



Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

IZABELE SANUTO AGUIAR

**Análise do potencial citotóxico de fosfolipases A_2 de *Bothrops jararaca*
para tratamento de tumores de cabeça e pescoço**

Nova Iguaçu
2025

IZABELE SANUTO AGUIAR

**Análise do potencial citotóxico de fosfolipases A₂ de *Bothrops jararaca*
para tratamento de tumores de cabeça e pescoço**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como
requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina

Orientador:

Dr. Matias Eliseo Melendez

Co-orientador:

Me. Lucas Bravo Perina

Nova Iguaçu

2025

IZABELE SANUTO AGUIAR

Análise do potencial citotóxico de fosfolipases A₂ de *Bothrops jararaca* para tratamento de tumores de cabeça e pescoço

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como
requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez

Co-orientador: Me. Lucas Bravo Perina

Aprovada em:

Nova Iguaçu, 10 de dezembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Daniella Cerqueira da Silva.

Prof.

Prof.

AGRADECIMENTOS

Um ciclo se encerra, estou muito feliz pela conclusão da minha tão sonhada graduação. Me tornar biomédica sempre foi um sonho pessoal, trabalhar com pesquisa tem me tornado uma grande mulher, decidida e dedicada em seu trabalho.

Primeiramente, quero externar minha gratidão à Deus por ter me sustentado até aqui, pela graça e direção em cada etapa desta jornada.

À minha rede de apoio, minha família, por sempre estar presente em minha vida, não permitindo eu desistir no meio do caminho. Agradeço o amor e apoio incondicional, especialmente nos dias mais difíceis.

Ao orientador Dr. Matias Eliseo Melendez por me permitir fazer parte do projeto, por todos os *insights* que me ajudaram ao longo do trabalho e pela paciência em me ensinar as metodologias aplicadas. Gracias mestre!

Ao co-orientador Me. Lucas Bravo Perina por ter me auxiliado em cada experimento a ser realizado, por todos os conselhos, dicas científicas ao longo deste percurso e pelo papel essencial em minha formação acadêmica e pessoal. Obrigada amigo!

À banca avaliadora pela disponibilidade e atenção dedicada à análise deste trabalho.

Aos amigos de graduação e de laboratório, pela parceria, conversas, risadas e pela presença constante que tornou esta trajetória mais leve. Vocês são minha fonte de alegrias!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a construção deste trabalho, meu sincero agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bothrops Jararaca	8
Figura 2. Regiões anatômicas afetadas pelo câncer de cabeça e pescoço	10
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.	11
Figura 4. Estrutura do plasmídeo pCI.Neo_EGFP.	16
Figura 5. Estrutura do plasmídeo pCI.Neo_PLA ₂ _1.	17
Figura 6. Estrutura do plasmídeo pCI.Neo_PLA ₂ _2.	18
Figura 7. Esquema simplificado da metodologia aplicada.....	21
Figura 8 Esquema simplificado da transfecção reversa em garrafas de cultura T25 cm ² e análises posteriores de viabilidade celular e western blotting.....	22
Figura 9. Análise de restrição enzimática. L: marcador molecular, 1 kb Plus DNA; 1 ao 5: pCI.Neo_PLA ₂ _1; 6 ao 10: pCI.Neo_PLA ₂ _2; 11 ao 15: vetor controle pCI.Neo_EGFP. Utilizou-se a enzima de restrição PvuII. Gel de agarose a 1% (a). Simulação de digestão <i>in silico</i> gerada utilizando o software VectorBee v2.7.0. (b).	26
Figura 10. Imagens de microscopia de fluorescência dos plasmídeos pCI.Neo_EGFP, pCI.Neo_PLA ₂ _1, pCI.Neo_PLA ₂ _2 e NTC (non-transfected-control).....	27
Imagens obtidas com o microscópio EVOS™ M5000. Amplificação de 10 e 20x	27
Figura 11. <i>Western Blotting</i> das fosfolipases A ₂ recombinantes.....	28
Figura 12. Viabilidade celular após tratamento com meios condicionados em linhagens de tumor de cabeça e pescoço e em uma linhagem de queratinócitos.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições da digestão enzimática com PvuII para os plasmídeos pCI.Neo_PLA ₂ _1, pCI.Neo_PLA ₂ _2 e pCI.Neo_EGFP.....	20
Tabela 2. Anticorpos utilizados para detecção de proteínas por <i>Western Blotting</i>	23
Tabela 3. Linhagens celulares utilizadas ao longo dos estudos	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	GLÂNDULAS VENENÍFERAS E SEUS COMPONENTES.....	8
1.2	TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO	9
1.2.1	Epidemiologia e fatores de riscos	10
1.2.2	Tratamento e alternativas terapêuticas	12
1.3	LINHAGENS CELULARES	12
2	JUSTIFICATIVA	13
3	OBJETIVO.....	13
3.1	OBJETIVO GERAL	14
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4	MATÉRIAS E METÓDOS	15
4.1	PLASMÍDEOS.....	15
4.2	TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO EM BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES	18
4.3	PRÉ-INÓCULO	19
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	19
4.5	DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	19
4.6	ELETOFORESE EM GEL DE AGAROSE	20
4.7	TRANSFEÇÃO REVERSA DOS PLASMÍDEOS PCI.NEO_EGFP, PCI.NEO_PLA ₂ _1 E PCI.NEO_PLA ₂ _2.....	21
4.8	<i>WESTERN BLOTTING</i> PARA VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES A ₂ PÓS-TRANSFEÇÃO	22
4.9	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO.....	24
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	24
5	RESULTADOS	25
5.1	ANÁLISE DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA.....	25
5.2	VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES A ₂ PÓS-TRANSFEÇÃO	26
5.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO TRATADAS COM AS FOSFOLIPASES A ₂	28
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÃO.....	31

RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço representa um importante problema de saúde pública, o que torna necessária a busca por novas alternativas terapêuticas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico de fosfolipases A₂ de *Bothrops jararaca* em linhagens tumorais de cabeça e pescoço. Como metodologia, as fosfolipases A₂ foram expressas em células Vero por meio de transfecção mediada por lipossomos, com validação da expressão por microscopia de fluorescência e *western blotting*. O meio condicionado foi utilizado para tratamento das linhagens tumorais e da linhagem pseudonormal HaCaT, e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTS.

Os resultados demonstraram redução significativa da viabilidade celular apenas na linhagem tumoral UD-SCC-2 após tratamento com a fosfolipase A₂₂, enquanto as demais linhagens não apresentaram alterações relevantes. Na discussão, os dados indicam que a ação citotóxica das fosfolipases A₂ é dependente do tipo celular, refletindo a heterogeneidade dos tumores de cabeça e pescoço, e que estudos adicionais são necessários para melhor compreensão de seus mecanismos de ação e potencial terapêutico.

Palavras-chaves: Câncer de Cabeça e Pescoço; *Bothrops jararaca* e fosfolipases A₂.

ABSTRACT

Head and neck cancer represents a significant public health problem, highlighting the need for new therapeutic alternatives. This study aimed to evaluate the cytotoxic potential of phospholipases A₂ from *Bothrops jararaca* in head and neck tumor cell lines. As methodology, phospholipases A₂ were expressed in Vero cells through plasmid transfection, with expression validated by fluorescence microscopy and western blotting. Conditioned medium was used to treat tumor cell lines and the pseudonormal HaCaT cell line, and cell viability was assessed by the MTS assay.

The results demonstrated a significant reduction in cell viability only in the UD-SCC-2 tumor cell line after treatment with phospholipase A₂_2, while no relevant effects were observed in the other tumor cell lines. In the discussion, the data indicate that the cytotoxic activity of phospholipases A₂ is cell type-dependent, reflecting the heterogeneity of head and neck cancers, and that further studies are required to better understand their mechanisms of action and therapeutic potential.

