



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Efectos *in vitro* del veneno y componentes aislados de *Lachesis muta* en neuroblastoma humano

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: CAROLYN ESTEFANY ROSALES TUMBACO

TUTOR: PhD. JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA

Napo-Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Carolyn Estefany Rosales Tumbaco con documento de identidad N° 0926672676, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 17 de noviembre del 2022



Carolyn Estefany Rosales Tumbaco

CI: 0926672676

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular Titulado: EFECTOS IN VITRO DEL VENENO Y COMPONENTES AISLADOS DE *LACHESIS MUTA* EN NEUROBLASTOMA HUMANO, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Carolyn Estefany Rosales Tumbaco, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación desimilitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 17 de noviembre del 2022

Firma



Firmado electrónicamente por:
**JOSE RAFAEL
DE ALMEIDA**

PhD. José Rafael de Almeida
C.I: 1757448954

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Carolyn Estefany Rosales Tumbaco, con documento de identidad N° 0926672676, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Efectos in vitro del veneno y componentes aislados de Lachesis muta en neuroblastoma humano”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 17 de noviembre de 2022



Carolyn Estefany Rosales Tumbaco

CI: 0926672676

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi hermana mayor, que, aunque no logre leer esto, sé que está muy orgullosa de la persona que soy y la profesional que me planteo ser. Por ella y por las personas que sufren diariamente en un hospital con Cáncer me involucré en este campo científico. Y aunque ella no ganó la batalla, siempre me alentó a continuar y no rendirme, para que al día de hoy este trabajo pueda ser una pequeña contribución para futuros proyectos y aportes en la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme llegar a la recta final de una meta planteada en el 2016.

A mi tutor Rafael y Bruno quienes fueron ejemplo, guías, amigos y padres; quienes supieron corregir con templanza, disciplina, compromiso y amor.

A mis padres porque sin ellos esto no hubiera sido posible.

Y por último a mis amigos y a mi novio, quienes tuvieron un rol individual en mi vida, muy valioso y que llena mi corazón de alegría.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD .. | II |
| CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR..... | III |
| AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL..... | IV |
| DEDICATORIA | V |
| AGRADECIMIENTOS | VI |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | IX |
| ÍNDICE DE FIGURAS | X |
| RESUMEN | XI |
| ABSTRACT | XII |
| 1. CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.1.1. <i>Cáncer: Fundamentos y epidemiología</i> | <i>1</i> |
| 1.1.2. <i>Tratamientos actuales para cáncer</i> | <i>2</i> |
| 1.1.3. <i>Compuestos bioactivos como alternativa a tratamientos actuales</i> | <i>4</i> |
| 1.1.4. <i>Veneno de serpientes</i> | <i>5</i> |
| 1.2. Planteamiento del problema a investigar | 6 |
| 1.3. Justificación de la investigación | 7 |
| 1.4. Objetivos de Investigación..... | 8 |
| 1.4.1. <i>Objetivo General.....</i> | <i>8</i> |
| 1.4.2. <i>Objetivos Específicos</i> | <i>8</i> |
| 2. CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO..... | 9 |
| 2.1. Veneno | 9 |
| 2.2. Métodos..... | 9 |
| 2.2.1. <i>Evaluación citotóxica del veneno.....</i> | <i>9</i> |
| 2.2.1.1. <i>Descongelamiento y cultivo de línea celular</i> | <i>9</i> |
| 2.2.1.2. <i>Mantenimiento y replique de la línea celular.....</i> | <i>10</i> |
| 2.2.1.3. <i>Cosecha de las células</i> | <i>10</i> |
| 2.2.1.4. <i>Conteo celular.....</i> | <i>11</i> |
| 2.2.1.5. <i>Incubación de veneno, MTT y SDS.....</i> | <i>11</i> |
| 2.2.1.6. <i>Ensayos hemolíticos</i> | <i>12</i> |
| 2.2.2. <i>Purificación y evaluación citotóxica de las fracciones más abundantes de L. muta.....</i> | <i>12</i> |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2.2.1. | <i>Fraccionamiento del veneno crudo L. muta por RP-HPLC</i> | 12 |
| 2.2.2.2. | <i>Liofilización y almacenamiento de las fracciones L. muta</i> | 13 |
| 2.2.2.3. | <i>Cromatografía de las fracciones</i> | 13 |
| 2.2.2.4. | <i>Electroforesis SDS -PAGE</i> | 14 |
| 2.2.2.5. | <i>Evaluación del potencial citotóxico de las toxinas más abundantes</i> | 14 |
| 2.2.2.6. | <i>Actividad hemolítica de las toxinas más abundantes</i> | 15 |
| 2.2.3. | <i>Identidad molecular de las fracciones más abundantes de L. muta</i> | 15 |
| 2.2.3.1. | <i>Actividad caseinolítica</i> | 15 |
| 2.2.3.2. | <i>Actividad serinproteasa</i> | 16 |
| 2.2.3.3. | <i>Actividad L-amino oxidasa</i> | 16 |
| 2.2.3.4. | <i>Actividad Fosfolipasa</i> | 17 |
| 2.2.3.5. | <i>Masa intacta de las fracciones más abundantes L. muta</i> | 17 |
| 2.2.3.6. | <i>Digestión de bandas</i> | 18 |
| 2.2.3.7. | <i>Análisis estadístico</i> | 19 |
| 3. | CAPÍTULO III. PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS | 20 |
| 3.1. | Evaluación de la actividad citotóxica del veneno | 20 |
| 3.2. | Perfil bioquímico de L. muta | 22 |
| 3.3. | Cromatografía por RP-HPLC de las principales fracciones del veneno L. muta | 26 |
| 3.4. | Identidad molecular de las fracciones más abundantes de L. muta | 29 |
| 3.5. | Espectrometría de masas | 31 |
| 4. | INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN | 34 |
| 5. | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 39 |
| | REFERENCIAS | 46 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1-1: Área y cantidad de las fracciones liofilizada más abundantes de <i>L. muta</i> | 20 |
| Tabla 1-2: Identidad de las fracciones RP-HPLC del veneno de <i>L. muta</i> (Ecuador) por secuenciación LC-ESI-TOF-MS de bandas de proteínas digeridas con tripsina..... | 27 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1-10: Efecto del veneno <i>L. muta</i> sobre los cambios morfológicos y el desprendimiento celular en NB..... | 17 |
| Figura 2-10: Efecto hemolítico de <i>L. muta</i> sobre eritrocitos humanos..... | 18 |
| Figura 3-10: Perfil de elución del veneno crudo de la serpiente <i>L. muta</i> mediante RP-HPLC en columna C18 discovery bio wide pore..... | 19 |
| Figura 4-10: Abundancia relativa (%) de las fracciones purificadas más abundantes del veneno <i>L. muta</i> | 20 |
| Figura 5-10: Electroforesis por SDS page de las fracciones obtenidas por RP-HPLC..... | 21 |
| Figura 6-10: Recromatografía de las cinco fracciones obtenidas por RP-HPLC con mayor absorbancia..... | 22 |
| Figura 7-10: Efecto citotóxico de las fracciones | 23 |
| Figura 8-10: Porcentaje de hemólisis de las fracciones purificadas más abundantes de <i>L. muta</i> | 24 |
| Figura 9-10: Actividad enzimática del veneno crudo y fracciones purificadas de <i>L. Muta</i> para SVMP y PLA ₂ | 25 |
| Figura 10-10: Espectros por LC-ESI-TOF para las fracciones 24, 25 y 26 con potencial citotóxico..... | 26 |

