R. L.; CAMPBELL, J. A. Generic recognition for a neglected lineage of South American pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae), with the description of a new species from the Colombian Chocó. **American Museum Novitates**, v. 3316, p. 1–15, 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/281151597_Generic_recognition_for_a_neglected_lineage_of_South_American_pitvipers_Squamata_Viperidae_Crotalinae_with_the_description_of_a_new_species_from_the_Colombian_Choco. Acesso em: 11 dez. 2021.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; GIASSON, L. O. M. Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do sudeste do Brasil. **Phyllomedusa**, v. 2, n. 1, p. 35–41, 2003. DOI: 10.11606/issn.2316-9079.v2i1p35-41.

HAVRE, P. A. *et al.* The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. **Frontiers in bioscience**, v. 13, n. 13, p. 1634–45, 2008. DOI: 10.2741/2787.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Letters**, v. 354, n. 1, p. 1–6, 1994. DOI: 10.1016/0014-5793(94)01079-X.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snake venom: a potent anticancer agent. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 10, p. 4855–4860, 2012. DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.10.4855.

JIN, H.; VARNER, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **British journal of cancer**, v. 90, n. 3, p. 561–5, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601576.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006. DOI: 10.1042/BJ20060302.

KISAKI, C. Y. *et al.* *Bothrops Jararaca* snake venom modulates key cancer-related proteins in breast tumor cell lines. **Toxins**, v. 13, n. 8, p. 519, 2021. DOI: 10.3390/toxins13080519.

LAING, G. D. *et al.* Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 12, p. 3458–3463, 2003. DOI: 10.1002/eji.200324475.

LAMOND, A. I.; MANN, M. Cell biology and the genome projects a concerted

strategy for characterizing multiprotein complexes by using mass spectrometry.

Trends in Cell Biology, v. 7, n. 4, p. 139–142, 1997. DOI:

10.1016/S0962-8924(97)01031-3.

LEIGUEZ, E. *et al.* Critical role of TLR2 and MyD88 for functional response of macrophages to a group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93741, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0093741.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1171–1181, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.016.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 146–156, 2000. DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00268-X.

MCDIARMID, R. W.; CAMPBELL, J. A.; TOURÉ, T. **Snake species of the world: a taxonomic and geographic reference**. vol 1. Washington, DC: Herpetologists' League, 1999. 511 p.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. *In*: CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 42–69.

MEST, H. J.; MENTLEIN, R. Dipeptidyl peptidase inhibitors as new drugs for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 48, n. 4, p. 616–620, 2005. DOI: 10.1007/s00125-005-1707-5.

MORA, R. *et al.* A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, [S. l.], v. 45, n. 5, p. 651–660, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.01.008.

MOREIRA, V. *et al.* An Asp49 phospholipase a 2 from snake venom induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E 2 production via activation of NF- κ B, p38MAPK, and PKC in macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–10, 2014. DOI: 10.1155/2014/105879.

NEGROMONTE FILHO, G. C. **Tumores metastáticos nos líquidos cavitários**. 2011. 92 p. Monografia (Especialização em Citologia Clínica) - Universidade Paulista, Recife, 2011. Disponível em: <https://www.cceursos.com.br/img/resumos/citologia/10.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2021.

NICOLAU, C. A. *et al.* An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214–231, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.06.029.

PHILLIPS, D. R.; SCARBOROUGH, R. M. Clinical pharmacology of eptifibatide. **The**

American Journal of Cardiology, v. 80, n. 4, p. 11B-20B, 1997. DOI: 10.1016/S0002-9149(97)00572-9.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001. DOI: 10.1590/S0104-42302001000100026.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475–480, 1997. DOI:10.1590/S0037-86821997000600006.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **The American journal of physiology**, v. 156, n. 2, p. 261–73, 1949. DOI: 10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261.

SHIRAZ, F. H. *et al.* Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds. *In*: GUNDUZ, M.; GUNDUZ, E. **Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis**. London: InTech, 2011. p. 85–102. DOI: 10.5772/23005.

SINAN - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO: **acidente por animais peçonhentos**. DATASUS. Atualizado em: dez 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 12 dez. 2021.

STOCKER, K. F. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. *In*: STOCKER, K. F. **Medical use of snake venom proteins**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 97–160.

TAGORE, D. M. Peptidase substrates via global peptide profiling. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 23–25, 2009. DOI: 10.1038/nchembio.126.

TAN, N. H.; FUNG, S. Y. Snake venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2008. Disponível em: <https://eprints.um.edu.my/3701/>. Acesso em: 15 dez. 2021.

TANJONI, I. *et al.* Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851–861, 2005. DOI: 10.1007/s10495-005-2945-1.

TAVARES, C. *et al.* L-Amino acid oxidase isolated from *Calloselasma rhodostoma* snake venom induces cytotoxicity and apoptosis in JAK2V617F-positive cell lines. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 2, p. 128–134, 2016. DOI: 10.1016/j.bjhh.2016.03.004.

UNDERWOOD, G. **A contribution to the classification of snakes**. London: Trustees of the British Museum Natural History, 1967. 117 p.

VYAS, V. K. *et al.* Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156–162, 2013. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60042-8.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951–967, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.030.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 28, p. 2872–86, 2007. DOI: 10.2174/138161207782023775.

ZAKRAOUI, O. *et al.* Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression. **Molecular carcinogenesis**, v. 56, n. 1, p. 18–35, 2017. DOI: 10.1002/mc.22470.

APÊNDICE

Apêndice A - MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO CIENTÍFICO

Toxicon: X

Scorpion venom as a potential source for cancer drug: diagnosis and therapy --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Short review
Section/Category:	Translational applications of toxins
Keywords:	Scorpion venom; cancer; drug discovery
Corresponding Author:	Leo Kei Iwai, PhD Instituto Butantan Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL
First Author:	Stephanie Santos Suehiro Arcos
Order of Authors:	Stephanie Santos Suehiro Arcos Kimberly Borges Evangelista Wellington da Silva Santos Fernanda Calheta Vieira Portaro, PhD Zhibin Chen, MD, PhD Leo Kei Iwai, PhD
Abstract:	Cancer is defined as abnormal cells that divide without control and can invade nearby tissues, causing a disruption in the body's homeostasis and may spread to other parts of the body becoming a metastasis. Surgery, chemotherapy and immune therapy have saved many lives but the limits of their efficacy are also well known. As such, the search for innovative treatments against cancer has been an ongoing endeavor. Alternative therapies using medical applications of animal venoms are not commonly discussed for effective cancer treatment. Venoms are a cocktail of complex mixtures of proteins, peptides, amino acids, mucoproteins, enzymes, inorganic salts and ions. Scorpion venom toxins are known for their negative and deleterious effects on cells, tissues and organisms. Moreover, some components of scorpion venoms have shown antimicrobial, anticancer and immunomodulatory activities. In this review, we describe the biomedical and immunological action of different scorpion venoms in cancer and their mechanisms of action with a potential to be explored for the development of new drugs for cancer therapy and treatment.
Suggested Reviewers:	Matheus Freitas Fernandes Pedrosa, PhD Associate Professor, Federal University of Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte mpedrosa@ufrnet.br; mffpedrosa@gmail.com He has experience in biotechnology, with emphasis on scorpion peptides (transcriptomics, proteomics, structural characterization and biological activity), snake proteins (biological activity and natural anti-venom products), inflammation and immunobiological production. Maria Elena de Lima, PhD Full professor, Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas: Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas melenalima@icb.ufmg.br Expert in arthropod venoms such as Phoneutria, Tityus, and Lycosa with an emphasis on identification and analysis of peptides with antimicrobial, anticancer, insecticide, antinociceptive, erectile function applications in health and biotechnology.
Opposed Reviewers:	

1 **Scorpion venom as a potential source for cancer drug: diagnosis and therapy**

2

3 Stephanie Santos Suehiro Arcos¹, Kimberly Borges Evangelista¹, Wellington da Silva
4 Santos¹, Fernanda Calheta Vieira Portaro², Zhibin Chen³, Leo Kei Iwai^{1*}

5

6 1. Laboratory of Applied Toxinology (LETA) and Center of Toxins, Immune-Response
7 and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo, 05503-900, Brazil

8 2. Laboratory of Structure and Functions of Biomolecules, Butantan Institute, São
9 Paulo, 05503-900, Brazil

10 3. Department of Microbiology and Immunology, University of Miami Miller School of
11 Medicine, Miami, FL 33136, USA.