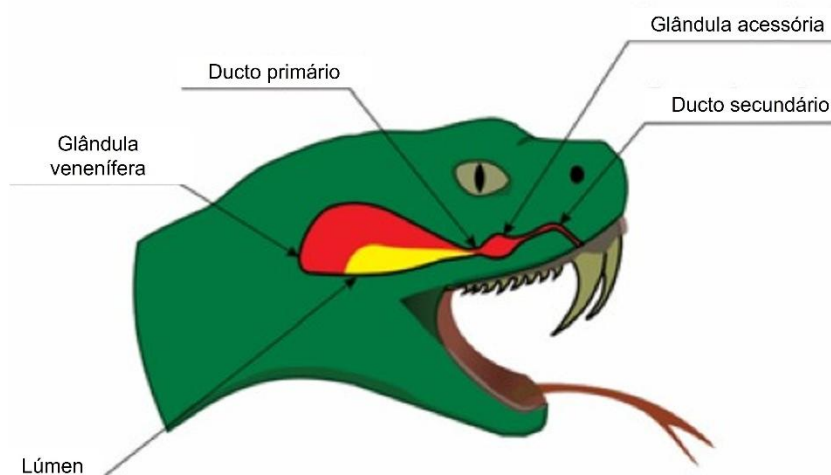
Keywords: Head and Neck Cancer; *Bothrops jararaca*; Phospholipases A₂.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glândulas Veneníferas e seus componentes

As glândulas veneníferas da espécie *Bothrops jararaca* (**Figura 1**) são modificações das glândulas salivares e possuem uma estrutura lobular que armazena o veneno. Esse veneno é uma mistura de enzimas, toxinas e proteínas, com componentes como proteases, fosfolipases e metaloproteinases (Sousa et al., 2013; Wittcoff, 1951).

Figura 1. *Bothrops Jararaca*



Fonte: Adaptada de Pucca et al., 2020.

No veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*), esses componentes desempenham papéis cruciais na imobilização e digestão da presa, além de causar os efeitos tóxicos observados em vítimas de picadas. As proteases do veneno da jararaca, como as serinoproteinases de veneno de serpente (SVSPs – *Snake Venom Serine Proteinases*) são responsáveis por degradar proteínas dos tecidos da presa, causando necrose (morte celular), facilitando a digestão e destruição dos tecidos, além de causar inflamação local e hemorragia através de mecanismos que afetam o sistema hemostático e, consequentemente, a cascata de coagulação da presa (Serrano; Maroun, 2005).

As metaloproteinases, comumente denominadas metaloproteinases de veneno de serpente (SVMPs - *Snake Venom Metalloproteinases*) degradam componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibrina afetando os capilares sanguíneos e tecidos. Esse processo contribui para a formação de edemas. Além disso, as SVMPs inibem a agregação plaquetária, agravando os distúrbios hemorrágicos observados em vítimas de picadas (Gutiérrez; Rucavado, 2000).

Em destaque, as Fosfolipases (PLAs) são enzimas encontradas em diversos organismos, tais como peçonha de artrópodes, serpentes e até mamíferos (Denegri et al., 2010; Murakami, 2023), atuando nas membranas celulares, clivando os fosfolipídios em lisofosfolipídios e ácidos graxos. Além disso, a transdução de sinais, proliferação de sinais, manutenção dos fosfolipídios celulares e envolvimento em processos inflamatórios são uma das diversas funções celulares que as PLAs realizam (De Freitas Oliveira et al., 2009; Dennis et al., 1991).

Um exemplo de fosfolipases (PLAs) encontradas no veneno da jararaca, pode-se citar a fosfolipase A₂ (PLA₂), a mais abundante e importante. Ela possui os efeitos citados anteriormente, consequentemente, ela induz a liberação de mediadores inflamatórios, promove a lise celular e ruptura da membrana (Dennis, 1983).

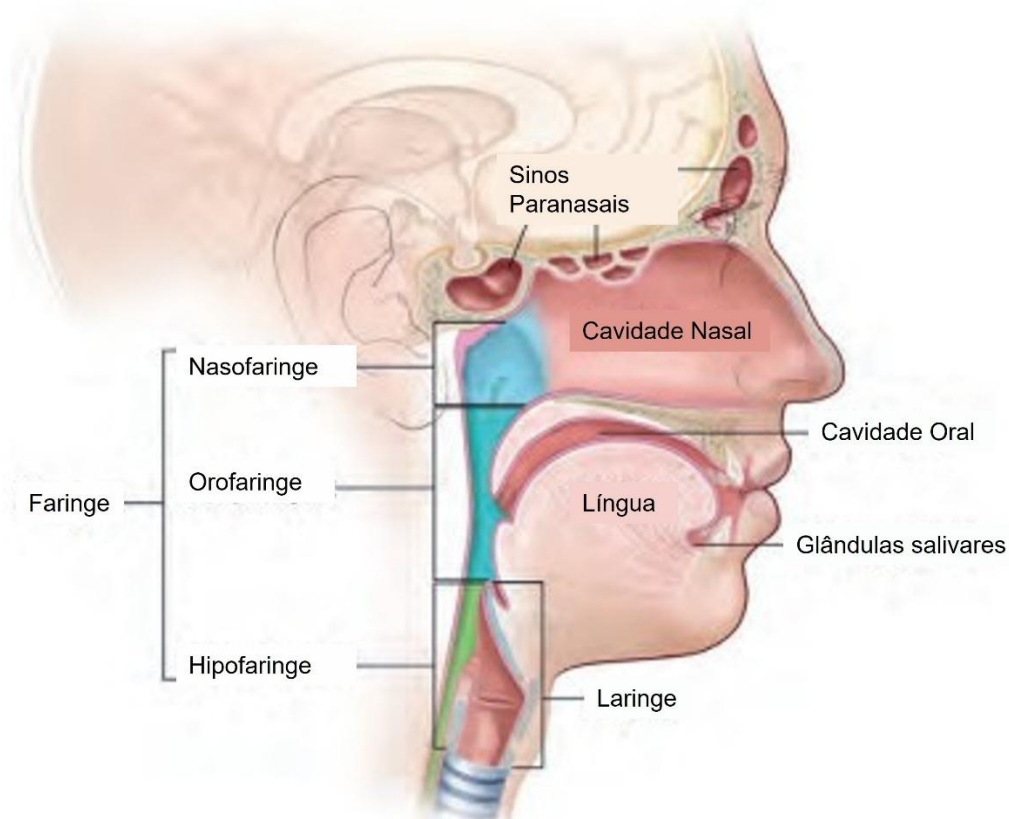
A exploração de recursos biológicos com potencial terapêutico são um dos meios para o desenvolvimento de novos tratamentos antitumorais que apresente menos toxicidade e efeitos adversos em comparação com os disponíveis atualmente.

Trabalhos com peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* tem demonstrado proteínas com atividade antitumoral (Camila Marques et al., 2025)

1.2 Tumores de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço representa tumores malignos originados a partir de células epidermóides que afetam a região nasal, faringe, cavidade oral, sinus paranasais e laringe, representados na **Figura 2** (Argiris et al., 2008; Kang; Kiess; Chung, 2015).

Figura 2. Regiões anatômicas afetadas pelo câncer de cabeça e pescoço



Fonte: Adaptada de *World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention*; 2020.

1.2.1 Epidemiologia e fatores de riscos


Os tumores de cabeça e pescoço afetam cerca de 660 mil pessoas por ano, o que torna a sexta neoplasia mais frequente, além de ter registrado 325 mil casos de óbito anualmente no mundo todo por esse tipo de câncer (Gormley et al., 2022).

Uma estimativa feita pelo Instituto Nacional do Câncer constatou que para o triênio de 2023 a 2025 cerca de 704 mil novos casos de câncer aparecerão em cada ano estimado. Excluídos o de câncer de pele não melanoma, 483 mil casos foram estimados. Desta estimativa, os tumores que afetam a cavidade oral e a laringe, ambos entre os 10 tipos de câncer mais incidentes em homens no Brasil, apresentaram, juntos, uma estimativa para o ano de 2023, de 17.470 novos casos para 2023, sendo 10.900 de cavidade oral e 6.570 de laringe em homens. Vale

ênfatizar que ainda não há dados disponíveis pelo relatório de estimativa do Instituto Nacional do Câncer para o triênio de 2026 a 2028.

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Adaptada de estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil, INCA.

Ademais, na epidemiologia dos tumores de cabeça e pescoço observa-se uma incidência variável de acordo com a distribuição geográfica brasileira, com região sudeste em primeiro lugar (11.650 números de casos anuais) comparada com as demais regiões do Brasil de acordo com o Instituto Nacional do Câncer.

Há uma relação bem definida com diversos fatores de risco conhecidos e o câncer de cabeça e pescoço. Do ponto de vista químico, o tabagismo segue como o principal agente etiológico, estando ligado a cerca de 75% dos diagnósticos em certos grupos populacionais do ocidente (Tuyns et al., 1988).

O consumo de bebidas alcoólicas, por sua vez, está envolvido em cerca de 4% das ocorrências de forma independente; no entanto, sua combinação com o hábito de fumar potencializa o risco de forma sinérgica, podendo elevá-lo em até 40 vezes para o desenvolvimento desses tumores (Rumgay et al., 2021).