RESUMEN

El neuroblastoma es el cáncer sólido más común en la infancia y pese que posee terapias dirigidas, cirugía o quimioterapia, su tratamiento no es eficaz. Es por eso que urge la necesidad de promover la búsqueda de alternativas que mejoren o reemplacen la terapia convencional. El veneno de las serpientes es de interés para el desarrollo de fármacos contra el cáncer, debido a que son mezclas complejas de proteínas, enzimas y péptidos. El objetivo de estudio es evaluar la actividad citotóxica del veneno crudo y sus componentes mayoritarios *L. muta* sobre SH-SY5Y y eritrocitos humanos para contribuir en los estudios toxicológicos de Ecuador. La citotoxicidad y la caracterización enzimática se realizó a partir de ensayos colorimétricos MTT, RP-HPLC, electroforesis SDS-PAGE, espectrometría de masas en tándem y espectrofotometría. La caracterización enzimática se realizó de las fracciones más abundantes del veneno. Los resultados revelaron que 300 µg/mL de veneno tiene un 56 % de inhibición para la línea celular SH-SY5Y. Microscópicamente, las células se redondearon y formaron agregados celulares. El porcentaje de hemólisis fue significativamente bajo (4,54 %) respecto al control positivo. Se tuvo cuatro fracciones de mayor abundancia relativa, donde F16 y F26 tuvieron un significativo efecto citotóxico, disminuyendo la viabilidad celular a 83 % y 56 %, respectivamente. La evaluación de la actividad enzimática demostró que el contenido del veneno y las fracciones tienen actividad L-amino oxidasa, fosfolipasa, serinproteasa y metaloproteasa. Estos hallazgos brindan la primera evidencia del efecto citotóxico en SH-SY5Y de los componentes del veneno *L. muta* ecuatoriana.

Palabras Clave: Citotoxicidad, Lachesis muta, ensayo MTT, neuroblastoma

ABSTRACT

Neuroblastoma is the most common solid cancer in childhood, although it has targeted therapy, surgery or chemotherapy, its treatment is not effective. Thus, there is an urgent need to promote the search for alternatives that improve or replace conventional therapy. Snake venom is one of the most promising approaches for cancer drug development because it is a complex mixture of proteins, enzymes, and peptides. The objective of the study is to evaluate the cytotoxic activity of crude venom of *L. muta* and its major components on SH-SY5Y cell line and human erythrocytes to contribute to toxicological studies in Ecuador. Cytotoxicity and enzymatic characterization was performed using MTT colorimetric assays, RP-HPLC, SDS-PAGE electrophoresis, tandem mass spectrometry, and spectrophotometry. The enzymatic characterization was carried out for the most abundant fractions of the venom. The results revealed that 300 µg/mL of venom had 56% inhibition for the SH-SY5Y cell line. Microscopically, the cells rounded and formed cellular aggregates. The percentage of hemolysis was significantly low (4.54%) compared to the positive control. There were four fractions with higher relative abundance, where F16 and F26 had a significant cytotoxic effect, decreasing cell viability to 83% and 56%, respectively. The evaluation of the enzymatic activity showed the venom composition and the fractions have L-amino oxidase, phospholipase, serine protease and metalloprotease activity. These findings provide the first evidence of the cytotoxic effect on SH-SY5Y of the components of the Ecuadorian *L. muta* venom.

Keywords: Cytotoxicity, Lachesis muta, MTT assay, neuroblastoma

1. CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Cáncer: Fundamentos y epidemiología*

El cáncer es el resultado de una multiplicación descontrolada de células que son capaces de diseminarse hacia tejidos sanos [1]. Esta enfermedad es de origen multifactorial, debido a que su desarrollo puede estar dado por efectos combinados entre los que destacan: ambientales, genéticos y en pocos casos hereditarios [2]. La investigación ha explorado algunos aspectos sobre el mecanismo de acción y los factores de riesgo asociados a la enfermedad que son útiles para comprender el origen, diagnóstico, prevención y tratamiento [3]. El cáncer puede surgir de todos los tipos celulares y órganos [4]. Se han descrito agentes ligados a su desarrollo y se pueden clasificar en controlados y no controlados [5]. El consumo de tabaco, alcohol, una vida sedentaria, hábitos alimenticios no saludables, exposición a sustancias, entre otros, caracterizan las causas controladas. Por otro lado, los factores de riesgo incontrolables están asociados al envejecimiento, el crecimiento demográfico, la pobreza y el medioambiente [6].

El efecto de los factores mencionados anteriormente desencadena síntomas y señales del desarrollo del cáncer en etapas tardías. Por lo tanto, existen muchos tipos de cáncer que son de difícil detección en las etapas tempranas de desarrollo, pese a la mejora en las técnicas de diagnóstico [7]. Sumado a esto, los fármacos carecen de especificidad para la mayoría de los tipos de cáncer, lo que significa que, la mayoría de los fármacos anticancerígenos clásicos no pueden diferenciar entre células cancerosas y normales, incrementando la toxicidad sistémica y efectos secundarios adversos tanto para adultos como para niños a nivel mundial [8].

En el 2020, se diagnosticaron más de 1,8 millones de casos nuevos de cáncer y 609 520 muertes en los Estados Unidos (EE. UU.) [9,10]. En Ecuador, respecto a su población total, se tiene 28 058 casos nuevos y 14 559 fallecidos por año [10]. Esta cifra se ha incrementado

de forma alarmante desde el año 2020 [11]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), Ecuador está entre los países que ocupan los primeros lugares en el ranking de mortalidad prematura por cáncer. En los países de primer mundo, el acceso a servicios de atención integral salva a más del 80 % de niños que sufren esta enfermedad, mientras que en países en vías de desarrollo se curan menos del 30 % de los niños afectados [10,12,13]. Se calcula que cada año aproximadamente 400 000 niños y adolescentes (0-19 años) son diagnosticados con esta patología [12]. En consecuencia, el cáncer infantil se ha convertido en la segunda causa de mortalidad a nivel pediátrico, convirtiéndose en un problema relevante para el sistema de salud, con tratamientos no específicos y con efectos secundarios graves [14].