12

13

14

15 Running Title: **Scorpion venom as a source for cancer drug**

16

17

18 ***Corresponding author**

19 Dr. Leo K. Iwai, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, 05503-900, Brazil

20 Phone: +55 11 2627 9731

21 E-mail: leo.iwai@butantan.gov.br

22

23 **Abstract**

24 Cancer is defined as abnormal cells that divide without control and can invade nearby
25 tissues, causing a disruption in the body's homeostasis and may spread to other parts
26 of the body becoming a metastasis. Surgery, chemotherapy and immune therapy have
27 saved many lives but the limits of their efficacy are also well known. As such, the
28 search for innovative treatments against cancer has been an ongoing endeavor.
29 Alternative therapies using medical applications of animal venoms are not commonly
30 discussed for effective cancer treatment. Venoms are a cocktail of complex mixtures
31 of proteins, peptides, amino acids, mucoproteins, enzymes, inorganic salts and ions.
32 Scorpion venom toxins are known for their negative and deleterious effects on cells,
33 tissues and organisms. Moreover, some components of scorpion venoms have shown
34 antimicrobial, anticancer and immunomodulatory activities. In this review, we describe
35 the biomedical and immunological action of different scorpion venoms in cancer and
36 their mechanisms of action with a potential to be explored for the development of new
37 drugs for cancer therapy and treatment.

38

39

40 **Keywords:** Scorpion venom, cancer, drug discovery.

41

42 1. Introduction

43 Cancer is a comprehensive term for a large cluster of diseases that can affect
44 any part of the body. It is one of the most deadly diseases worldwide, accounting for
45 nearly 10 million deaths only in 2020, according to the World Health Organization [1].
46 There are several types of cancer. In terms of new cases, the most common types of
47 cancer in 2020 were: breast (2.26 million cases), lung (2.21 million cases), colon and
48 rectum (1.93 million cases), prostate (1.41 million cases), skin (non-melanoma) (1.20
49 million cases), and stomach (1.09 million cases); and the most common causes of
50 cancer death in 2020 were lung (1.80 million deaths), colon and rectum (935.000
51 deaths), liver (830.000 deaths), stomach (769.000 deaths), and breast (685.000
52 deaths) [1].

53 Cancer is defined as abnormal cells that divide without control and can invade
54 nearby tissues, causing a disruption in the body's homeostasis. It can also spread to
55 other parts of the body through the blood and lymph systems, becoming a metastasis,
56 which are the primary cause of death from cancer [2]. The incidence rate of cancer
57 rises dramatically with age. It happens because there is a tendency for cellular repair
58 mechanisms to be less effective as a person grows older. Still, the causes of cancer
59 are very comprehensive, since there is no pattern for the cancer to manifest and it can
60 be due to genetic and/or environmental factors. Cancer is the result of the interaction
61 between inherited genetic mutation of an individual and environmental factors such as
62 physical carcinogens (ultraviolet and ionizing radiation), chemical carcinogens
63 (asbestos, components of tobacco smoke, aflatoxin - a food contaminant -, and
64 arsenic - a drinking water contaminant -), and biological carcinogens (infections from
65 certain viruses, bacteria, or parasites) [3].

66 Although there are preventive ways to avoid the cancer development, once it
67 starts to grow inside the body, it will demand some kind of treatment. Early detection
68 or diagnosis of cancer is crucial for the patient survival. A correct cancer diagnosis is
69 essential for appropriate and effective treatment since every cancer type requires a
70 specific treatment regimen.

71 Alternative therapies using medical applications of animal venoms are not
72 commonly mentioned when discussing effective ways for cancer treatment. Traditional
73 Medicine is often recognized as "complementary", "alternative" or "non-conventional"
74 medicine [4]. Some examples of these traditional medicines are the use of larvae
75 (*Vespa manchuria* Smith) in South Korea, eaten daily during winter in order to feel less

76 cold; adult vespids and larvae commonly seen in various bottled spirits offered for sale
77 and used as a fortifying in Taiwan [5 6]; products derived from the *Varanus*
78 *bengalensis* lizard used to treat hemorrhoids, rheumatism, body pain and burns, as
79 well as spider and snake bites in India [7]; rattlesnake venom pills used for curing a
80 wide variety of ailments, including skin blotches, cancer, sores, rashes, pimples, welts,
81 itching, rheumatism, varicose veins, face blotches, acne, blackheads, stress, heart
82 disease, diabetes, hemorrhoids, and sexual impotence in Mexico [8]. It has been
83 described over 165 species of reptiles used in traditional folk medicine, where the
84 groups with the largest numbers of species were snakes (60 species), followed by
85 lizards (51), turtles and tortoises (43), and crocodilians (11) [9]. There are currently
86 several drugs derived from animal venom that have been approved by the Food and
87 Drug Administration of several countries such as the Captopril, commonly used to treat
88 high blood pressure (hypertension) and it is derived from a peptide present in the
89 *Bothrops jararaca* snake venom. It was the first orally active inhibitor of angiotensin-
90 converting enzyme responsible for conversion of inactive angiotensin I to the potent
91 suppressor peptide angiotensin II [10 11]. In addition, Eptifibatide derived from the
92 *Echis carinatus* snake venom developed as an antiplatelet drug [12], Zoconotide
93 derived from *Conus magus* marine snail venom used for pain therapeutics [13], and
94 Exenatide derived from *Heloderma suspectum* gila monster venom used for type 2
95 diabetes treatment [14].

96 Venoms are a cocktail of complex mixtures of proteins, peptides, amino acids,
97 mucoproteins, enzymes and non-protein inclusions such as inorganic salts and ions.
98 Many organisms are capable of producing venom, such as scorpions, snakes, spiders,
99 centipedes, frogs, fishes and even birds.

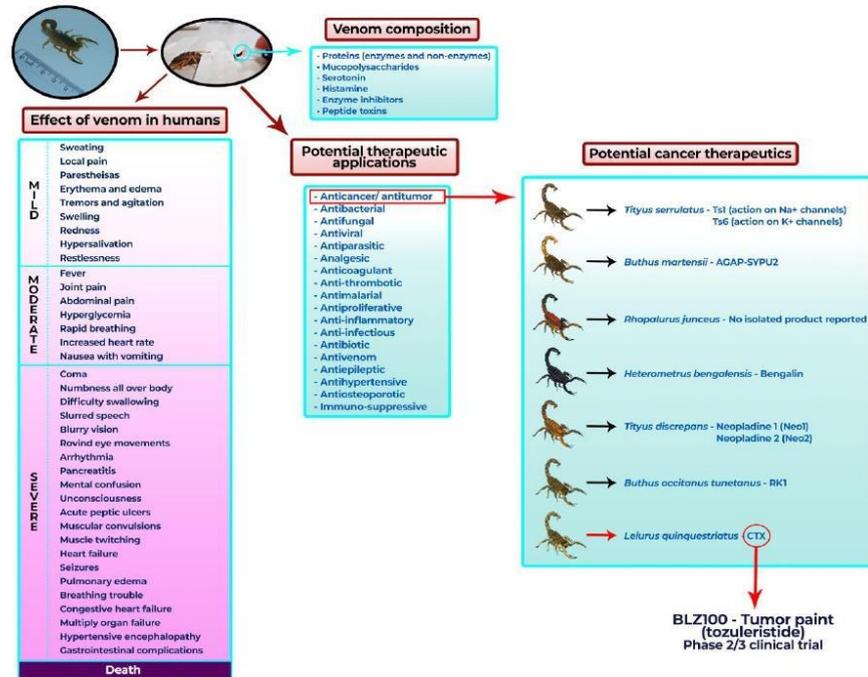
100 Toxins related to the scorpion venom are known for their negative and
101 deleterious effects on cells, tissues and organisms. However, despite their toxicity,
102 scorpion venoms are also a rich mixture of bioactive compounds, which are a natural
103 source of molecules that have been used for the benefit of human health. Thus,
104 antagonistically, some components of scorpion venoms have shown antimicrobial,
105 anticancer, and immunosuppressive activities with potential for the development of
106 pharmaceutical drugs [15]. Scorpion venom is composed by a mixture of several
107 different proteins (enzymes and non-enzymes), mucopolysaccharides, serotonin,
108 histamine, enzyme inhibitors, and peptide toxins [16].