Vale destacar que o álcool pode atuar como um dos fatores carcinógenos através de diferentes mecanismos. Uma das principais formas é por sua oxidação em acetaldeído, substância tóxica para o organismo. O acetaldeído causa danos diretos ao DNA das células e, conseqüentemente, o risco de mutações que podem levar ao câncer aumenta (Edenberg, 2007; Niemelä, 2006).

Em suma, o consumo de álcool e cigarro eleva exponencialmente o risco de câncer, em destaque, o câncer de cabeça e pescoço. A sinergia entre esses dois fatores facilita o desenvolvimento dessas neoplasias.

1.2.2 Tratamento e alternativas terapêuticas

Para pacientes acometidos com tal doença, o tratamento padrão e multidisciplinar inclui cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Em geral, estes tratamentos convencionais, em pacientes dependendo do estágio e localização do tumor, apresentam sobrevida média que varia de 35% a 70% em 5 anos (Hoesseini et al., 2024). Entretanto, em contrapartida, eles não garantem qualidade de vida dos pacientes devido aos efeitos adversos (Brook, 2020; Mordzińska-Rak et al., 2025; Verro et al., 2025).

Nesse sentido, faz-se necessário novas pesquisas e metodologias para inibir o progresso do tumor, assim como o desenvolvimento de novos fármacos com mais eficácia. A exploração de recursos biológicos com potencial terapêutico constitui uma alternativa para o desenvolvimento de novos tratamentos antitumorais que apresentem menos toxicidade e efeitos adversos em comparação com os disponíveis atualmente.

Assim, a utilização de toxinas oriundas de animais peçonhentos tem sido comumente utilizada, visto que, tem apresentado melhora terapêutica em determinadas doenças como, por exemplo, na hipertensão arterial e insuficiência cardíaca. Um exemplo de fármaco é o captopril, um medicamento anti-hipertensivo criado com base em um peptídeo extraído da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) na década de 1980 (Breno; Picarelli, 1992; Campolina Rebello Horta et al., 2016).

1.3 Linhagens celulares

O uso de linhagens celulares constitui uma ferramenta fundamental para os pesquisadores, pois servem como modelos experimentais *in vitro* para estudos como metabolismo, senescência, resposta a fármaco, citotoxicidade, entre outros.

Essas linhagens consistem em populações celulares capazes de se proliferar continuamente em condições laboratoriais, mantendo características morfológicas, genéticas e funcionais relativamente estáveis ao longo das passagens, o que possibilita a obtenção de resultados reprodutíveis e comparáveis entre diferentes estudos.

No âmbito da pesquisa oncológica, as linhagens tumorais humanas desempenham papel central na avaliação inicial do potencial citotóxico e antiproliferativo de novas moléculas. Elas possibilitam a investigação de respostas celulares a agentes terapêuticos, bem como a análise de diferenças de sensibilidade entre subtipos tumorais, refletindo, ainda que de forma simplificada, a heterogeneidade observada nos tumores in vivo. Dessa forma, o uso dessas linhagens constitui uma etapa essencial no desenvolvimento pré-clínico de candidatos a fármacos antineoplásicos, por exemplo.

2 JUSTIFICATIVA

Os tumores de cabeça e pescoço representam a sexta neoplasia mais frequente no mundo, logo, é de extrema importância a descoberta de novas drogas menos nocivas e com eficácia maior para pacientes acometidas pela doença (Campana; Goiato, 2013)

Animais peçonhentos podem ser excelentes reservatórios naturais de moléculas com ação terapêutica. Trabalhos com peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* tem demonstrado proteínas com atividade antitumoral (Camila Marques et al., 2025)

Nesse trabalho, o objetivo é avaliar duas fosfolipases A₂, clonadas em vetores de expressão, em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço, testando a atividade antitumoral por viabilidade celular.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo do presente trabalho será avaliar o potencial citotóxico de fosfolipases A₂ de *Bothrops jararaca* em linhagens tumorais de cabeça e pescoço.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

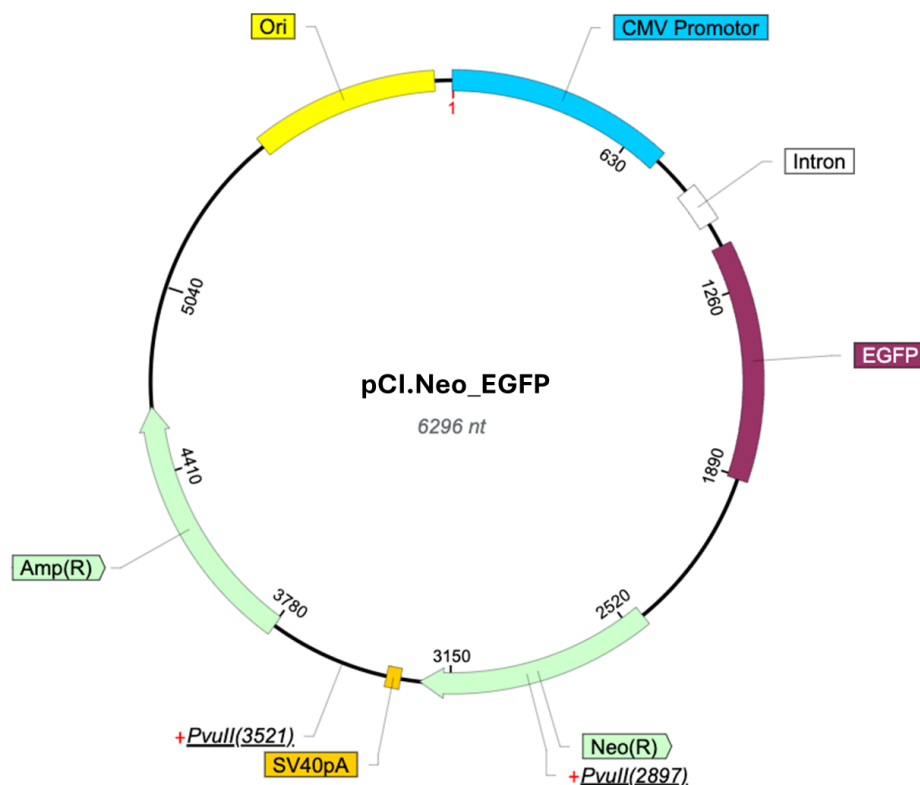
- Avaliar a integridade dos plasmídeos em bactérias quimiocompetentes por choque térmico;
- Transfectar os plasmídeos em linhagem celular Vero;
- Avaliar a viabilidade celular das linhagens tumorais de cabeça e pescoço por MTS.

4 MATÉRIAS E METÓDOS

4.1 Plasmídeos

O plasmídeo pCI.Neo_EGFP (**Figura 4**) é um vetor desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa. Nele foi inserido sequências que codificam a proteína EGFP, com emissão de fluorescência na cor verde quando expressado em linhagens celulares. Esse plasmídeo possui um ponto de origem da replicação bacteriana (*ori*), além de um promotor CMV derivado de citomegalovírus que inicia o processo de transcrição e garante a expressão de alto nível do gene de interesse, *intron* que aumenta a expressão da proteína recombinante por agir como potenciador da expressão gênica através de sequências que facilitam o *splicing*, sinal de poliadenilação SV40pA que promove processamento adequado do RNA mensageiro e estabilidade transcricional, e genes de resistência aos antibióticos ampicilina e neomicina que confere à bactéria a capacidade de sobreviver e proliferar em meio contendo esses antibióticos. Seu tamanho é de 6296 pares de base (bp).