El cáncer más común de la infancia es el neuroblastoma (NB), formado por una masa de células cancerígenas (tumor) sólido extracraneal, donde el 95 % de los pacientes tienen menos de 5 años [15]. En Australia, Europa y EE. UU. el NB representa del 8 % al 10 % del total de niños (0-14 años) con esta patología, ocupando el cuarto lugar en incidencia [15,16]. En Ecuador, 1 de cada 2 niños muere por cáncer, una realidad que ha puesto en alerta a entidades públicas y privadas [17]. Aunque el NB sea un tipo de cáncer sólido, este tipo de cáncer forma células malignas en los neuroblastos del tejido nervioso prematuro, en las glándulas suprarrenales, el cuello, el tórax y la médula espinal [16]. Los tumores derivados de células indiferenciadas provenientes de la cresta neural hacia el sistema nervioso simpático son capaces de presentar crecimiento descontrolado en cualquier sitio, generando tumores en distintas partes del cuerpo humano [17,18]. A menudo, cuando se diagnostica, el NB ya está diseminado a ganglios linfáticos, los huesos, la médula ósea, el hígado, la piel, el encéfalo o los pulmones [18,19].

1.1.2. Tratamientos actuales para cáncer

Las opciones terapéuticas para el cáncer varían desde cirugía a quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal, hipertermia, entre otros [20]. La cirugía es un tratamiento común, donde se extirpa el tumor comprometiendo diferentes tejidos, causando fibrosis e inflamación [21]. La quimioterapia se refiere a múltiples fármacos administrados vía oral o intravenoso, siendo el régimen terapéutico prioritario, a pesar de los efectos secundarios graves [20,22]. Uno de los efectos importantes es la resistencia

celular a los medicamentos, siendo el mayor de los desafíos para la quimioterapia [23]. Otra terapia contra el cáncer es la radioterapia; sin embargo, en este caso se ve afectada la fertilidad de los pacientes debido a la exposición repetida a partículas radioactivas [24]. Por otra parte, los fármacos que bloquean el crecimiento y controlan la diseminación de las células se denomina terapia dirigida. No obstante, entre los efectos secundarios se destacan los problemas hepáticos producidos [24,25]. De igual forma, la inmunoterapia depende de la capacidad del cuerpo humano para combatir infecciones (sistema inmunitario) y ocasiona desórdenes en el sistema inmunitario difíciles de controlar, provocando un ataque a las células sanas [25]. Entre las terapias clásicas, se resalta la controversia de la quimio resistencia o resistencia a múltiples drogas (MDR), siendo atribuida a una proteína transportadora de la membrana celular llamada p-glicoproteína, la cual inhibe la acción de determinados fármacos [23,26].

Según las guías del Grupo de Oncología Pediátrica, los fármacos habituales para tratar el neuroblastoma en 2021 son la vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina, carboplatino y etopósido [22,27]. Estos fármacos trabajan en conjunto, pero cada uno de ellos afecta el funcionamiento de diversos órganos, provocando neutropenia, trombosis, neuropatías, debilidad, dolor, entre otros cuadros clínicos graves [27]. En el caso del neuroblastoma, el método terapéutico dependerá de la etapa del cáncer [28]. Es decir, en el neuroblastoma diseminado y no localizado, la expresión de p-glicoproteína antes del tratamiento es capaz de predecir el éxito o el fracaso en la quimioterapia [29,30]. El NB en su forma sólida (tumor) es tratado con cirugía, sin embargo, esta puede ser de alto riesgo si se expande a los ganglios linfáticos cercanos al tumor [31]. Si este problema ocurre, es necesario reducir el volumen tumoral mediante quimioterapia convencional, exponiendo al paciente a las consecuencias de este régimen de procedimiento, disminuyendo la tasa de supervivencia a un 30 % [24,31].

Durante la búsqueda de nuevas sustancias y medicamentos contra el cáncer se han explorado proteínas y péptidos como un grupo prometedor de compuestos bioactivos y potenciales fármacos contra el cáncer [32]. El ejemplo más conocido del uso de metabolitos son las “toxinas Coley”, originadas a partir de *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* para tumores irsecables (tumores de gran extensión) [33]. La actinomicina, bleomicina, doxorubicina y mitomicina C, son antibióticos que posteriormente fueron

aprobados contra el cáncer. De hecho, la doxorubicina fue aislada de *Streptomyces peuceticus* en 1950, el cual mostraba una buena actividad para tumores de ratones (murinos), sin embargo, en 1967 registró que causaba efectos cardio tóxicos fatales [34]. Los medicamentos contra el cáncer siguen siendo una necesidad clínica no resuelta, es por esto que ha incrementado el desarrollo de alternativas novedosas que incluyan entidades moleculares innovadoras y productos biológicos más eficientes [35]. En los últimos años, investigaciones sobre agentes citotóxicos de baja efectividad han ido perfeccionando la especificidad basada en mecanismos que combinan inmunoterapia y terapia dirigida, dando como resultado a los anticuerpos monoclonales [36,37]. En términos generales, esta terapia es eficaz, aunque provoque reacciones alérgicas, hipertensión, daño renal, coagulopatías, entre otros. Los efectos adversos de los anticuerpos monoclonales dependerán de la salud del paciente previo al proceso, el tiempo con la patología, el tipo de anticuerpo monoclonal que reciba y la dosis [38].

En el 2020, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó Naxitamab, un fármaco basado en un anticuerpo monoclonal que combina un factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos indicado para pacientes de 1 año y mayores con Neuroblastoma de alto riesgo en hueso o médula ósea [39]. Sin embargo, el acceso a este fármaco se ve limitado, debido a que una sola dosis asciende a más de los \$36 000 para su tratamiento. En este sentido, existe una creciente preocupación sobre las muertes prematuras por cáncer asociadas a la falta de acceso de medicinas [40]. Según la OMS, en los países en vías de desarrollo unos 2 000 millones de personas carecen de acceso a medicamentos esenciales [41], siendo elemental la búsqueda de alternativas con mayor disponibilidad.

1.1.3. Compuestos bioactivos como alternativa a tratamientos actuales

Hasta la fecha, la investigación ha revelado que la naturaleza contiene increíbles fuentes de moléculas bioactivas de origen animal con propiedades terapéuticas [42]. Razones que impulsan el descubrimiento de nuevas moléculas asociadas al tratamiento de neuroblastoma [43]. Dentro de estas moléculas se encuentran; proteínas, enzimas, péptidos y toxinas aisladas del veneno de serpientes, escorpiones, ranas, abejas, con

potencial antitumoral, capaces de inducir la muerte de células tumorales por diferentes mecanismos [44].

Los venenos de animales son considerados una fuente poco explorada, pero rica en compuestos bioactivos diversificados con potencial farmacológico en la supresión del cáncer [45]. Un conjunto de ejemplos ilustran la aplicabilidad de estas moléculas bioactivas. La clorotoxina, aislada del veneno de escorpión *Leiurus quinquestriatus* ha sido utilizada en conjunto con células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T) para desarrollar terapia dirigida con anticuerpos monoclonales para el tipo más común de cáncer cerebral (glioblastoma) [45,46]. El péptido Polybia-MP1 aislado de la avispa *Polybia paulista* muestra una combinación sinérgica entre dos fosfolípidos de membrana que mejora la capacidad de encontrar células cancerígenas de leucemia, cáncer de próstata, cáncer de mama y glioblastoma [47,48]. También se determinó bioactividad en componentes peptídicos de la secreción de la rana *Agalychnis spurrelli* sobre la línea celular de cáncer de pulmón [49,50].