109 Studies that permeate anticancer activities have shown that venom molecules
110 of some scorpions inhibited the growth of human glioma [17], prevented proliferation,
111 induced apoptosis in leukemic cells [18], inhibited growth and induced apoptosis in
112 human prostate cancer cells (DU145) [19] and have differential and selective toxicity
113 against epithelial cancer cells [20]. In addition, Soroceanu and colleagues (1998)
114 showed that the use of chlorotoxin, a 36 amino acid peptide derived from the *Leiurus*
115 *quinquestriatus* scorpion venom, was efficient in marking primary brain tumors
116 (gliomas) [21]. A direct application of this toxin is the Tumor Paint BLZ-100, which has
117 been in the clinical phase 2, and is used in neurosurgery to promote almost complete
118 resection of gliomas [22]. In addition, a study involving the action of two peptide
119 components from the venom of a scorpion from the genus *Tityus* (neoplaline 1 and
120 neoplaline 2) revealed that these molecules induce apoptosis in human breast
121 carcinoma cells (SKBR3) by inducing the expression of FasL and Bcl-2 apoptosis-
122 related ligands [23]. Also, a few scorpion enzymes have been reported to have
123 anticancer activities in breast cancer, such as the serine proteinase-like protein BMK-
124 CBP [24] and a hyaluronidase BmHYA1 [25], both isolated from the *Buthus martensii*
125 scorpion venom. Moreover, a short peptide from *Buthus occitanus tunetanus* scorpion
126 venom was recently shown to present potential to inhibit tumor cell migration,
127 proliferation and angiogenesis [26 27].

128 In this review, we describe the biomedical and immunological action of different
129 scorpion venoms in cancer and their mechanisms of action that can be explored for
130 the development of drugs against cancer (Figure 1)

131

132



133

134 Figure 1. Scorpion venom composition, effect in humans, potential therapeutic
 135 applications, and potential cancer therapeutics application.

136

137

138 1.1. *Tityus serrulatus* scorpion venom induction of inflammation and immune 139 responses

140 The *Tityus serrulatus* scorpion, popularly known as the "Brazilian yellow
 141 scorpion", is one of the most medical and scientific relevant in Brazil due to the severe
 142 clinical manifestations in injured victims.

143 Magalhães et al., (1999) and Fukuhara et al., (2003) analyzed the production
 144 of inflammatory mediators in envenomed patients by *T. serrulatus*, and these showed
 145 high levels of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 1 alpha (IL-1 α) found in
 146 mild and moderate cases, while high levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, interferon gamma (IFN- γ)
 147 and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) were related to
 148 the severe cases, indicating a worse prognosis [28 29]. In murine macrophages, *T.*
 149 *serrulatus* venom (TsV) and isolated neurotoxins - Ts1 (acting on Na⁺ channels) and

6

150 Ts6 (acting on K⁺ channels) - also increase the pro-inflammatory mediators IL-6, TNF-
151 α and IFN- γ [16 30]. The production of these mediators is induced by the interaction
152 of TsV and Ts1 with Toll-like 2 (TLR2) and CD14/TLR4 receptors that activate the NF-
153 $\kappa\beta$ and MAPK pathways [31]. It was also reported that the neurotoxin called Ts2
154 causes increased production of the anti-inflammatory cytokine, IL-10 [30].

155 Scorpion envenomation has an inflammatory response that lasts over 24 h after
156 the accident, although the symptoms' evolution starts 5 h after the envenomation [32].
157 Generally, reports in mild and moderate cases are local pain, sweating, nausea, and
158 vomiting. In severe cases, there is an evolution to systemic inflammation of the body,
159 leading to arterial hypertension, tachycardia or bradycardia, which can lead to cardiac
160 shock or pulmonary edema [32]. The way the immune system is activated by the
161 scorpion venom is still not completely elucidated, however, two hypothesis are being
162 studied: 1) Activation through depolarization and repolarization of nerve cells, leading
163 to the release of neuropeptides that bind to inflammatory cell receptors, which in turn
164 leads to the release of inflammatory mediators; and 2) Venom neurotoxins having
165 direct action on inflammatory cells, which leads to the activation of macrophages and
166 lymphocytes, generating the inflammatory process [32].

167 From the moment of the scorpion accident, several immune and inflammatory
168 changes occur, which can be detected through specific blood tests. For example, after
169 30 minutes of scorpion sting, there is an increase in serum levels of the tumor necrosis
170 factor TNF- α , a pro-inflammatory cytokine that induces an immune system response,
171 promoting systemic or local inflammation leading to vasodilation and stimulation of
172 other cytokines and chemokines. After 120 minutes of the accident, it is observed an
173 increase in the number of neutrophils, increase in IL-6 and a drop in spleen cells
174 number. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that signals the multiplication and
175 differentiation of B cells into antibody-forming cells and causes an exacerbation of
176 acute inflammation signs. Within 360 minutes of the envenomation, it is observed a
177 reduction in the amount of TNF- α and IL-6, and an increase in the amount of IL-10,
178 and an increase in the number of lymph nodes, spleen cells and mast cells. IL-10 is
179 an anti-inflammatory cytokine that acts by inhibiting the synthesis of pro-inflammatory
180 cytokines, gradually reducing acute inflammation. IL-10 also acts as a co-stimulator of
181 mast cells production, which acts directly on inflammation and may be a risk factor for
182 pulmonary edema [16 33].

183

184 **1.2. *Buthus martensii* Karsch scorpion venom against cancer and pain**

185 The Asian *Buthus martensii* Karsch (BmK), also known as gold scorpion or
186 Chinese scorpion, is a very common species in China, Mongolia, Korea, and Japan.
187 Its venom has been used in traditional Chinese medicine to treat a variety of diseases
188 for over 2000 years especially as a painkiller such as migraine, rheumatism-related
189 pain, and cancer pain. Prostate cancer is an invasive type of cancer that can easily
190 lead the patient to death. The prostate cancer progression has potential to develop
191 from a small latent carcinoma to originate a high-grade metastasis [34 35]. The growth
192 and development of prostate cancer is frequently androgen-dependent, making
193 androgen-deprivation one of the most used therapies against this type of cancer [35
194 36]. However, there are androgen-independent carcinoma cells, making this type of
195 treatment usually not 100% efficient [37]. As an alternative to prostate cancer
196 treatment, Zhang and colleagues (2009) have been studying the use of a Polypeptide
197 Extract from BmK Scorpion Venom (PESV), which is composed of a major biologically
198 active polypeptide component of 50-60 amino acids extracted from the venom and
199 have been reported to have anticancer activities [19]. PESV has been described as a
200 potent anti-proliferative and anti-apoptosis induced activity against HUVEC cells,
201 inhibition of neovascularization, and tumor growth suppression of S180 sarcoma and
202 H22 hepatocellular carcinoma in mice [38]. Also, it has been hypothesized that PESV
203 could be effective as a chemoprevention or intervention agent against prostate cancer,
204 inducing DU145 cells to a cell cycle arrest, inhibiting tumor growth and inducing
205 apoptosis [19]. PESV has also been shown to strongly induce the expression of
206 Kip1/p27 and decrease cyclin E expression, increasing interaction with CDKs and
207 CDK, probably causing inhibition of kinase activity of CDKs. The uncontrolled CDKs
208 activity is one of the major causes of cancer progression and their functions are
209 regulated by CDKs [39]. Still, more studies are required to support this hypothesis and
210 to identify the exact mechanism of action of the venom in modulating mitogenic and
211 survival signaling cascade in human prostate cancer using different prostate cancer
212 cells and animal models [19].