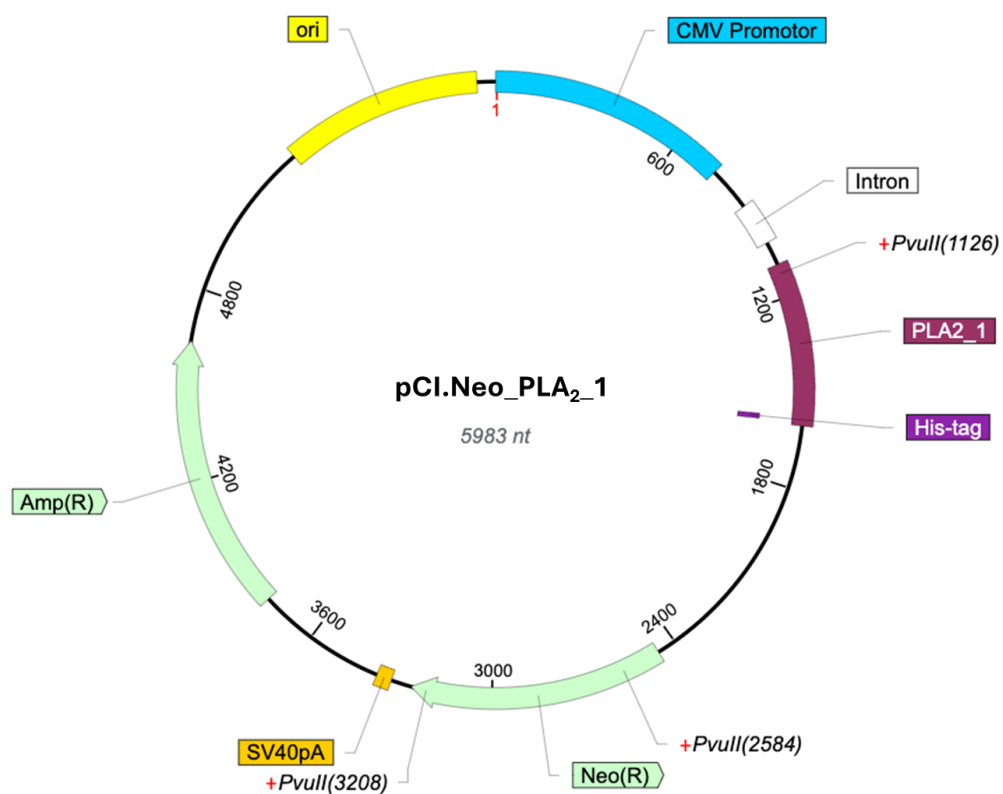
Figura 4. Estrutura do plasmídeo pCI.Neo_EGFP.



Legenda: Ori: origem de replicação bacteriana; CMV: promotor de expressão; *Intron*; EGFP: *Enhanced green fluorescent protein*; Neo(R): resistência a neomicina; SV40pA: sinal de poliadenilação do vírus SV40 e Amp(R): resistência a ampicilina. Fonte: Imagem gerada pelo software VectorBee 2.7.0.

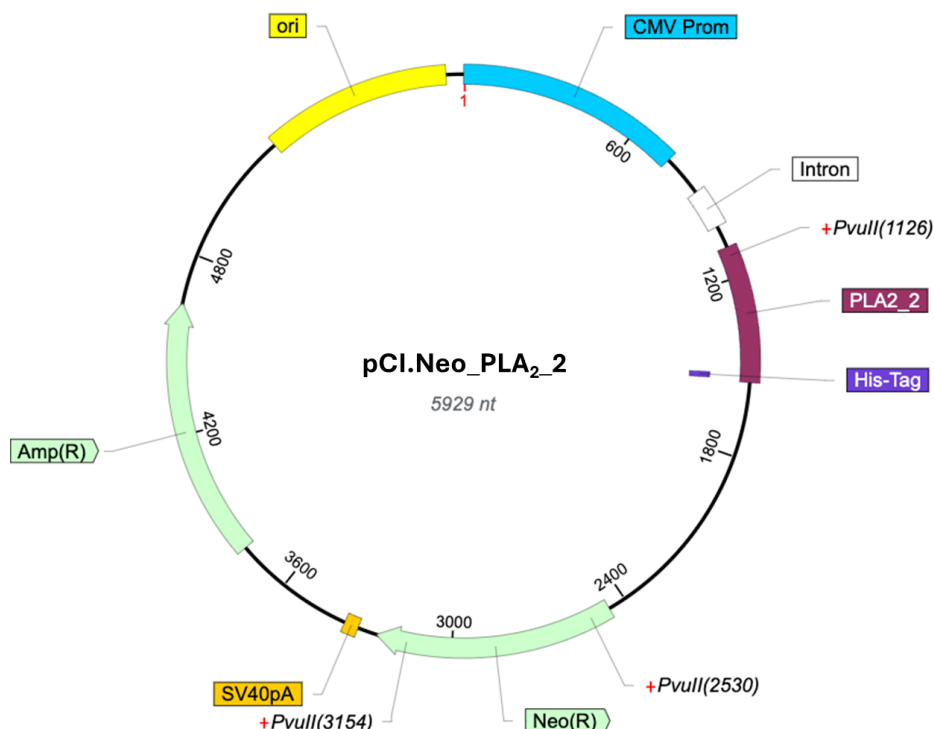
Ambos os plasmídeos, pCI.Neo_PLA₂_1 e pCI.Neo_PLA₂_2 (**Figuras 5 e Figura 6**) possuem as mesmas características do plasmídeo citado anteriormente (pCI.Neo_EGFP) em que há a presença de ponto de origem da replicação bacteriana, promotor CMV derivado de citomegalovírus, intron, sinal de poliadenilação SV40pA e genes de resistência à ampicilina e neomicina. Entretanto, neles foram inseridas as sequências codificantes das fosfolipases A₂, onde o pCI.Neo_PLA₂_1 apresenta 5983 pares de bases (bp) e o pCI.Neo_PLA₂_2 apresenta 5929 pares de bases (bp).

Figura 5. Estrutura do plasmídeo pCI.Neo_PLA₂_1.



Legenda: Ori: origem de replicação bacteriana; CMV Promoter: promotor de expressão; *Intron*; PLA₂_1: fosfolipase A₂; Neo(R): resistência a neomicina; SV40pA: sinal de poliadenilação derivado do vírus SV40 e Amp(R): resistência a ampicilina. Fonte: Imagem gerada pelo software VectorBee 2.7.0.

Figura 6. Estrutura do plasmídeo pCI.Neo_PLA₂_2.



Ori: origem de replicação bacteriana; CMV Promoter: promotor de expressão; *Intron*; PLA₂_1: fosfolipase A₂; Neo(R): resistência a neomicina; SV40pA: sinal de poliadenilação derivado do vírus SV40 e Amp(R): resistência a ampicilina. Fonte: Imagem gerada pelo *software* VectorBee 2.7.0.

4.2 Transformação por choque térmico em bactérias quimiocompetentes

A inserção do DNA plasmidial foi realizado em bactérias quimiocompetentes *Escheria coli* TOP10 (*Thermo-Fisher*, cód. C404003), por meio de choque térmico, visando aumentar a permeabilidade das membranas celulares bacterianas e permitir a entrada do DNA exógeno (molécula altamente polarizada). As bactérias foram descongeladas em gelo, com alíquotas de 50 µL, e incubadas com DNA plasmidial (100 ng) por 30 minutos no gelo. Em seguida, foram submetidas ao choque térmico no termo bloco a 42 °C por 30 segundos e novamente incubadas no gelo por 2 minutos. Posteriormente, as bactérias foram recuperadas com 200 µL de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) e incubadas por 1 hora em agitador. Em seguida foi realizado o plaqueamento em meio de cultura LB-ágar (Luria Bertani) (*Sigma*, cód. L97) suplementado com ampicilina (100 µL/mL) e colocadas na estufa de cultura bacteriológica a 37 °C por 18 horas.

4.3 Pré-inóculo

Foram enumerados 15 tubos contendo meio de cultura LB (*Sigma*, cód. L3522) com ampicilina (100 µL/mL). Foram selecionadas 5 colônias de cada uma das três placas (pCl.Neo_PLA₂_1, pCl.Neo_PLA₂_2 e pCl.Neo_EGFP) e distribuídas da seguinte forma: os tubos de 1 a 5 com colônias da placa pCl.Neo_PLA₂_1, os tubos 6 a 10 com colônias da placa pCl.Neo_PLA₂_2, e os tubos 11 a 15 com colônias da placa pCl.neo_EGFP. Posteriormente, as culturas foram incubadas em agitador a 37°C por 18 horas com 1,5 mL de meio LB em cada tubo cônico de 2 mL.