1.1.4. Veneno de serpientes

La investigación ha revelado la compleja composición proteica de los venenos de serpientes. Estos andamios están compuestos por moléculas capaces de interactuar con la membrana celular u otros blancos intracelulares, inhibiendo el desarrollo y el crecimiento de células tumorales [51]. En líneas generales, se detalla un ejemplo de proteína aislada de veneno de serpiente. La contortostatina (desintegrina) aislada de *Agkistrodon contortrix*, evita la adhesión celular e inhibe la interacción con los tejidos cercanos, lo que da como resultado una disminución de la movilidad y la capacidad de invadir a otros tejidos. Este tipo de desintegrinas pueden mimetizar el ligando natural de las integrinas, por lo que producir resistencia es poco probable [52]. Estas moléculas bioactivas muestran ventajas sobre los métodos tradicionales, a partir de recursos naturales, que impulsan el potencial uso de agentes biológicos en el desarrollo de medicamentos.

El uso del veneno de serpiente en el tratamiento de algunas enfermedades comenzó hace más de sesenta años en la medicina tradicional [53]. Su constitución es variable, desde el punto de vista estructural y de composición. Su base molecular es una mezcla de enzimas, péptidos, carbohidratos, minerales y proteínas [52]. Los mecanismos de acción más

conocidos de ciertos componentes del veneno son la inducción de apoptosis y la inhibición del desarrollo celular [54].

Los venenos de serpiente están conformados por grandes familias de péptidos, que se clasifican en componentes enzimáticos y no enzimáticos. En el primer grupo están las fosfolipasas A₂ (PLA₂), L-aminooxidasas (LAAO), serinproteasas (SVSP), metaloproteasas (SVMP), hialuronidasas, 5'-nucleotidasas y acetilcolinesterasas [55]. En el segundo grupo están las desintegrinas (DIS), toxina de tres dedos (3FTx), péptidos de Kunitz, proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSP), lectinas tipo C y péptidos natriuréticos (NP) [46,55].

1.2. Planteamiento del problema a investigar

Como se mencionó anteriormente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en niños y adolescentes. En los países desarrollados con acceso y servicios de salud integrales, el 80 % de los niños con cáncer se curan, mientras que, en los países en vías de desarrollo, se curan menos del 30 % [29]. El neuroblastoma es el cáncer sólido más común en los niños, donde 1 de cada 2 niños mueren a causa de esta patología, siendo este el cuarto cáncer más frecuente en niños con tratamientos que no conducen a la erradicación del tumor. En la actualidad, Ecuador pertenece al grupo de países con problemas de diagnóstico (debido a que suelen ser incorrectos o tardíos), tratamientos ineficientes, dificultades para acceder a la atención sanitaria, toxicidad y resistencia celular [32]. Esta situación ha promovido la búsqueda de alternativas a los tratamientos convencionales, al desarrollo de terapias combinadas (que aún mantienen efectos secundarios de alto riesgo) y los medicamentos de alto costo. Aunque existe una amplia información acerca de biomoléculas prometedoras anticancerígenas, no se ha logrado atraer la atención de la industria farmacéutica debido a que es necesario incrementar la eficiencia y comprobar la selectividad de la terapia derivada de recursos naturales [45]. Es importante destacar que, Ecuador carece de información estandarizada sobre la toxínología de biorecursos con potencial anticancerígeno de origen animal. Por lo tanto, es indispensable que en este país se empiece a desarrollar investigaciones del estudio de venenos principalmente porque es una de las naciones megadiversas del planeta.

1.3. Justificación de la investigación

Este estudio representa una contribución a la literatura científica sobre la especie *L. muta* de la región ecuatoriana debido a que hasta la actualidad no existe la caracterización de las toxinas más abundantes y su evaluación citotóxica sobre líneas celulares cancerígenas de ningún tipo. *L. muta* es una serpiente distribuida al este de los Andes de Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, norte y centro de Brasil [56]. En la región ecuatoriana ha sido reportada en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe [56] lo que facilita el acceso directo para su investigación. La caracterización de los componentes de este veneno y sus efectos en células tumorales representan el punto de partida para el conocimiento y desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento basados en la biodiversidad molecular de un veneno proveniente de una especie ecuatoriana. Es decir, esta investigación sería el primer estudio de *L. muta* de Ecuador dirigido a la interpretación y análisis de la citotoxicidad de las fracciones del veneno sobre SH-SY5Y. Los resultados supondrían un aporte significativo en el campo farmacéutico para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas con potencial antitumoral con una mayor especificidad para el diseño de terapias modernas para el neuroblastoma.

1.4. Objetivos de Investigación

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica del veneno crudo *L. muta* y de los componentes proteicos más abundantes sobre la línea celular de neuroblastoma y eritrocitos humanos.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Identificar la actividad citotóxica del veneno crudo de la especie *L. muta* sobre SH-SY5Y y eritrocitos humanos

- Purificar las toxinas más abundantes del veneno y evaluar su actividad citotóxica mediante ensayos *in-vitro*

- Caracterizar la identidad molecular mediante la actividad enzimática del veneno y de los componentes más abundantes

2. CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Veneno

Las muestras del veneno de *L. muta* fueron obtenidas en el cantón Mera, provincia de Pastaza bajo los permisos de investigación del MAE, MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115. Esta etapa se desarrolló en colaboración y empleando la metodología de Salazar-Valenzuela de la Universidad Indoamérica [57]. El procedimiento se basó en la captura del individuo en un tubo telescópico para inmovilizar y efectuar la mordida de la serpiente en un vaso de precipitación cubierto con Parafilm®. El veneno después de su colecta fue liofilizado a -83°C usando el equipo BenchTop Pro con Omnitronics de 9 litros, aproximadamente a 100 mTorr durante 3 días y almacenado a -20°C para su posterior uso.

2.2. Métodos

2.2.1. Evaluación citotóxica del veneno

2.2.1.1. Descongelamiento y cultivo de línea celular

Se empleó la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266). Las células fueron descongeladas empleando la metodología de Martínez Chacón [58], con algunas modificaciones. El vial con la línea celular estaba congelado con DMSO, por esta razón, se bajó la temperatura de forma gradual, para así mantener la viabilidad celular. Se trasvasó y se centrifugó en un tubo cónico de 15 mL a 2 000 rpm durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1mL de medio RPMI suplementado con 15 % de suero fetal bovino (FBS) (Sigma), 1 mM piruvato sódico, 1 % penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), 20 % de HEPES 1M y 1 % de L-glutamina (Lonza) [59]. El pH del medio suplementado fue regulado a 7,4 y después fue filtrado con un filtro de jeringa estéril de tamaño de poro 0,22 µm. El medio suplementado se almacenó a 4°C y se mantuvo a 37°C en baño maría (PolyScience) previo a su uso. Las células se cultivaron en un frasco de 75cm² con 15 mL del medio suplementado, las condiciones de cultivo se mantuvieron en 37°C con 5 % CO₂ y 95 % de humedad para todas las secciones

(Thermo Scientific, serie forma 3).