213 In breast cancer cells, the nonsulfated glycosaminoglycan hyaluronan has been
214 shown to be up-regulated and often correlated to tumor aggressiveness. Moreover, it
215 has been described that hyaluronan has important physiological and pathological
216 functions [40]. Feng and colleagues (2008) have shown that hyaluronidase isolated
217 from BmK scorpion venom was able to completely remove hyaluronan from the triple

218 negative MDA-MB-231 breast cancer cell line [25]. Hyaluronan has shown to be
219 important in cancer cell migration, invasion, adhesion and metastasis by interacting
220 with CD44 [41], which is also expressed in high levels in cancer cells, generating CD44
221 variants (CD44v) by alternative splicing of a gene [42]. CD44v6 has been suggested
222 to be down-regulated after treatment of MDA-MB-231 with hyaluronidase, confirming
223 that the CD44 variant of cancer cells can be modulated by external signaling by
224 hyaluronidase treatment [25]. In addition, another study reported a 33 kDa serine
225 proteinase-like from the BmK (BMK-CBP) binding specifically in a dose-dependent
226 manner to the MCF-7 cancer cell membrane, although the receptor was not described
227 [24].

228 Another peptide isolated from BmK scorpion venom is AGAP-SYPU2. Shao
229 and collaborators (2014) purified AGAP-SYPU2 via bioassay-driven chromatographic
230 route, and this peptide has shown analgesic and antitumor activities in animal tests
231 Peptide GAP-SYPU2 exhibited strong analgesic effects against visceral and somatic
232 pain, and its primary sequence has high homology to sodium channel (Na⁺) inhibitors
233 [43]. Scorpion α -toxins bind to sodium channels, blocking neuronal transmission [44].
234 Although BmK AGAP-SYPU2 has shown its effectiveness, its potency was slower
235 compared to the positive control painkiller, morphine [43]. Moreover, the anticancer
236 activity shown by BmK AGAP-SYPU2 prolonged the survival of 36.05% Ehrlich ascites
237 tumor mouse model and reduced the tumor weight of 46.3% S180 fibrosarcoma
238 mouse model [43]. In another work, Zhao and colleagues (2011) has demonstrated
239 that BmK AGAP can inhibit the proliferation and migration of Suzhou Human Glioma-
240 44 (SHG-44) cells derived from lymph node metastatic site, where sodium channels
241 play an important role in the proliferation and migration of cancer cells [45]. Because
242 of the high sequence identity between BmK AGAP and BmK AGAP-SYPU2, the
243 anticancer activity of BmK AGAP-SYPU2 was described to possibly involve sodium
244 channels [43]. The dual-function shown by BmK AGAP-SYPU2 as a pain reliever and
245 antitumor effects is clinically valuable, since it improves patient survival without
246 compromising the patient's quality of life [43].

247

248 **1.3. Effects of *Rhopalurus junceus* scorpion venom on cancer cells and cancer** 249 **mouse models**

250 The *Rhopalurus junceus* scorpion is an endemic species from Cuba belonging
251 to the Buthidae family. *R. junceus* venom has been used in Cuban traditional medicine

252 for the treatment of some illnesses, including cancer. Díaz-García and collaborators
253 (2013) evaluated the anticancer effect of *R. junceus* scorpion venom on different
254 cancer cell lines: HeLa, SiHa, Hep-2, NCI-H292, A549, MDA-MB-231, MDA-MB-468,
255 and HT-29, hematopoietic cells lines: U937, K562, and Raji and normal cells: MRC-5,
256 MDCK, and Vero. They verified that the venom induced a significant viability effect on
257 HeLa and A549 cancer cell lines without affecting normal cells [20]. In HeLa cells, the
258 venom induced apoptotic cell death involving p53 up-regulation, which influences the
259 activation of pro-apoptotic genes, such as bax, and suppression of anti-apoptotic
260 genes, such as bcl-2, which plays an important role in the activation of caspases and
261 dominates intrinsic pathways of apoptosis [46]. These results indicate that
262 mitochondria-mediated apoptosis is involved in scorpion venom-induced cell death in
263 HeLa cells [20]. A more recent study showed that combinations of this scorpion venom
264 with low concentrations of chemotherapy drugs such as 5-FU, CDDP, and DOX
265 increased the cytotoxic effect in the HeLa cells [47].

266 In the adenocarcinomic human alveolar basal epithelial A549 cell line, the *R.*
267 *junceus* venom induced necrotic cell death involving p53 and bcl-2 mRNA down-
268 regulation, while bax expression level remained the same. Bcl-2 overexpression is
269 responsible for many drug-resistant or apoptotic-resistant cancers, such as in B-cell
270 lymphoma and small cell lung cancer [48], and it could be also responsible to mediate
271 programmed necrosis [48 49]. Higher venom concentration, over the IC50, lead A549
272 cells to necrosis, while lower concentration, below IC50, lead HeLa cells to apoptosis,
273 showing that the necrosis and apoptosis could be venom concentration dependent
274 [20].

275 The investigation of the *R. junceus* scorpion venom effect in triple negative-
276 MDA-MB-231 breast cancer cells showed that the venom has a notable anticancer
277 activity with minimal effects on normal cells [50]. Cell morphology analysis through
278 fluorescent DAPI staining showed that the cells treated with the scorpion venom
279 presented shrunken and marginated nuclei in cancer cells, while the non-treated cells
280 presented large nuclei. The authors noticed formation of apoptotic nuclei, chromatin
281 condensation, apoptotic bodies and cell membrane blebbing, providing evidence of
282 the apoptotic potential in those cancer cells. At the molecular level, the scorpion venom
283 treatment induced an up-regulation of p53 gene and several pro-apoptotic genes such
284 as bax, noxa and puma, and down-regulation of anti-apoptotic genes, such as bcl-2

285 and bcl-xL, possibly inducing apoptosis through the mitochondrial-apoptotic pathway
286 [50].

287 In a pharmacokinetic study, investigating the biodistribution of *R. junceus*
288 scorpion venom in tumor-bearing mice after intravenous or oral administration showed
289 that the *R. junceus* scorpion venom has a long lasting presence in tumor tissue
290 compared to other main organs. Both intravenous and oral administration of the *R.*
291 *junceus* venom were able to reach all tissues in the body, however, the scorpion
292 venom presence was momentary. Although the oral administration showed low
293 bioavailability of *R. junceus* scorpion venom at all organs, suggesting high degradation
294 of venom components, it was observed that the venom kept targeting the tumor [51].
295

296 **1.4. *Heterometrus bengalensis* Koch scorpion venom and apoptosis induction** 297 **in leukemic cells**

298 *Heterometrus bengalensis* Koch is a scorpion that is highly prevalent in the
299 state of West Bengal of Eastern India. Gupta and collaborators (2007) studied the *H.*
300 *bengalensis* Koch venom cytotoxic profile by investigating the antiproliferative and
301 apoptotic efficacy of *H. bengalensis* Koch venom against two human leukemic cell
302 lines, U937 and K562. Nuclear fragmentation and margination were found in treated
303 U937 and K562 cells in comparison with the untreated control cells, and fluorescence
304 microscopic observations indicated nuclear disintegration when stained by ethidium
305 bromide and acridine orange, characterizing an apoptotic event [52]. Apoptosis usually
306 presents several morphological changes such as membrane blebbing, cell shrinkage,
307 chromatin condensation, nuclear fragmentation and formation of apoptotic bodies [53].
308 Evidence from morphological changes, comet assay, and flow cytometry analysis
309 indicated that *H. bengalensis* venom has antiproliferative and apoptogenic effects on
310 both U937 and K562 tumor cell lines [52].

311 Another study from the same group isolated a component present in *H.*
312 *bengalensis* venom responsible for the action described in the earlier study [18]. They
313 isolated and purified a protein named Bengalin, which may have anticancer activity
314 against human leukemic U937 and K562 cells. Bengalin induced U937 and K562 cell
315 death promoting apoptosis mediated by the mitochondrial pathway where HSP70,
316 HSP90, telomerase activity suppression and initiation of DNA damage were important
317 features in Bengalin mediated apoptosis [18]. However, more studies are needed to

318 investigate the exact mechanisms of action of this compound and perform *in vivo*
319 assays to confirm this anti-tumorigenic activity.