4.4 Extração do DNA plasmidial

Para a realização da extração do DNA plasmidial, 1 mL do pré-inóculo foi transferida para um novo tubo e centrifugado por 5 minutos a 4 °C em 14.462 g. Após a eliminação do sobrenadante, foi adicionado 200 µL ao tubo o *buffer* de ressuspensão P1 (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 ug/mL RNase A; pH 8.0) para a ressuspensão do *pellet*. Em seguida, o *buffer* de lise P2 (200 mM NaOH; 1% SDS) foi utilizado para ocorrer a lise da membrana plasmática com 200 µL e incubação a 4 minutos em temperatura ambiente, com adição posterior de 200 µL do *buffer* de neutralização P3 (3 M KoAc pH 5.5). Posteriormente, após centrifugação de 14.462 xg por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante (sem os debris celulares) foi recuperado e transferido para um novo tubo e adicionado 600 µL de isopropanol para precipitação do DNA. Após nova centrifugação, 14.462 xg por 15 minutos a 4 °C com descarte do sobrenadante por inversão, o *pellet* foi lavado 500 µL com etanol 70% e centrifugado novamente, 14.462 xg por 5 minutos a 4 °C, com remoção do etanol por inversão, e os tubos foram deixados de ponta cabeça para secagem em temperatura ambiente sobre um papel toalha por 20 minutos para remoção do etanol residual. Por fim, para a eluição do DNA foi adicionado 30 µL H₂O milli-Q®

4.5 Digestão Enzimática

Foi preparado um mix contendo H₂O milli-Q®, *buffer* específico da enzima de restrição (*buffer G*) e a enzima de restrição PvuII (*Thermo Scientific*, cód. #ER0631). Após adição do DNA plasmidial, os tubos foram incubados em termo bloco por uma hora e 30 minutos a 37°C. O DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição para que os cortes fossem feitos nos sítios de restrição da enzima do plasmídeo e a visualização das bandas fossem observadas, posteriormente, por meio da eletroforese em gel. As condições exatas podem ser observadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Condições da digestão enzimática com PvuII para os plasmídeos pCI.Neo_PLA₂_1, pCI.Neo_PLA₂_2 e pCI.Neo_EGFP.

Reagente	Volume
Buffer G	3 µL
Enzima PvuII	0,2 µL
DNA (plasmídeo, pré-inóculo):	3 µL
Água Milli-Q (Total – reagentes)	23,8 µL
Volume total	30 µL

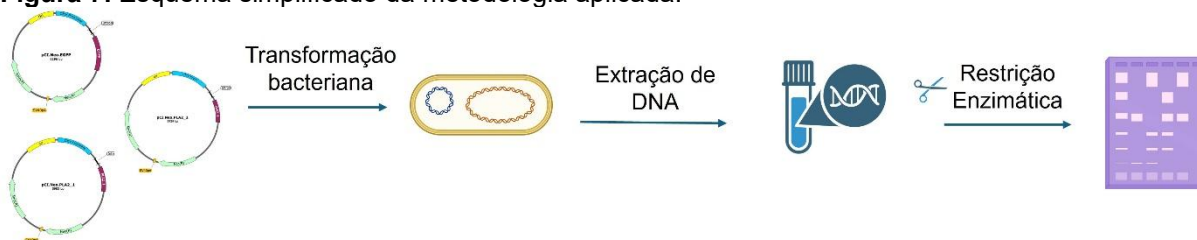
Fonte: Autoria própria.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Para a eletroforese foi preparado gel de agarose a 1 % utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1 x. Após resfriamento e polimerização do gel, foi adicionado aos poços separadamente, o marcador molecular, 1 kb plus DNA (*Thermo-Fisher*, cód. 10787018) e as amostras com os DNAs plasmidiais extraídos dos pré-inóculos (30 µL por poço). Sob diferença de potencial de 120 V por uma hora e 30 minutos. Ao final, as bandas do DNA e seus respectivos pares de bases foram visualizadas no transiluminador ChemiDoc™ (Bio-Rad, cód #1708265)

Um esquema simplificado da metodologia até aqui descrita pode ser observado na **Figura 7**.

Figura 7. Esquema simplificado da metodologia aplicada.



Fonte: Autor, 2025 (criado com BioRender.com)

4.7 Transfecção reversa dos plasmídeos pCI.Neo_EGFP, pCI.Neo_PLA₂_1 e pCI.Neo_PLA₂_2

Para posterior análise do potencial citotóxico em linhagens de cabeça e pescoço, os plasmídeos pCI.Neo_EGFP, pCI.Neo_PLA₂_1 e pCI.Neo_PLA₂_2 foram submetidos à transfecção reversa pelo método de lipofecção com o kit *lipofectamine*[™] 3000 *transfection reagent* (Invitrogen, cód. L3000008) na linhagem celular Vero. Vale ressaltar que se utilizou um controle não tratado, ao qual denominamos NTC (*non-transfected-control*).

Para a realização deste experimento, utilizou-se dois tubos. No primeiro são adicionados DPBS 1x (Gibco, cód 14190), reagente de transfecção P3000, proveniente do kit, e o DNA de cada plasmídeos. No segundo, são adicionados a *lipofectamine* 3000 e o DPBS 1x. Depois juntou-se o conteúdo dos tubos e aguardou-se 10 minutos para formação dos complexos lipídicos com o DNA.

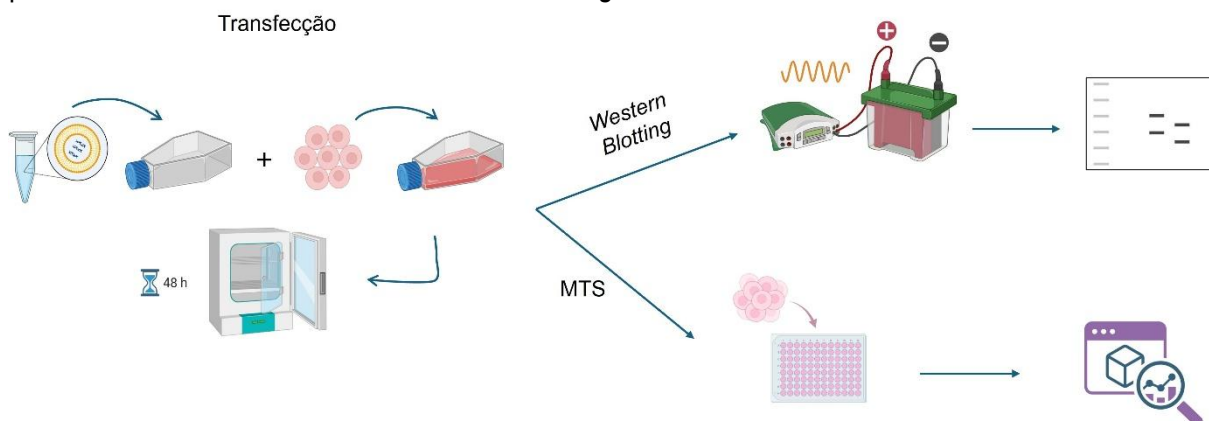
Para a transfecção foi utilizado 2,5 x 10⁶ células em garrafa de cultura T25 cm² com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S).

Os complexos, após incubação, foram adicionados ao fundo da garrafa e, logo após, as células foram adicionadas. Toda a produção foi mantida sob condições controladas utilizando estufa à 37°C e 5% de CO₂.

Após 48h, o sobrenadante foi coletado e armazenado em ultrafreezer a -80°C para posterior análise de viabilidade celular em linhagens de cabeça e pescoço. As células contendo a proteína de interesse também foram coletadas para análises posteriores de *western blotting*.

Um esquema simplificado da transfecção reversa e das análises subsequentes pode ser observado na **Figura 8**.

Figura 8. Esquema simplificado da transfecção reversa em garrafas de cultura T25 cm² e análises posteriores de viabilidade celular e *western blotting*.



Fonte: Autor, 2025 (criado com BioRender.com)

4.8 *Western Blotting* para validação da expressão das fosfolipases A₂ pós-transfecção

Após 48 horas de transfecção, as células contendo as proteínas recombinantes foram lavadas duas vezes com DPBS 1 x (gibco, cód 14190) e raspadas com *cell scraper* (BD Biosciences, cód. 353086). Todo o conteúdo foi armazenado em tubos *Falcons* e armazenados no -80 °C.

Para a realização do ensaio de *western blotting*, as proteínas foram lisadas com tampão de lise RIPA (Thermo Scientific, cód. 89901) suplementado com coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, cód. P8340) na proporção de 1:100. 100 µL foi adicionado nas amostras, incubadas no gelo por uma hora e centrifugadas a 12.470 xg por 15 min à 4°C.

Para a realização da quantificação das proteínas foi feito a curva de concentração com BSA (Sigma, cód. B6916), o qual foi diluído a 0,1 mg/mL. Em uma placa de 96 poços, em duplicada foi feito a curva de concentração, adicionado as amostras e o reagente Bradford (*Scienco Biotech*, cód. Prod#BRADSC). O método de Bradford utiliza a mudança de cor de Comassie Brilliant Blue G 465nm (marrom) para azul 595 nm, assim, pode-se inferir a concentração proteica das amostras analisadas

e a quantidade necessária de outros elementos pertencentes à metodologia de *western blotting*.