2.2.1.2. Mantenimiento y replique de la línea celular.

Para mantener la línea celular viable se registró diariamente la confluencia y el estado del medio bajo el microscopio invertido. El cambio de medio se estandarizó a 4 veces a la semana y los repliques se realizaron a una confluencia de un 70 % aproximadamente. El medio contenido en los frascos de 75 cm² listos para replique se trasvasaron a un tubo cónico de 15 mL para centrifugar a 1 500 rpm por 10 min a 37°C, a fin de recuperar las células en suspensión. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el contenido en 5 mL de suero suplementado, posterior a esto se homogenizó y se trasvasó en un frasco estéril de 75 cm² para cultivo. Por otro lado, se realizó 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS) (37°C) 1x al frasco contenido de células adheridas, a fin de evitar la inactivación de la Tripsina por el suero. Después de descartar el PBS se añadió 300 µL de Tripsina-EDTA 0,25 % (1x) (Sigma) a 37°C dejando que actúe durante 3 min aproximadamente. Seguido a esto se añadió 25 mL de medio suplementado en el frasco; se homogenizó y se trasvasó 10 mL al frasco contenido de los 5mL de células en suspensión preservado inicialmente. Obteniendo así dos frascos de cultivo por replique con 15 mL de medio suplementado y células SHSY-5Y. Las condiciones de cultivo son las mismas para todo el proceso.

2.2.1.3. Cosecha de las células

Las células se cosecharon con una confluencia del 70 % para los ensayos de viabilidad celular. Primero se trasvasaron los medios de los frascos 75 cm² a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 1 500 rpm, 37°C por 5 min. El sobrenadante de cada tubo fue descartado y el precipitado fue resuspendido en 5 mL de medio suplementado. Después las células resuspendidas se trasvasaron a un tubo de 50 mL. Una vez realizado, se colocaron las células a baja temperatura para evitar que se adhieran a las paredes del tubo. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionaron 300 µL tripsina en cada frasco con células adheridas y sin medio, como se describió anteriormente en la metodología para un replique. Posterior a esto se utilizó un raspador celular para recoger cuidadosamente la mayor cantidad de células. Esta etapa, se realizó, sin levantar el raspador, desde el fondo hacia la abertura del frasco, se resuspendieron las células de cada frasco en 5 mL de medio

suplementado y se trasvasaron en el tubo de 50 mL ubicado en el bloque frío.

2.2.1.4. *Conteo celular*

El conteo celular se realizó en una cámara de contaje Neubauer, la cual es una placa de vidrio óptico con dimensiones 30x70 mm y un espesor de 4 mm. Compuesto por tres divisiones que conforman un total de 400 cuadros microscópicos. Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y se añadió 10 µL por lado del contenido del tubo de 50 mL ubicado en el bloque frío, en ambos extremos de la cámara. Una vez realizado esto se cuantificó en el microscopio óptico y se determinó la concentración de células por mL, basado en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = (\text{número de células contadas})(\text{factor de dilución})\left(\frac{1}{\text{factor de volumen}}\right)$$

2.2.1.5. *Incubación de veneno, MTT y SDS*

Se preparó una microplaca de 96 pocillos con 130 µL por pocillo de células SH-SY5Y a una concentración de $3,4 \times 10^5$ células/mL en 17 mL de medio suplementado. Se estabilizó la temperatura de las células durante 3 h, antes de agregar la muestra de veneno. El veneno crudo de *L. muta* se disolvió en 1 mL de PBS 1x teniendo una concentración de 1mg/mL. Se incubó el veneno en los pocillos a concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL, a excepción de los pocillos para el control positivo (doxorubicina 50 mM) y el control negativo contenido de las células y PBS 1x. Las muestras en cada pocillo fueron realizadas por triplicado. Posterior a esto, el veneno crudo y las células se incubaron durante 24 h en las condiciones mencionadas anteriormente. Después de las 24 h se preparó una solución de 500 µg/mL de MTT y se agregaron 30 µL MTT a cada pocillo y se dejó incubar por 3 h. Al observar la precipitación de color morado, correspondiente a los cristales de formazan se agregaron 10 µL SDS 20 % en cada pocillo de la placa, previa la lectura espectrofotométrica. El lector de microplacas utilizado fue Glomax DS, Promega a 600 nm, 37°C y agitación [60].

2.2.1.6. Ensayos hemolíticos

En este apartado se utilizaron eritrocitos de un donador sano. Se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 4 % utilizando 2 mL de sangre humana tipo O Rh+ en 50 mL de PBS 1x autoclavado. Se realizaron 3 lavados con PBS respectivamente. Después de cada lavado, las células se centrifugaron a 1 000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante, de acuerdo con la metodología de Proaño [61], con ciertas modificaciones. Se prepararon diluciones del veneno crudo para obtener las concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL. El control negativo fue 200 µL de los eritrocitos 4 %, y 200 µL de PBS 1x. Al control positivo se le añadieron 5 µL de Triton X-100 (2 % v:v) más los eritrocitos y PBS. Para analizarlas se usó un lector de microplacas (Glomax DS, Promega) a 570 nm. Se consideró el control positivo como el 100 % de la hemólisis y se utilizó el control negativo para calcular el porcentaje de hemólisis de las muestras, basado en la siguiente fórmula:

$$\%H = \left(\frac{D0 - D0_0}{D0_x - D0_0} \right) * 100$$

Donde;

$D0$: Corresponde al valor de la densidad óptica de la concentración de las fracciones y el veneno crudo

$D0_0$: Densidad óptica del control (-)

$D0_x$: Densidad óptica del control (+)

2.2.2. Purificación y evaluación citotóxica de las fracciones más abundantes de *L. muta*

2.2.2.1. Fraccionamiento del veneno crudo *L. muta* por RP-HPLC

La separación bioquímica de los componentes moleculares contenidos en el veneno de *L. muta*, se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).