320

321 **1.5. Effects of Neopladine 1 and Neopladine 2 from *Tityus discrepans* scorpion** 322 **venom in breast cancer**

323 As *Tityus serrulatus*, *T. discrepans* belongs to the genus *Tityus*, and is found in
324 countries in the North and Northwest of South America, such as Brazil, Suriname,
325 Venezuela, Guyana and Trinidad and Tobago. Breast cancer is one of the most
326 common type of cancer worldwide. Although it has many therapies available,
327 advanced breast cancer remains with poor alternatives. D'Suze and colleagues (2010)
328 studied the action of *Tityus discrepans* scorpion venom and two purified peptides on
329 human breast cancer cells (SKBR3) and on non-malignant epithelial monkey kidney
330 cell line (MA104). They isolated the peptides Neopladine 1 (Neo1) and Neopladine 2
331 (Neo2), which presented active effects against SKBR3 cells via the activation of Fas
332 signaling by induction of FasL expression [23]. The apoptotic effects were similar to
333 those caused by *B. martensii* Karsch scorpion venom on human glioma and by
334 Bengalin from *H. bengalensis* venom on leukemic cells [17 18]. Neopladines are a new
335 kind of antineoplastic peptides, which are interesting as tools or as templates for novel
336 antineoplastic drugs [23]. Olvera and colleagues have recently cloned the gene coding
337 nNeo2 looking for the best experimental condition to express rNeo2 with high activity
338 [54]. They found a set of eleven isoforms with potential antineoplastic properties, and
339 some of them with a more potent activity when compared to the original peptide. These
340 peptides have been studied to be used for biotechnological and biomedical
341 applications. Given that chlorotoxin succeeds in better removing glioma tumors [55],
342 neopladines should be also further studied to test their function, since they exhibit a
343 significant selectivity for breast cancer cells [23].

344

345 **1.6. RK1, a short peptide from *Buthus occitanus tunetanus* scorpion venom,** 346 **inhibits tumor cell migration, proliferation, and angiogenesis**

347 The *Buthus occitanus tunetanus* scorpion, belonging to the Buthidae family, is
348 responsible for accidents in Middle Eastern countries such as Tunisia. RK1 is a short
349 14 amino acid peptide purified from the *B. o. tunetanus* scorpion venom capable of
350 inhibiting cell proliferation, migration and angiogenesis of U87 glioblastoma cell line
351 and IGR39 human malignant melanoma cell line. RK1 showed to have a potential anti-

352 tumoral activity without manifesting toxicity *in vitro* and *in vivo*, as well as a capacity to
353 form a disulfide bond, increasing stability in physiological conditions, reducing toxic
354 effects of chemotherapy and radiotherapy, although it strongly inhibits
355 neoangiogenesis. In addition, due to RK1 small size, it may possibly be less
356 immunogenic when compared to other larger molecules [26].

357 In another study by the same group, Khamessi and collaborators (2018b)
358 analyzed the anti-tumoral activity of a disintegrin-like homologous peptide RK isolated
359 from the *Buthus occitanus tunetanus* scorpion venom as a targeting molecule for
360 cancer cell adhesion by its potential interaction with different integrins *in vivo* and *in*
361 *silico* [27]. Compared to the RK1 peptide, RK has a sequence identity of 47%, where
362 the conserved residues are localized mainly at the C- and N-terminal ends, including
363 the disulfide bridge forming cysteines. RK has dual disintegrin activity on $\alpha 1\beta 1$ and
364 $\alpha v\beta 3$ integrins, due to the presence of contiguous motifs ECD and KSS. This selective
365 blockade of $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins is a desirable target for cancer therapy and tumor
366 angiogenesis [27].

367

368 **1.7. Effects of scorpion venom on gliomas: apoptosis induction and tumor** 369 **paint BLZ-100**

370 Glial cells are non-neuronal cells that do not produce electrical impulses. Glia
371 surround and support nerve cells, protecting neurons and forming myelin in the
372 peripheral nervous system and glioma is a type of brain cancer that affects glial cells
373 [56]. Malignant gliomas are notoriously resistant to currently available therapies, since
374 they fail to undergo apoptosis upon any anticancer treatment [17].

375 Several early studies have shown that polypeptidyl toxins purified from the
376 venom from *Buthus martensii* Karsch (BmK) scorpion specifically interfere with several
377 ion channels, altering their functional properties [57-61]. Later, Wang and collaborators
378 (2005) showed that BmK venom induces human glioblastoma astrocytoma U251-MG
379 cell death, although it did not induce apoptosis in non-glioma control cells lineages
380 such as the BEL7404 human hepatocellular carcinoma cells and the CHOC400
381 Chinese hamster ovary cells, leading to the conclusion that BmK venom specifically
382 triggers glioma cell death *in vitro*. Moreover, they observed that BmK were able to
383 inhibit glioma tumor growth *in vivo*. Authors showed that Na^+ , K^+ and Cl^- ion channels
384 play a key role in the processes of glioma cell proliferation, swelling, migration,
385 invasion, and apoptosis. The dysfunction of these channels by the BmK venom may

386 be the key for the negative effects on the gliomas, however, more studies are still
387 needed to investigate the key factor that induce glioma apoptosis by the BmK venom
388 [17].

389 Soroceanu and colleagues (1998) have studied a glioma-specific chloride ion
390 channel that is sensitive to chlorotoxin (CTX), which is derived from *Leiurus*
391 *quinquestriatus* scorpion venom [21]. CTX is a 36 amino acid peptide that specifically
392 binds to MMP-2 and small conductance Cl⁻ channels [21 62 63]. The CTX peptide
393 shows a specificity as a tumor-targeting agent in a diversity of forms, including
394 radiolabeled, conjugated to fluorescent tags, or incorporated into nanoparticles [64-
395 66].

396 Many clinical trials demonstrated that CTX toxicity to humans is low, making
397 this peptide attractive as a targeted imaging agent for cancer [22]. The Tumor Paint
398 BLZ-100 has been developed by Blaze Bioscience and is derived from CTX peptide.
399 It has been studied as a new agent to assist in tumor brain surgeries, specifically
400 gliomas. BLZ-100 is a tumor ligand made of synthetic CTX conjugated to ICG. The
401 potential of BLZ-100 as a targeted contrast agent is still being tested on animals and
402 humans. However, many studies have already shown successful results on painting
403 gliomas and even other types of injuries, and it is being evaluated in a phase 2/3
404 clinical study in pediatric CNS tumors [22 67-70].

405 In mouse models studies of glioma, medulloblastoma, prostate cancer,
406 sarcoma, and colorectal cancer, the CTX conjugated to Cy5.5 (a fluorescent molecular
407 beacon that emits photons in the near-IR or NIR spectrum) showed a binding to both
408 primary tumor and metastasis [55]. NIR beacons suit better for intraoperative imaging,
409 since photons of this wavelength are minimally absorbed by water or hemoglobin.
410 Studies on mouse models revealed that BLZ-100 was successfully administered and
411 used as an aid during tumor brain surgery removal [22 67].

412 A clinical study testing the BLZ-100 in canine patients with spontaneously
413 occurring tumors was also successfully and safely applied [68]. In addition, the value
414 of comparative oncology studies in drug development between humans and dogs is
415 well-recognized, since their cancers have features similar to those seen in human
416 tumors [71 72]. Therefore, the agents developed for use in humans are frequently used
417 in the veterinary field, making these comparative oncology studies also beneficial to
418 animals [72].

419 Fidel and collaborators (2015) found that BLZ-100 was safe and effective in
420 detecting tumors using real-time fluorescence imaging during surgery in dogs,
421 providing key information to support clinical translation of the product. Many studies
422 reached a safety profile as a human product candidate, testing BLZ-100 with success
423 in CD-1 mice, Sprague Dawley rats, beagle dogs and other species of dogs, and
424 cynomolgus monkeys [68 69].

425 In a recent study in humans revealed that BLZ-100 also has the potential to
426 “paint” other tissues beyond tumors. Kobets and colleagues (2021) found an
427 unexpected binding of BLZ-100 to cerebral vascular malformations while participating
428 in a phase 2/3 study of intraoperative near infrared fluorescence detection of pediatric
429 primary central nervous system tumors in patients receiving BLZ-100 intravenously
430 [70]. Two patients were diagnosed with intracranial lesions, suspected of being
431 gliomas, although these lesions proved to be cavernous vascular malformations during
432 the surgery. The drug was administered by an IV bolus injection at least 1h and no
433 more than 36 h preoperatively, at a dose of 15 mg/mL. Both patients (a 12 year old
434 boy and a 15 year old girl) were randomized to receive BLZ-100, administered
435 intravenously before surgery. Canvas imaging showed avid fluorescence of their
436 lesion, making the surgical resection easier to perform [70].