Para análise de *western blotting* foi utilizado um gel de 15% SDS-PAGE (acrilamida/bis-acrilamida), carregado por 50 µg de proteína por poço. A corrida foi feita a 120V por duas horas e um marcador molecular de proteínas foi utilizado para referência (*Precision Plus Protein Dual Color Standards – Bio-Rad*, cód. 1610374).

As bandas proteicas, após eletroforese, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (45 µm Amersham Protran Supported NC, GE Healthcare) por transferência molhada, utilizando-se tampão de transferência (25 mM Tris Base, 193 mM glicina e 20% de metanol).

A transferência das proteínas do gel para a membrana ocorreu a 90 V por uma hora e 30 minutos. Logo após, a membrana foi incubada em solução contendo leite em pó desnatado Molico™ 5% + TBS-T 1× (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,9%, Tween-20 0,2%), por duas horas em temperatura ambiente sob agitação orbital.

Após duas lavagens com TBS-T 1x por 5 minutos, as membranas foram cortadas e incubadas *overnight* com anticorpo primário e incubadas com anticorpo secundário, de acordo com a **Tabela 2**, por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação orbital.

Por quimioluminescência com os reagentes *SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology®*, cód. 68835) ou *SuperSignal™ West Femto (Thermo Scientific*, cód. 34094) em diluição 1:1, as bandas foram detectadas e fotografadas pelo transiluminador ChemiDoc™ (Bio-Rad).

Tabela 2. Anticorpos utilizados para detecção de proteínas por *Western Blotting*

Anticorpos	Diluição	Origem animal	Fabricante/código
Anti-His-Tag	1:250	Coelho	Cell signaling #2365
Anti-GFP	1:1000	Camundongo	ROCHE 11814460001
Anti-GAPDH	1:1000	Coelho	Cell signaling #2118
Anti-mouse IgG	1:5000	Camundongo	Cell signaling #7074
Anti-rabbit IgG	1:5000	Coelho	Cell signaling #7076

Fonte: A autoria Própria

4.9 Ensaio de viabilidade celular das linhagens tumorais de cabeça e pescoço

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o kit *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, cód. G3581) conforme descrito pelo fabricante. As linhagens tumorais de cabeça e pescoço (VU-SCC-147T, VU-SCC-120T, UD-SCC-2 e FaDu) e a linhagem não tumoral derivada de queratinócitos (HaCaT) foram semeadas em placas de 96 poços em triplicatas. Após 24 horas de plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e as células receberam 100 µL do sobrenadante da transfecção dos plasmídeos pCl.Neo_EGFP, pCl.Neo_PLA₂_1, pCl.Neo_PLA₂_2 e o controle não transfectado (NTC).

Após 48 horas de tratamento, foi utilizado 20 µL do reagente MTS e ele foi incubado por 2 horas. Após incubação, realizou-se a leitura da placa a 492 nm. Os dados foram obtidos e normalizados em relação as amostras não tratadas.

Tabela 3. Linhagens celulares utilizadas ao longo dos estudos

Identificação	Tecido	Origem
VU-SCC-120T	Cavidade Oral	Humana
VU-SCC-147T	Cavidade Oral	Humana
UD-SCC-2	Hipofaringe	Humana
FaDu	Hipofaringe	Humana
HaCaT	Epiderme	Humana
Vero	Rim (epitélio)	Animal

Fonte: Autoria Própria

4.10 Análises estatísticas

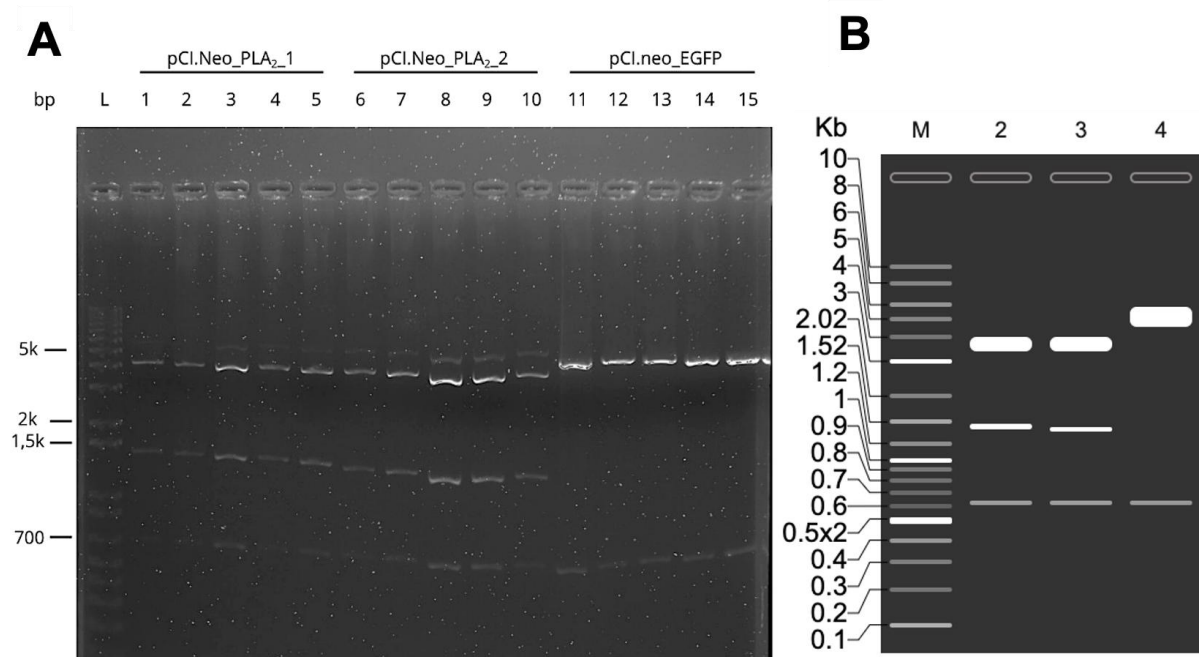
Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 10.2.3. Para comparações envolvendo três ou mais grupos, utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguida dos testes post-hoc apropriados, quando necessário. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise de restrição enzimática

A digestão enzimática utilizando a enzima de restrição PvuII apresentou bandas nítidas no gel de agarose a 1 %, confirmando o corte específico nos sítios de restrição do plasmídeo. Esse resultado é consistente com as características da enzima, que reconhece sequências específicas no DNA plasmidial, produzindo fragmentos de tamanhos previsíveis sem degradá-lo. A eficiência do corte reforça a integridade das amostras extraídas, uma vez que a presença de inibidores poderia comprometer a atividade enzimática.

A eletroforese das amostras digeridas revelou bandas bem definidas, em que pCI.Neo_PLA₂_1 apresenta 3 bandas de 3901 Kb, 1458 Kb e 624 Kb, respectivamente. Enquanto pCI.Neo_PLA₂_2 apresenta 3 bandas de 3901 Kb, 1404 Kb e 624 Kb, respectivamente e pCI.Neo_EGFP apresenta somente 2 bandas de 4848 Kb e 624 Kb, respectivamente o que permitiu a identificação dos tamanhos dos fragmentos plasmidiais com base na comparação com o DNA ladder 1KB plus (**Figura 9**). As bandas observadas foram consistentes com os tamanhos esperados nos três diferentes plasmídeos (pCI.Neo_PLA₂_1, pCI.Neo_PLA₂_2 e pCI.Neo_EGFP), indicando que os plasmídeos foram corretamente digeridos e que não houve degradação significativa ao longo dos procedimentos.