Primero se disolvieron 3 mg de veneno liofilizado en 200 μ l del buffer de muestra, compuesto por ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05 % (v:v) + 5 % de acetonitrilo (ACN) y 94,95 % de agua, la mezcla se homogenizó usando vórtex. La muestra fue centrifugada a 2 000 rpm por 10 min y 190 μ L del sobrenadante fueron inyectados en la columna de HPLC Discovery Bio Wide Pore C18 (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μ m) utilizando un HPLC-PDA 991 (Waters), equipado con dos bombas Waters Modelo 510 /B, una muestra de inyector automático UK6 y detector 2998 de detección de matriz de fotodiodo. La elución de las proteínas se monitoreó a 214 nm bajo un flujo constante de 1 mL/min usando un gradiente lineal de 0 a 100 % de solvente A (Agua 99,9 % (v:v) + TFA 0,1 % (v:v)) y solvente B (acetonitrilo 99,9 % (v:v) + TFA 0,1 % (v:v)), durante 100 min [62]. Las fracciones obtenidas de la elución se recolectaron manualmente, en tubos de 1,5 mL, con un tiempo muerto de 40 s. Este proceso se realizó en 36 ocasiones, a fin de unir las fracciones y así obtener la cantidad de muestra adecuada para su posterior análisis funcional.

2.2.2.2. Liofilización y almacenamiento de las fracciones *L. muta*

La liofilización fue realizada en tubos cónicos para centrifuga de 15 mL. Los tubos contenidos de las fracciones *L. muta* se mantuvieron por 24 h en el ultra-congelador (-80°C) y 15 min en nitrógeno líquido, previo a la liofilización. Los tubos fueron tapados con Parafilm haciendo pequeños agujeros con una punta esterilizada, finalmente se ingresaron al liofilizador, de la marca BenchTop Pro con Omnitronics de 9 litros, a -83°C a una presión de 100 mTorr, aproximadamente. Los tubos fueron dejados en el equipo durante 4 a 5 días y posteriormente a ello se almacenaron a -20°C para usarlos más adelante en los ensayos.

2.2.2.3. Cromatografía de las fracciones

Para corroborar la pureza de los componentes aislados de *L. muta* se utilizó el protocolo descrito en la sección 2.2.2.1, correspondiente al fraccionamiento del veneno crudo, con algunas modificaciones. Se utilizó 1 mg de la muestra liofilizada en 100 μ L de buffer de muestra. Después de la centrifugación se recuperó 90 μ L del sobrenadante para la inyección, considerando, la misma columna, gradiente y condiciones del método 2.2.2.1.

2.2.2.4. Electroforesis SDS -PAGE

La separación por electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) se realizó en una cámara de electroforesis vertical BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra en condiciones reductoras. Inicialmente, se disolvió en un tubo de 1,5 mL, 0,1 mg de las fracciones liofilizadas de veneno y 50 µL de tampón de carga compuesto de Tris-HCl 0,075 M, glicerol al 10 % (v:v), SDS al 4 % (p:v), azul de bromofenol al 0,001 % (p:v) en proporción 1:1 y 5 µL de 1,4-ditiotreitol (DTT) a pH de 6,8. Posterior a esto, las fracciones de veneno se mantuvieron a 95°C durante 5 min previo a su uso. Por otro lado, las placas de poliacrilamida para la corrida electroforética se prepararon de manera discontinua. Primero se construyó un gel de apilamiento compuesta de bis-acrilamida 5 % (30:0,8), Tris-HCl 0,06 M, SDS 0,1 % (m:v), persulfato de amonio 0,15 % (m:v), TEMED 0,02 % (v:v) a pH 6,8 y un gel de corrida compuesta de bis-acrilamida 12 % (30:0,8), Tris-HCl 0,5 M, SDS 4 % (m:v), persulfato de amonio 0,05 % (m:v), TEMED 0,35 % (v:v) a pH 8,8 de acuerdo a la metodología usada en el trabajo de Almeida y colaboradores [62]. El gel de corrida se sobre el gel de apilamiento después de 15 min, junto al peine para formar los pocillos del gel. Luego se colocó 4 µL del marcador de peso molecular preteñido RunBlue Tricolor (Novus biologicals a biotechne brand) en el primer pocillo del gel, a fin de estimar las masas moleculares de las toxinas. Después de esto se colocaron 15 µL de las fracciones de veneno en los pocillos restantes del gel. Las condiciones a las que se mantuvo la corrida electroforética fueron temperatura ambiente y un voltaje de 80 mA a 100 mA durante 6h aproximadamente. Posterior a esto se ubicó los geles en un proceso de tinción, con azul Comassie Blue brillante R-250 0,2 %, durante 24 h. Luego de la tinción se eliminó el exceso de tinte con una solución de ácido acético 7 % y metanol 40 %, durante 3 h. Finalmente se digitalizó las imágenes de los geles y sus bandas para su posterior análisis.

2.2.2.5. Evaluación del potencial citotóxico de las toxinas más abundantes

La evaluación citotóxica de las fracciones *L. muta* de mayor abundancia, previamente liofilizadas (2.2.2.2) fue realizada en base a la metodología descrita en la sección 2.2.1, correspondiente al análisis de actividad citotóxica del veneno crudo. Considerando las mismas condiciones de cultivo y 1mg de fracción liofilizada.

2.2.2.6. Actividad hemolítica de las toxinas más abundantes

El porcentaje hemolítico de las fracciones *L. muta* de mayor abundancia, previamente liofilizadas (2.2.2.2) fue realizada en base a la metodología descrita en la sección 2.2.1.6 correspondiente a la actividad hemolítica del veneno crudo *L. muta*, a partir 1mg de las fracciones liofilizadas para la preparación de disoluciones en las mismas concentraciones.

2.2.3. Identidad molecular de las fracciones más abundantes de *L. muta*

La actividad enzimática se realizó basada en la metodología de Almeida y colaboradores [62]. Inicialmente se realizaron ensayos independientes con diferentes sustratos cromogénicos, N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (L-BapNa) para la actividad serinproteasa, azocaseína para la actividad caseinolítica, L-metionina para la actividad L-amino oxidasa y Ácido 4-nitro-3 [octanoiloxi] benzoico (NOBA) para la actividad fosfolipasa, metodologías descritas en la sección posterior. Previo al análisis de las fracciones más abundantes se realizó la evaluación del veneno crudo para los cuatros sustratos cromogénicos usando la misma metodología. Después del tratamiento independiente para cada sustrato se midió la actividad haciendo uso del lector de microplacas multipocillo (Glomax Discover System, Promega). Finalmente, los ensayos fueron expresados como actividades específicas de la media \pm desviación estándar. La actividad específica para cada ensayo se expresó de acuerdo con la metodología de Patiño e Isobe [63,64] seguido del uso del software GraphPad Prism 9.

2.2.3.1. Actividad caseinolítica

La evaluación de la actividad caseinolítica del veneno crudo y de las fracciones más abundantes se realizó preparando 11 mg de azocaseína (Sigma-Aldrich) disueltos en 2 200 μ L de buffer B (Tris HCl 10 mM, CaCl_2 1 M y NaCl 10 mM a pH de 7,8) usando la metodología de Almeida y colaboradores [62]. Después se pesaron 100 μ g de las fracciones y se disolvieron en 100 μ L de buffer B, manteniendo una concentración de 1 mg/mL. Luego se prepararon tubos de 1,5 mL con 90 μ L de azocaseína y 10 μ L de la fracción de veneno, manteniéndolos a una temperatura de 37°C por 90 min. Posterior a esto, se añadieron 200

μL de TCA (ácido tricloroacético) 5 % y se centrifugaron a 8 000 rpm durante 5 min. Después, se transfirieron 150 μL de sobrenadante a una microplaca de 96 pocillos y se añadieron 150 μL de NaOH 0,5 M. Las condiciones para el lector de placas fueron usando una longitud de onda de 440 nm, con ensayos en triplicado. El control negativo fue preparado a partir de 10 μl de buffer B y 90 μL de solución sustrato caseinolítica. Finalmente, los resultados a partir de la lectura de la microplaca fueron expresados en U/min/mg.