437 More recently, Yamada and colleagues (2021) described the use of BLZ-100 in
438 21 adult patients with known or suspected non-metastatic basal cell or squamous cell
439 carcinoma or non-metastatic melanoma to assess its safety, tolerability, and
440 pharmacokinetics. The BLZ-100 showed to be safe at doses up to 18 mg with an
441 effective and accurate imaging at doses between 3 and 12 mg after 15 min to 2 h post
442 injection [73]. Further investigation is still ongoing to determine if BLZ-100 may have
443 a wider range application in identifying pathologies beyond cancer and vascular
444 malformations.

445

446 **2. Conclusions**

447 Cancer is one of the most deadly diseases worldwide, despite the various
448 breakthroughs that have saved many lives, together with standard treatments to
449 cancer, such as tumor removal by surgery, or chemotherapy and radiotherapy. The
450 scientific community has always been on the journey searching for innovative
451 medications to cure or to attenuate symptoms and prolong the lifespan of the patient.

452 The study of natural products, especially venoms from different kinds of species
453 aiming at the treatment of cancer is a relatively new field. In particular, studies involving
454 scorpion venom, which presents several toxins and potential anti-cancer compounds,
455 have been increasing along with the years. One example is the BLZ-100 that is a
456 promising tool that has been developed to help in medical surgeries to remove tumors.
457 We expect that other promising tools or drugs derived from scorpion venom may be
458 developed in the near future since venom from these animals may contain several
459 molecules able to treat cancer.

460

461

462 **Funding**

463 This work was supported by the grants 2013/07467-1, 2016/04000-3, 2017/17943-6, and
464 2019/20832-7 from the São Paulo Research Foundation (FAPESP). SSSA was supported by
465 CNPq # 131408/2019-4 (University of São Paulo, Brazil). ZC was supported in part a grant
466 from the National Cancer Institute (NCI) of National Institutes of Health (NIH) R01CA245673.

467

468

469 **Author contributions**

470 SSSA: Conceptualization, Writing-Original draft, Writing-Review & Editing; KBE: Writing-
471 Original draft, Writing-Review & Editing; WSS: Writing-Review & Editing; FCVP:
472 Conceptualization, Writing-Original draft, Writing-Review & Editing, Supervision, Funding
473 acquisition; ZC: Conceptualization, Writing-Original draft, Writing-Review & Editing,
474 Supervision, Funding acquisition; LKI: Conceptualization, Writing-Original draft, Writing-
475 Review & Editing, Supervision, Funding acquisition

476

477

478 **Declaration of competing interest**

479 The authors have no conflict of interest.

480

481

482 **References**

483

- 484 1. World Health Organization. WHO Cancer. Secondary Cancer 2021.
485 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Last accessed in August
486 2021
- 487 2. Ferlay JE, M.; Lam, F.; Colombet, M; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.;
488 Bray, F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International

- 489 Agency for Research on Cancer. Secondary Global Cancer Observatory: Cancer
 490 Today. Lyon, France: 2020. <https://gco.iarc.fr/today>.
- 491 3. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable
 492 to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*
 493 2020;**8**(2):e180-e90 doi: 10.1016/s2214-109x(19)30488-7 .
- 494 4. Qiu J. Traditional medicine: a culture in the balance. *Nature* 2007;**448**(7150):126-8 doi:
 495 10.1038/448126a .
- 496 5. Posey DA. Topics and issues in ethnoentomology with some suggestions for the
 497 development of hypothesis-generation and testing in ethnobiology. *J. Ethnobiol*
 498 1986;**6**(1):21
- 499 6. Pemberton RW. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine.
 500 *Journal of Ethnopharmacology* 1999;**65**(3):207-16 doi: 10.1016/s0378-
 501 8741(98)00209-8 .
- 502 7. Kakati LN, Ao B, Doulo V. Indigenous Knowledge of Zootherapeutic Use of Vertebrate
 503 Origin by the Ao Tribe of Nagaland. *Journal of Human Ecology* 2017;**19**(3):163-67 doi:
 504 10.1080/09709274.2006.11905874 .
- 505 8. Rubio M. *Rattlesnake: portrait of a predator*. 1st Edition ed. Springfield, VA, USA:
 506 Smithsonian Books, 1998.
- 507 9. da Nóbrega Alves RR, da Silva Vieira WL, Santana GG. Reptiles used in traditional folk
 508 medicine: conservation implications. *Biodiversity and Conservation* 2008;**17**(8):2037-
 509 49 doi: 10.1007/s10531-007-9305-0 .
- 510 10. Ferreira SH. A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops
 511 Jararaca. *Br J Pharmacol Chemother* 1965;**24**:163-9 doi: 10.1111/j.1476-
 512 5381.1965.tb02091.x .
- 513 11. Vidt DG, Bravo EL, Fouad FM. Medical intelligence drug therapy: captopril. *N Engl J Med*
 514 1982;**306**(4):214-9 doi: 10.1056/NEJM198201283060405 .
- 515 12. Phillips DR, Scarborough RM. Clinical Pharmacology of Eptifibatid. *The American Journal*
 516 *of Cardiology* 1997;**80**(4):11B-20B doi: 10.1016/s0002-9149(97)00572-9 .
- 517 13. McIntosh M, Cruz LJ, Hunkapiller MW, Gray WR, Olivera BM. Isolation and structure of a
 518 peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Archives of Biochemistry and*
 519 *Biophysics* 1982;**218**(1):329-34 doi: 10.1016/0003-9861(82)90351-4 .
- 520 14. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of
 521 exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further
 522 evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Journal*
 523 *of Biological Chemistry* 1992;**267**(11):7402-05 doi: 10.1016/s0021-9258(18)42531-8 .
- 524 15. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential
 525 candidates for drug development. *Toxicon* 2015;**93**:125-35 doi:
 526 10.1016/j.toxicon.2014.11.233 .
- 527 16. Petricevich VL. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators Inflamm*
 528 2010;**2010**:903295 doi: 10.1155/2010/903295 .
- 529 17. Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma
 530 tumor growth in vitro. *J Neurooncol* 2005;**73**(1):1-7 doi: 10.1007/s11060-004-4205-6 .
- 531 18. Gupta SD, Gomes A, Debnath A, Saha A, Gomes A. Apoptosis induction in human
 532 leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom:
 533 through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chem Biol*
 534 *Interact* 2010;**183**(2):293-303 doi: 10.1016/j.cbi.2009.11.006 .
- 535 19. Zhang YY, Wu LC, Wang ZP, et al. Anti-proliferation Effect of Polypeptide Extracted from
 536 Scorpion Venom on Human Prostate Cancer Cells in vitro. *J Clin Med Res*
 537 2009;**1**(1):24-31 doi: 10.4021/jocmr2009.01.1220 .
- 538 20. Diaz-Garcia A, Morier-Diaz L, Frion-Herrera Y, et al. In vitro anticancer effect of venom
 539 from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines.
 540 *J Venom Res* 2013;**4**:5-12
- 541 21. Soroceanu LG, Y.; Khazaeli, M.B.; Sontheimer, H. Use of chlorotoxin for targeting of
 542 primary brain tumors. *Cancer Res* 1998;**58**(21):9