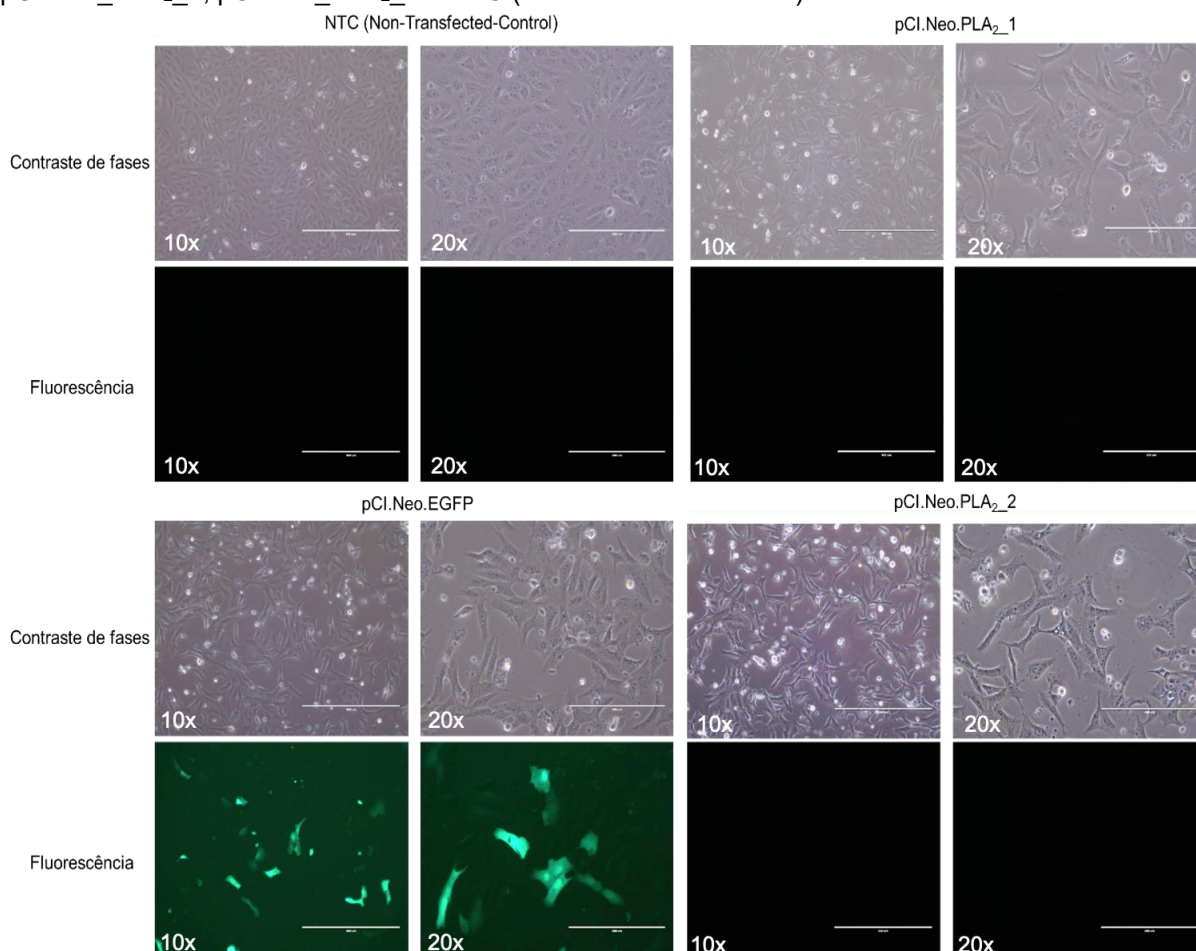
Figura 9. Análise de restrição enzimática.

Legenda: L: marcador molecular, 1 kb Plus DNA; 1 ao 5: pCI.Neo_PLA₂_1; 6 ao 10: pCI.Neo_PLA₂_2; 11 ao 15: vetor controle pCI.Neo_EGFP. Utilizou-se a enzima de restrição PvuII. Gel de agarose a 1% (a). M: marcador molecular, 1 kb Plus DNA; 2: pCI.Neo_PLA₂_1; 3: pCI.Neo_PLA₂_2; 4: pCI.Neo_EGFP. Simulação de restrição enzimática *in silico* gerada utilizando o software VectorBee v2.7.0. (b). Fonte: autoria própria.

5.2 Validação da expressão das fosfolipases A₂ pós-transfecção

Primeiramente, pode-se validar a transfecção através de microscopia de fluorescência em que se observou a presença da proteína EGFP marcada pela emissão de fluorescência na cor verde do plasmídeo pci.Neo_EGFP utilizado como controle positivo para a transfecção. As imagens foram fotografadas em aumento de 10x e 20x, **Figura 10**.

Figura 10. Imagens de microscopia de fluorescência dos plasmídeos pCl.Neo_EGFP, pCl.Neo_PLA₂_1, pCl.Neo_PLA₂_2 e NTC (non-transfected-control)



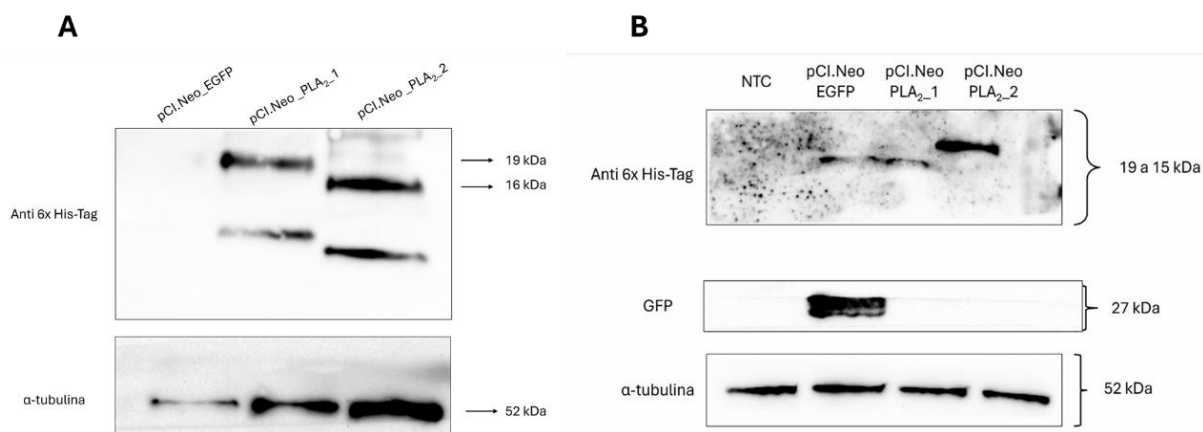
Legenda: Imagens obtidas com o microscópio EVOS™ M5000. Amplificação de 10 e 20x
Fonte: Autoria própria

A técnica de *western blotting* foi utilizada para validar a expressão das proteínas recombinantes pós-transfecção dos plasmídeos pCl.Neo_EGFP, pCl.Neo_PLA₂_1 e pCl.Neo_PLA₂_2 com *lipofectamine™ 3000 transfection reagent* (Thermo Scientific) na linhagem Vero, 48 horas após a transfecção (**Figura 11**). As células foram recolhidas para a extração proteica. O tag de histinas adicionados previamente pelo nosso grupo de pesquisa possuem entre 19 e 16 kDa quando avaliados os pesos moleculares dos extratos proteicos pela técnica de *western blotting* com o auxílio de um anticorpo contra o tag de histidinas. Apesar de se esperar duas bandas (**Figura 11, A**) com tamanhos diferentes em ambas as fosfolipases A₂ devido ao sinal de clivagem delas, a visualização somente de uma (**Figura 11, B**) demonstra que a expressão gênica das sequências que codificam para ambas as fosfolipases A₂ é um indicativo de sua presença. Vale destacar que ainda na figura 11, B houve

extravasamento do conteúdo proteico da fosfolipase A₂_1 para o vetor controle pCI.Neo_EGFP o que fez com que ele apresentasse uma banda indevida, visto que não há presença do tag de histidina no vetor. Apesar do ocorrido, a análise das demais condições experimentais não foram desconsideradas.

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes são comumente usadas na literatura seja por meio de organismos procariotos ou eucariotos. Esse trabalho demonstra a utilização desse sistema para produzir proteínas recombinantes em linhagem eucariota com a finalidade de que haja reprodutibilidade da produção.

Figura 11. *Western Blotting* das fosfolipases A₂ recombinantes.