2.2.3.2. Actividad serinproteasa

La evaluación de la actividad serinproteasa (SVSP) del veneno crudo y de las fracciones más abundantes se realizó preparando 1,0436 mg de BapNa (Sigma-Aldrich) disueltos en 2 376 μl de buffer B (TrisHCl 10 mM, CaCl₂ 1 M, NaCl 10 mM a pH de 7,8) y 24 μL de DMSO (solución sustrato). Posterior a esto, se preparó una microplaca de 96 pocillos con 50 μL de buffer B y 20 μL de las fracciones de veneno *L. muta* y 200 μL de solución sustrato para su posterior lectura (410 nm a 37°C cada 10 min hasta los 30 min de incubación). El control negativo fue preparado a partir de 70 μL de buffer B y 200 μl de solución sustrato. Finalmente, los resultados a partir de la lectura de la microplaca fueron expresados en nm/min/mg.

2.2.3.3. Actividad L-amino oxidasa

La evaluación de la actividad LAAO del veneno crudo y de las fracciones más abundantes se realizó en base a la metodología descrita por Kishimoto [65], con modificaciones. Inicialmente, se utilizó 1 mL de L-metionina para la solución sustrato (Tris-HCl 50 mM, L-metionina 5 mM, 4,5-dicloro-o-fenilendimina 2 mM) a pH 8,0. Luego, las fracciones liofilizadas fueron disueltas en Tris-HCl 5 mM en una concentración de 1 mg/mL. Después, se prepararon 10 μL de una solución de peroxidasa 0,8 U/mL, 20 μL de la muestra de las fracciones y 90 μL de solución sustrato, directamente en una microplaca de 96 pocillos. Se incubaron las muestras durante 1 h a 37°C, posterior a esto se añadieron 50 μL de H₂SO₄ 2M y se procedió a la lectura espectrofotométrica. La absorbancia se midió a 490 nm y la actividad específica se expresó en U/mg de proteína [64]. El control negativo fue preparado a partir de 20 μL de agua destilada, 90 μL de sustrato y 10 μL de peroxidasa.

2.2.3.4. Actividad Fosfolipasa

La evaluación de la actividad fosfolipasa del veneno crudo y de las fracciones más abundantes se realizó preparando 1,023 mg de NOBA disueltos en 330 μL de acetonitrilo y 3 660 μL buffer B (Tris HCl 10 mM, CaCl_2 1 M, NaCl 10 mM a pH de 7,8). Para este ensayo se prepararon 220 μL de solución sustrato y 20 μL de las muestras de fracciones *L. muta* en una microplaca de 96 pocillos. Luego se incubaron en el lector de placas a 37°C haciendo lecturas durante 30 min. Las lecturas se realizaron midiendo a una longitud de onda de 440 nm. El control negativo fue preparado a partir de 20 μL de buffer B y 220 μL de solución sustrato. Los resultados fueron expresados en nmol/min/mg.

2.2.3.5. Masa intacta de las fracciones más abundantes *L. muta*

La determinación de la masa intacta de las fracciones más abundantes del veneno *L.muta*, se realizó haciendo uso de espectrometría de masas por ionización electrospray (ESI) a partir de una columna UPLC C-18 (phenomenex C-18; 4,6 x150 mm) del sistema acoplado UPLC Xevo G2-XS-QTOF de la marca Waters. Inicialmente, se disolvieron 100 μg de las fracciones en 20 μL de agua con 0,1 % de ácido fórmico [66]. Luego se inyectaron 3 μL en el espectrómetro de masas mediante la técnica de cuadrupolo. La elución del cromatograma se monitoreó en un rango espectral de 500 a 1900 m/z, se trabajó a un flujo de 0,6 $\mu\text{L}/\text{min}$ con una presión de 1500 psi. Todos los espectros fueron obtenidos en modo de ion positivo y el análisis se realizó en una rampa de colisión de alta energía de 20 a 40 V. Los cálculos de masa intacta se realizaron siguiendo la metodología de Munuera [66], dada en la siguiente formula:

$$M_1 = M_2$$

Donde M es igual a:

$$M = (m/z) * z - z$$

Donde (m/z) corresponde a la relación masa-carga de la muestra y z la carga del mismo.

2.2.3.6. Digestión de bandas

La digestión de las bandas obtenidas por electroforesis SDS-PAGE se realizó a partir de la metodología de Lomonte con modificaciones [67]. Inicialmente se recortó las bandas del gel y se realizaron procesos continuos de decoloración, hidratación y deshidratación para las bandas. Inicialmente se ubicaron los cortes de las bandas en tubos de 1,5 mL añadiendo 50 μ L de solución de bicarbonato de amonio (AMBIC) 100 nM y ACN (1:1) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Luego del tiempo estimado, se descartaron las soluciones de los geles y se agregaron 50 μ L de ACN durante 15 min a TA. Posterior a este proceso se descartaron las soluciones de los tubos y se colocaron los geles en la centrifuga al vacío (45°C) durante 15 min. En el proceso de rehidratación se utilizaron 50 μ L de DTT y se incubaron las muestras durante 30 min a 56°C. Previo al uso de la centrifuga al vacío (45°C) por 15 min se descartó el DTT y se agregaron 50 μ L de ACN por 5 min a TA. Después de este proceso se enjuagaron las muestras con AMBIC a TA. Luego se secaron las muestras durante 15 min en la centrifuga al vacío (45°C) previo a la adicción de ACN y su descarte. Al final de esta sección se agregaron 30 μ l de tripsina (4°C) durante 15 min, posterior a este tiempo se agregaron 10 μ l de AMBIC y se dejaron las muestras incubando durante 24 h a 37°C.

La extracción de los componentes de interés, después de las 24 h inició centrifugando las muestras durante 15 seg a 12 000 rpm. Después se recolectaron los sobrenadantes y se trasvasaron a tubos de 1,5 mL y se almacenaron para su posterior uso. Finalmente, se agregaron 30 μ l de ACN 60 % con ácido fórmico 1 % a los tubos contenidos de las bandas y se sonicaron durante 10 min a 37°C antes de su centrifugación a 12 000 rpm por 15 segundos. Luego se juntaron los sobrenadantes a los tubos previamente almacenados y se concentraron las muestras en la centrifuga al vacío (45°C) de 20 a 40 min. Después de este tiempo se agregaron 20 μ L de agua con 0,1 % de AF a los tubos con las muestras concentradas. Posterior a esto se transfirieron las muestras a viales mantenidos a 4-8°C hasta su inyección en LC-ESI-TOF.