- 543 22. Butte PV, Mamelak A, Parrish-Novak J, et al. Near-infrared imaging of brain tumors using
 544 the Tumor Paint BLZ-100 to achieve near-complete resection of brain tumors.
 545 *Neurosurg Focus* 2014;**36**(2):E1 doi: 10.3171/2013.11.FOCUS13497 .
- 546 23. D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans*
 547 scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*
 548 2010;**56**(8):1497-505 doi: 10.1016/j.toxicon.2010.09.008 .
- 549 24. Gao R, Zhang Y, Gopalakrishnakone P. Purification and N-terminal sequence of a serine
 550 proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus*
 551 *martensii* Karsch). *Toxicon* 2008;**52**(2):348-53 doi: 10.1016/j.toxicon.2008.06.003 .
- 552 25. Feng L, Gao R, Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase
 553 from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensii*. *Comp Biochem Physiol C*
 554 *Toxicol Pharmacol* 2008;**148**(3):250-7 doi: 10.1016/j.cbpc.2008.06.003 .
- 555 26. Khamessi O, Ben Mabrouk H, ElFessi-Magouri R, Kharrat R. RK1, the first very short
 556 peptide from *Buthus occitanus tunetanus* inhibits tumor cell migration, proliferation and
 557 angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;**499**(1):1-7 doi:
 558 10.1016/j.bbrc.2018.01.133 .
- 559 27. Khamessi O, Ben Mabrouk H, Othman H, et al. RK, the first scorpion peptide with dual
 560 disintegrin activity on alpha1beta1 and alphavbeta3 integrins. *Int J Biol Macromol*
 561 2018;**120**(Pt B):1777-88 doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.180 .
- 562 28. Magalhães MM, Pereira MES, Amaral CFS, et al. Serum levels of cytokines in patients
 563 envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 1999;**37**(8):1155-64 doi:
 564 10.1016/s0041-0101(98)00251-7 .
- 565 29. Fukuhara YDM, Reis ML, Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQC, Donadi EA. Increased
 566 plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely
 567 envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 2003;**41**(1):49-55 doi:
 568 10.1016/s0041-0101(02)00208-8 .
- 569 30. Zoccal KF, Bitencourt Cda S, Secatto A, et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1,
 570 Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators.
 571 *Toxicon* 2011;**57**(7-8):1101-8 doi: 10.1016/j.toxicon.2011.04.017 .
- 572 31. Zoccal KF, Bitencourt Cda S, Sorgi CA, et al. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom
 573 induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine
 574 production. *Toxicon* 2013;**61**:1-10 doi: 10.1016/j.toxicon.2012.10.002 .
- 575 32. Monica S-F, Orlando R, Nancy S, et al. Mice selected for acute inflammatory response
 576 display a higher lung inflammation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom.
 577 *Frontiers in Immunology* 2013;**4** doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.01051 .
- 578 33. Fialho EM, Maciel MC, Silva AC, et al. Immune cells recruitment and activation by *Tityus*
 579 *serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 2011;**58**(6-7):480-5 doi:
 580 10.1016/j.toxicon.2011.08.006 .
- 581 34. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, et al. Human prostate cancer precursors and
 582 pathobiology. *Urology* 2003;**62**(5 Suppl 1):55-62 doi: 10.1016/j.urology.2003.09.053 .
- 583 35. Nelson WG, De Marzo AM, Deweese TL, et al. Preneoplastic prostate lesions: an
 584 opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**952**:135-44 doi:
 585 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02734.x .
- 586 36. Bostwick DG, Qian J. Effect of androgen deprivation therapy on prostatic intraepithelial
 587 neoplasia. *Urology* 2001;**58**(2):91-93 doi: 10.1016/s0090-4295(01)01248-1 .
- 588 37. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat*
 589 *Rev Cancer* 2001;**1**(1):34-45 doi: 10.1038/35094009 .
- 590 38. Zhang WDC, Y. Z.; Yao, C. F.; Jia, Q.; Song, S. Q.; Wang, Z. X.; Dong, Q. Polypeptide
 591 extract from scorpion venom inhibits angiogenesis and angiogenesis-dependent tumor
 592 growth. *Chin. Pharmacol. Bull.* 2005;**21**(6):4
- 593 39. Marak BN, Dowarah J, Khiangte L, Singh VP. A comprehensive insight on the recent
 594 development of Cyclic Dependent Kinase inhibitors as anticancer agents. *Eur J Med*
 595 *Chem* 2020;**203**:112571 doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112571 .

- 596 40. Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjanen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM. High levels of
597 stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer*
598 *Res* 2000;**60**(1):150-5
- 599 41. Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan:
600 fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med* 1997;**242**(1):41-8 doi:
601 10.1046/j.1365-2796.1997.00172.x .
- 602 42. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the
603 malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;**71**:241-319 doi: 10.1016/s0065-
604 230x(08)60101-3 .
- 605 43. Shao JH, Cui Y, Zhao MY, Wu CF, Liu YF, Zhang JH. Purification, characterization, and
606 bioactivity of a new analgesic-antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus*
607 *martensii* Karsch. *Peptides* 2014;**53**:89-96 doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.023 .
- 608 44. Catterall WA. Binding of scorpion toxin to receptor sites associated with sodium channels
609 in frog muscle. Correlation of voltage-dependent binding with activation. *J Gen Physiol*
610 1979;**74**(3):375-91 doi: 10.1085/jgp.74.3.375 .
- 611 45. Zhao Y, Cai X, Ye T, et al. Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration
612 of SHG-44 human malignant glioma cells. *J Cell Biochem* 2011;**112**(9):2424-34 doi:
613 10.1002/jcb.23166 .
- 614 46. Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys*
615 *Res Commun* 2018;**500**(1):26-34 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.190 .
- 616 47. Yglesias AS, H.; Diaz Garcia, A.; Garrudi, G. Synergistic effect of *Rhopalurus junceus*
617 scorpion venom combined with conventional cytostatics in cervical cancer cell line
618 HeLa. *J. Pharm Pharmacogn* 2019;**7**(1):10
- 619 48. Sasi N, Hwang M, Jaboin J, Csiki I, Lu B. Regulated cell death pathways: new twists in
620 modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther* 2009;**8**(6):1421-9 doi:
621 10.1158/1535-7163.MCT-08-0895 .
- 622 49. Poliseno L, Bianchi L, Citti L, et al. Bcl2-low-expressing MCF7 cells undergo necrosis
623 rather than apoptosis upon staurosporine treatment. *Biochem J* 2004;**379**(Pt 3):823-
624 32 doi: 10.1042/BJ20031538 .
- 625 50. Diaz-Garcia A, Ruiz-Fuentes JL, Rodriguez-Sanchez H, Fraga Castro JA. *Rhopalurus*
626 *junceus* scorpion venom induces apoptosis in the triple negative human breast cancer
627 cell line MDA-MB-231. *J Venom Res* 2017;**8**:9-13
- 628 51. Diaz-Garcia A, Pimentel Gonzalez G, Basaco Bernabeu T, et al. Pharmacokinetics and
629 Biodistribution of *Rhopalurus junceus* Scorpion Venom in Tumor-Bearing Mice after
630 Intravenous and Oral Administration. *Iran Biomed J* 2019;**23**(4):287-96
- 631 52. Das Gupta S, Debnath A, Saha A, et al. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis*
632 Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human
633 leukemic cell lines U937 and K562. *Leuk Res* 2007;**31**(6):817-25 doi:
634 10.1016/j.leukres.2006.06.004 .
- 635 53. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy.
636 *Cell Biol Int* 2019;**43**(6):582-92 doi: 10.1002/cbin.11137 .
- 637 54. Olvera F, Rosales A, Olvera A, et al. An efficient approach to clone and express active
638 Neopladine 2, an anticancer peptide from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Process*
639 *Biochemistry* 2016;**51**(5):624-31 doi: 10.1016/j.procbio.2016.02.013 .
- 640 55. Veisesh M, Gabikian P, Bahrami SB, et al. Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate
641 for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res* 2007;**67**(14):6882-8 doi:
642 10.1158/0008-5472.CAN-06-3948 .
- 643 56. Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma. *Nat Rev Dis Primers* 2015;**1**:15017 doi:
644 10.1038/nrdp.2015.17 .
- 645 57. Li YJ, Ji YH. Binding characteristics of BmK I, an alpha-like scorpion neurotoxic
646 polypeptide, on cockroach nerve cord synaptosomes. *J Pept Res* 2000;**56**(4):195-200
647 doi: 10.1034/j.1399-3011.2000.00750.x .
- 648 58. Li Y-J, Liu Y, Ji Y-H. BmK AS: New scorpion neurotoxin binds to distinct receptor sites of
649 mammal and insect voltage-gated sodium channels. *Journal of Neuroscience*