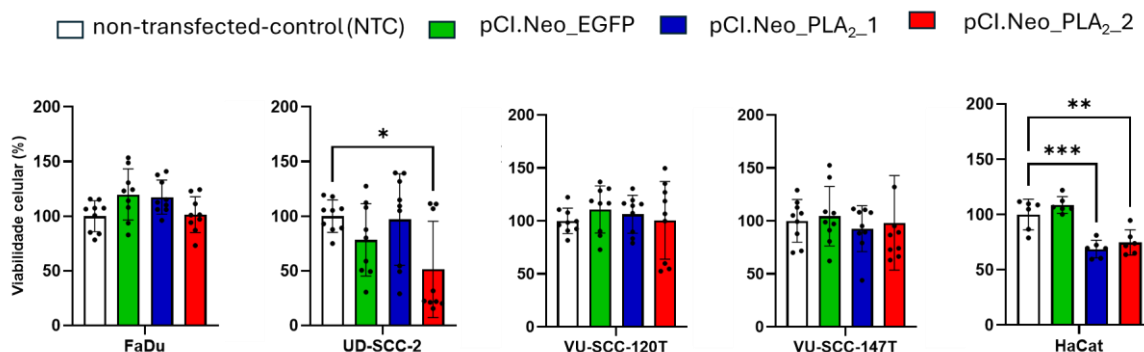
Legenda: Análise realizada a partir da transfecção dos plasmídeos NTC (non-transfected-control), pCI.Neo_EGFP, pCI.Neo_PLA₂_1 e pCI.Neo_PLA₂_2 com *lipofectamine*TM 3000 *transfection reagent* (Thermo Scientific) na linhagem Vero (ATCC) após 48 horas de transfecção. Fonte: Autoria própria

5.3 Ensaio de viabilidade celular das linhagens tumorais de cabeça e pescoço tratadas com as fosfolipases A₂

Em triplicata biológica, as linhagens tumorais de cabeça e pescoço receberam o meio condicionado contendo as fosfolipases A₂ o qual foi produzido mediante transfecção reversa dos plasmídeos pCI.Neo_PLA₂_1 e pCI.Neo_PLA₂_2 na linhagem Vero. Após 48h de tratamento com o meio condicionado, o ensaio de MTS foi lido para avaliar a viabilidade celular. Apesar de não haver redução em três linhagens tumorais (FaDu, VU-SCC-120T e VU-SCC-147T), foi observado redução significativa na linhagem tumoral UD-SCC-2 pela ação da fosfolipase A₂_2. Contudo, foi utilizado também, uma linhagem pseudonormal, HaCaT, em duplicata, como

controle ao tratamento, em que nesta verificou-se redução da viabilidade pela ação de ambas fosfolipases A₂ (**Figura 12**).

Figura 12. Viabilidade celular após tratamento com meios condicionados em linhagens de tumor de cabeça e pescoço e em uma linhagem de queratinócitos.



Legenda: A viabilidade celular foi avaliada 48 horas após a adição dos sobrenadantes derivados das transfecções com fosfolipase A₂. Os resultados são expressos como porcentagem média \pm desvio-padrão em relação ao controle não infectado (definido como 100%). Os dados representam três experimentos independentes (HaCaT: dois experimentos independentes), cada um realizado em triplicata. Asteriscos indicam significância estatística (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) em comparação ao NTC. Teste ANOVA unilateral aplicado. Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

Toxinas de animais peçonhentos têm sido amplamente descritas na literatura como fontes promissoras de moléculas com potencial terapêutico, especialmente na oncologia, devido à sua elevada especificidade molecular. Entre essas toxinas, as fosfolipases A₂ (PLA₂) destacam-se por sua capacidade de interagir com membranas celulares e modular vias relacionadas à proliferação e morte celular.

Estudos prévios demonstram atividade antitumoral de PLA₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* em diferentes modelos/sistemas experimentais. Trabalhos de Breno e colaboradores relataram efeito citotóxico significativos de fosfolipases A₂ em linhagens tumorais humanas, reforçando o potencial dessa classe de enzimas como candidata ao desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos (Frihling et al., 2022).

No presente estudo, as fosfolipases A₂ de *Bothrops jararaca* foram expressas em sistema eucariótico e avaliadas quanto ao seu efeito citotóxico em linhagens tumorais de cabeça e pescoço. A confirmação da expressão proteica por *western blotting* indica que o sistema de transfecção em células Vero foi adequado para a produção das proteínas recombinantes, permitindo a análise funcional por meio do uso do meio condicionado.

A redução significativa da viabilidade celular observada em uma das 3 linhagens tumorais e na linhagem não tumoral sugere ação citotóxica dessas enzimas que pode estar associadas a certas características como, por exemplo, o desbalanço de vias de sinalização intracelular. Por outro lado, a ausência de efeito significativo nas demais linhagens tumorais avaliadas reforça a heterogeneidade biológica dos carcinomas de cabeça e pescoço.

7 CONCLUSÃO

Os métodos empregados para a transformação em bactérias quimiocompetentes, seguido de extração de DNA plasmidial, digestão enzimática e eletroforese em gel demonstraram ser eficientes e adequados para os objetivos propostos. Além de confirmar a integridade e o tamanho esperado dos nossos plasmídeos.

Imagens de microscopia de fluorescência juntamente com a realização da técnica de *western blotting* demonstram reprodutibilidade da metodologia utilizada para transfecção dos plasmídeos em células Vero.

O ensaio de viabilidade celular demonstrou efeito citotóxico na linhagem tumoral UD-SCC-2 quando em contato com o sobrenadante da fosfolipase A₂_2 (PLA₂_2).

Apesar dos achados do presente trabalho, vale ressaltar que estudos posteriores necessitam ser realizados com a finalidade de maior compreensão da ação das fosfolipases A₂ (PLA₂_2) na linhagem tumoral UD-SCC-2.

REFERÊNCIAS

ARGIRIS, Athanassios *et al.* Head and neck cancer. The Lancet, v. 371, n. 9625, p. 1695–1709, 2008.

BRENO, M. C.; PICARELLI, Z. P. The vasopressor action of angiotensin in the snake *Bothrops jararaca*. Comparative Biochemistry and physiology. Comparative Physiology, v. 101, n. 4, p. 819–825, 1992.

BROOK, Itzhak. Late side effects of radiation treatment for head and neck cancer. Radiation oncology journal, v. 38, n. 2, p. 84, 2020.

CAMPANA, Igor Gusmão; GOIATO, Marcelo Coelho. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico e tratamento. 2013.

CAMPOLINA REBELLO HORTA, Carolina *et al.* Cardiovascular-active venom toxins: an overview. Current Medicinal Chemistry, v. 23, n. 6, p. 603–622, 2016.

DE ANDRADE MARQUES, Camila *et al.* Antitumor and antiproliferative potential of crotoxin in triple negative breast tumors. Toxicon, v. 258, p.108322, 2025.

DE FREITAS OLIVEIRA, Carolina *et al.* Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. Toxicon, v. 53, n. 5, p. 560–569, 2009.

DENEGRI, María E. Garcia *et al.* Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. Toxicon, v. 56, n. 1, p. 64–74, 2010.

DENNIS, Edward A. 9 Phospholipases. *In*: The enzymes. [S.l.]: Elsevier, 1983. v. 16 p. 307–353.

DENNIS, Edward A. *et al.* Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction 1. The FASEB journal, v. 5, n. 7, p. 2068–2077, 1991.

EDENBERG, Howard J. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. Alcohol research & health, v. 30, n. 1, p. 5, 2007.

FRIHLING, Breno Emanuel Farias *et al.* Purification, characterization and evaluation of the antitumoral activity of a phospholipase A2 from the snake *Bothrops moojeni*. Pharmaceuticals (Basel), v. 15, n. 6, p. 724, 2022.

GORMLEY, Mark *et al.* Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. British Dental Journal, v. 233, n. 9, p. 780–786, 2022.

GUTIÉRREZ, José María; RUCAVADO, Alexandra. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie, v. 82, n. 9–10, p. 841–850, 2000.

HOESSEINI, Arta *et al.* Prognostic model for overall survival of head and neck cancer patients in the palliative phase. BMC Palliative Care, v. 23, n. 1, p. 54, 2024.

KANG, Hyunseok; KIESS, Ana; CHUNG, Christine H. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. Nature reviews Clinical oncology, v. 12, n. 1, p. 11–26, 2015.

MORDZIŃSKA-RAK, Aleksandra *et al.* Advancing Head and Neck Cancer Therapies: From Conventional Treatments to Emerging Strategies. Biomedicines, v. 13, n. 5, p. 1046, 2025.

MURAKAMI, Makoto. The phospholipase A2 superfamily as a central hub of bioactive lipids and beyond. Pharmacology & Therapeutics, v. 244, p. 108382, 2023.

NIEMELÄ, Onni. Acetaldehyde adducts in circulation. *In*: Wiley Online Library, 2006.

PUCCA, Manuela B. *et al.* Current knowledge on snake dry bites. *Toxins*, v. 12, n. 11, p. 668, 2020.

RUMGAY, Harriet *et al.* Alcohol and cancer: epidemiology and biological mechanisms. *Nutrients*, v. 13, n. 9, p. 3173, 2021.

SERRANO, Solange M. T.; MAROUN, Rachid C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 2005.

SOUSA, Leijiane F. *et al.* Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 9, p. e2442, 2013.

TUYNS, A-J *et al.* Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *International journal of cancer*, v. 41, n. 4, p. 483–491, 1988.

VERRO, Barbara *et al.* Beyond Conventional Treatments: The Role of Complementary Therapies in Head and Neck Cancer. *Cancers*, v. 17, n. 8, p. 1269, 2025.

WITTCOFF, Harold. The phosphatides. 1951.