- 650 Research 2000;**61**(5):541-48 doi: 10.1002/1097-4547(20000901)61:5<541::Aid-
 651 jnr9>3.0.Co;2-# .
- 652 59. Tong Q-C, Zhang Y, Li D-P, Zhou Z-N, Ji Y-H. The blocking effect of BmP02, one novel
 653 short-chain scorpion peptide on transient outward K⁺ channel of adult rat ventricular
 654 myocyte. *Regulatory Peptides* 2000;**90**(1-3):85-92 doi: 10.1016/s0167-
 655 0115(00)00116-6 .
- 656 60. Tan Z-Y, Xiao H, Mao X, Wang C-Y, Zhao Z-Q, Ji Y-H. The inhibitory effects of BmK IT2,
 657 a scorpion neurotoxin on rat nociceptive flexion reflex and a possible mechanism for
 658 modulating voltage-gated Na⁺ channels. *Neuropharmacology* 2001;**40**(3):352-57 doi:
 659 10.1016/s0028-3908(00)00168-4 .
- 660 61. Ji Y-H, Wang W-X, Wang Q, Huang Y-P. The binding of BmK abT, a unique neurotoxin,
 661 to mammal brain and insect Na⁺ channels using biosensor. *European Journal of*
 662 *Pharmacology* 2002;**454**(1):25-30 doi: 10.1016/s0014-2999(02)02363-4 .
- 663 62. El-Ghlban S, Kasai T, Shigehiro T, et al. Chlorotoxin-Fc fusion inhibits release of MMP-2
 664 from pancreatic cancer cells. *Biomed Res Int* 2014;**2014**:152659 doi:
 665 10.1155/2014/152659 .
- 666 63. Cohen G, Burks SR, Frank JA. Chlorotoxin-A Multimodal Imaging Platform for Targeting
 667 Glioma Tumors. *Toxins (Basel)* 2018;**10**(12) doi: 10.3390/toxins10120496 .
- 668 64. Mamelak AN, Jacoby DB. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other
 669 malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). *Expert Opin Drug Deliv*
 670 2007;**4**(2):175-86 doi: 10.1517/17425247.4.2.175 .
- 671 65. Sun C, Fang C, Stephen Z, et al. Tumor-targeted drug delivery and MRI contrast
 672 enhancement by chlorotoxin-conjugated iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine*
 673 (Lond) 2008;**3**(4):495-505 doi: 10.2217/17435889.3.4.495 .
- 674 66. Stroud MR, Hansen SJ, Olson JM. In vivo bio-imaging using chlorotoxin-based conjugates.
 675 *Curr Pharm Des* 2011;**17**(38):4362-71 doi: 10.2174/138161211798999375 .
- 676 67. Kittle DS, Mamelak MDA, Parrish-Novak JE, et al. Fluorescence-guided Tumor
 677 Visualization Using the Tumor Paint BLZ-100. *Cureus* 2014 doi: 10.7759/cureus.210 .
- 678 68. Fidel J, Kennedy KC, Dernell WS, et al. Preclinical Validation of the Utility of BLZ-100 in
 679 Providing Fluorescence Contrast for Imaging Spontaneous Solid Tumors. *Cancer Res*
 680 2015;**75**(20):4283-91 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0471 .
- 681 69. Parrish-Novak J, Byrnes-Blake K, Lalayeva N, et al. Nonclinical Profile of BLZ-100, a
 682 Tumor-Targeting Fluorescent Imaging Agent. *Int J Toxicol* 2017;**36**(2):104-12 doi:
 683 10.1177/1091581817697685 .
- 684 70. Kobets AJ, Nauen D, Lee A, Cohen AR. Unexpected Binding of Tozuleristide "Tumor
 685 Paint" to Cerebral Vascular Malformations: A Potentially Novel Application of
 686 Fluorescence-Guided Surgery. *Neurosurgery* 2021;**89**(2):204-11 doi:
 687 10.1093/neuros/nyab106 .
- 688 71. Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, Khanna C. The Comparative Oncology Trials Consortium:
 689 using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development
 690 pathway. *PLoS Med* 2009;**6**(10):e1000161 doi: 10.1371/journal.pmed.1000161 .
- 691 72. Paoloni MC, Khanna C. Comparative oncology today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*
 692 2007;**37**(6):1023-32 doi: 10.1016/j.cvsm.2007.08.003 .
- 693 73 Yamada, M. Yamada M, Miller DM, Lowe M, Rowe C, Wood D, Soyer HP, Byrnes-Blake
 694 K, Parrish-Novak J, Ishak L, Olson JM, Brandt G, Griffin P, Spelman L, Prow TW.
 695 (2021) A first-in-human study of BLZ-100 (tozuleristide) demonstrates tolerability and
 696 safety in skin cancer patients. *Contemp Clin Trials Commun.* 2021 Aug 4;**23**:100830,
 697 1-6. doi: 10.1016/j.conctc.2021.100830.

Apêndice B - MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO CIENTÍFICO



Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with cardiac tissue damage in mouse hearts

W.S. Santos^a, Fabio Montoni^a, R.A.S. Eichler^b, Stephanie Santos Suehiro Arcos^a, Diana Zukas Andreotti^b, Carolina Yukiko Kisaki^c, Kimberly Borges Evangelista^a, Hamida Macêdo Calacina^a, Ismael Feitosa Lima^a, Magna Aparecida Maltauro Soares^c, Eric Conrad Kyle Gren^d, Valdemir Melechco Carvalho^c, Emer Suavinho Ferro^b, Milton Yutaka Nishiyama-Jr^e, Zhibin Chen^f, Leo Kei Iwai^{g,*}

^a Laboratory of Applied Technology (LETA) and Center of Toxic, Immune-Response and Cell Signaling (CITICS), Instituto Butantan, São Paulo 05500-000, Brazil

^b Department of Pharmacology, Biomedical Sciences Institute (ICB), University of São Paulo (USP), São Paulo 05508-000, Brazil

^c Laboratory of Psychophysiology, Instituto Butantan, São Paulo 05585-900, SP, Brazil

^d Dracost College, University of Missouri, Warrenton, MO 97146, USA

^e Grupo Hery, São Paulo 04355-000, SP, Brazil

^f Department of Microbiology and Immunology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA

ARTICLE INFO

Keywords

Crotalus durissus terrificus
Snake venom
Mass spectrometry-based proteomics
Mouse heart
Cardiotoxicity
Envenomation

ABSTRACT

Snake envenomation is a common but neglected disease that affects millions of people around the world annually. Among venomous snake species in Brazil, the tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) accounts for the highest number of fatal envenomations and is responsible for the second highest number of bites. Snake venoms are complex mixtures which, upon injection, trigger diverse physiological effects that can cause significant injury or death. The components of *C. d. terrificus* venom exhibit neurotoxic, myotoxic, hemotoxic, nephrotoxic, and cardiotoxic properties which present clinically as alteration of central nervous system function, motor paralysis, seizures, eyelid ptosis, ophthalmoplegia, blurred vision, coagulation disorders, rhabdomyolysis, myoglobinuria, and cardiorespiratory arrest. In this study, we focused on proteomic characterization of the cardiotoxic effects of *C. d. terrificus* venom in mouse models. We injected venom at half the lethal dose (LD50) into the gastrocnemius muscle. Mouse hearts were removed at set time points after venom injection (1 h, 6 h, 12 h, or 24 h) and subjected to trypsin digestion prior to high-resolution mass spectrometry. We analyzed the proteomic profiles of >1300 peptides and observed that several peptides showed noteworthy changes in their quantitative profiles, likely reflecting the toxic activity of venom components. Among the affected proteins were several associated with cellular deregulation and tissue damage. Changes in heart protein abundance offer insights into how they may work synergistically upon envenomation.

Significance: Venom of the tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) is known to be neurotoxic, myotoxic, nephrotoxic and cardiotoxic. Although there are several studies describing the biochemical effects of this venom, no work has yet described its proteomic effects in the cardiac tissue of mice. In this work, we describe the changes in several mouse cardiac proteins upon venom treatment. Our data shed new light on the clinical outcome of the envenomation by *C. d. terrificus*, as well as candidate proteins that could be investigated in efforts to improve current treatment approaches or in the development of novel therapeutic interventions in order to reduce mortality and morbidity resulting from envenomation.

1. Introduction

Snakebite is a serious but understudied global health concern,

classified by the World Health Organization as a neglected tropical disease. The impacts on public health are especially pronounced in developing countries. About 2.7 million snake envenomations occur

* Corresponding author at: Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP 05500-900, Brazil.
E-mail address: leo.iwai@butantan.gov.br (L.K. Iwai).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104530>

Received 16 August 2021; Received in revised form 10 January 2022; Accepted 13 February 2022

Available online 17 February 2022

1874-3919/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.