El análisis de las bandas se analizó en el software MASCOT DESTILLER 2,7 [68], haciendo uso de la base de datos Swiss-Prot y una base de datos nueva con secuencias del género *Lachesis* descargados en UniProt [69]. La tolerancia considerada fue 0,15 Da.

Carbamidometil cisteína y la oxidación de metionina se utilizaron como modificaciones fijas y variables en la búsqueda.

2.2.3.7. Análisis estadístico

Para el tratamiento de datos se realizó un análisis de varianza unilateral (ANOVA) complementado con una prueba posterior de comparaciones múltiples (Tukey). Se utilizó un intervalo de confianza del 95 %, $p \leq 0,05$ para la significancia. Para el análisis y las gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism 9 [70].

3. CAPÍTULO III. PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Evaluación de la actividad citotóxica del veneno

Los primeros indicios de la reducción de viabilidad celular de SH-SY5Y fueron visibles desde la concentración más baja, por micrografía (Figura 1-10 parte A). Los cambios morfológicos observados fueron encogimiento, desprendimiento y redondeo en la línea celular SH-SY5Y expuestas con el veneno *L. muta*. Se observaron células intactas (morfología normal) en el grupo control, mientras que en las muestras tratadas (25 a 300 µg/mL) se observó el cambio de morfologías alargadas y adheridas a formas circulares con gránulos dispersos en la zona de visualización. El control positivo (Doxorrubicin) generó agrupamientos, encogimiento y presencia de agregados celulares. El porcentaje de viabilidad en las concentraciones bajas (25, 50 y 100 µg/mL) disminuyó de 82 % a 74 % y en las concentraciones altas (200y 300 µg/mL) disminuyó de 66 % a 56 %. El análisis ANOVA y la prueba complementaria Tukey mostraron una diferencia significativa de $** P < 0,01$ en las concentraciones más altas respecto al control (Figura 1B). Los resultados indican un efecto citotóxico significativo en concentraciones bajas y altas del veneno.

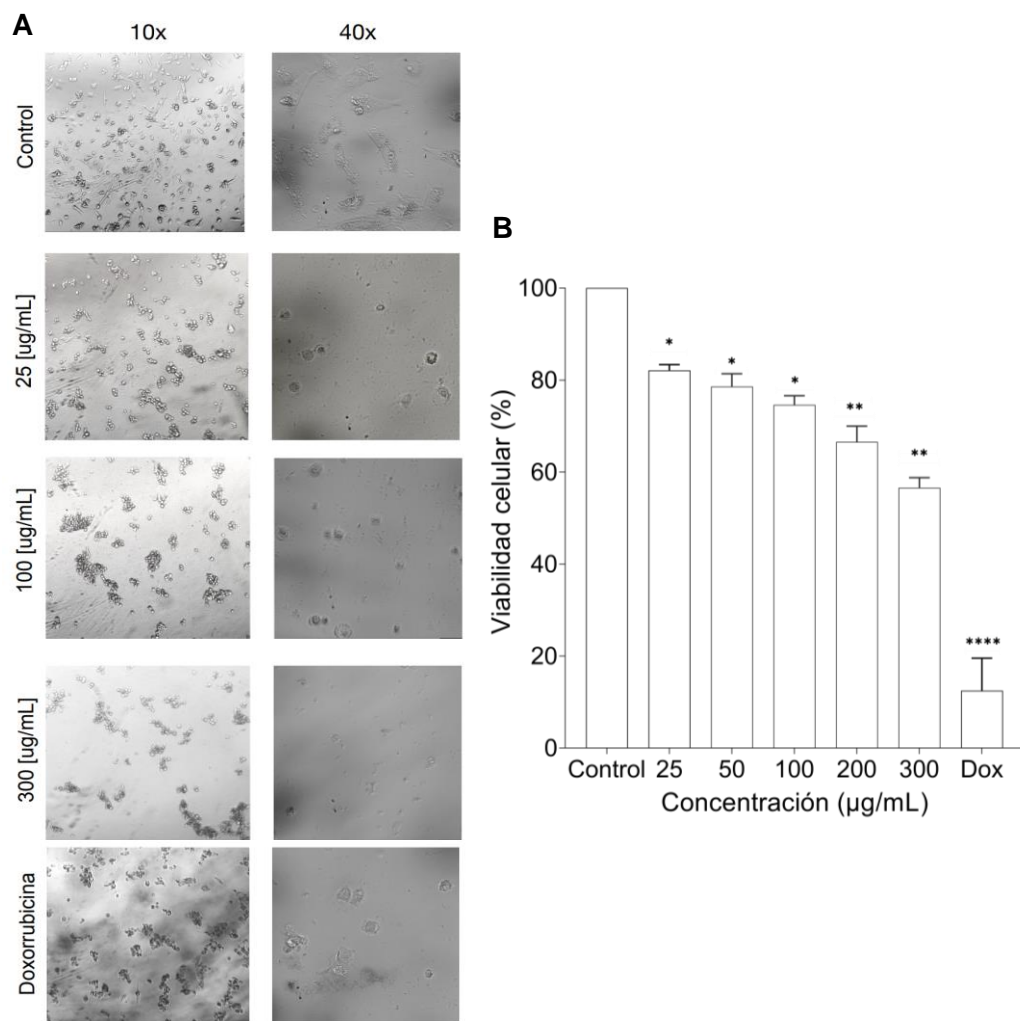


Figura 1-10: Efecto del veneno de *L. muta* sobre los cambios morfológicos y el desprendimiento celular en SH-SY5Y.

Micrografía de luz (10X y 40x) de la línea celular SH-SY5Y durante 24 h de exposición con 25, 100, 300 µg/mL de veneno. El control negativo muestra un cultivo a las 24 h sin veneno. El agente de control positivo fue doxorubicina 50 nM (A). Gráfico de viabilidad celular para SH-SY5Y haciendo uso de ANOVA unidireccional con la prueba post de Tukey para determinar la significancia estadística en SH-SY5Y * P < 0,05 y ** P < 0,01 y **** P < 0,0001 (B).

En el ensayo de hemólisis, se pudo observar que después de 1 h de incubación con el veneno de *L. muta*, se produce un bajo porcentaje (3,49 %) de hemólisis en concentración 25 µg/mL (Figura 2-10). Por tanto, la muestra no presentó la capacidad de lisar la

membrana de eritrocitos. Asimismo, con el aumento de la concentración, el porcentaje de hemólisis no incrementó significativamente, debido que indujo 4,43 % de hemólisis en 300 µg/mL. La prueba Tukey evidenció una diferencia estadística significativa para todas las concentraciones en comparación al grupo control tritón. No obstante, para los tratamientos de las concentraciones sin contar el control, no existe diferencias estadísticas.

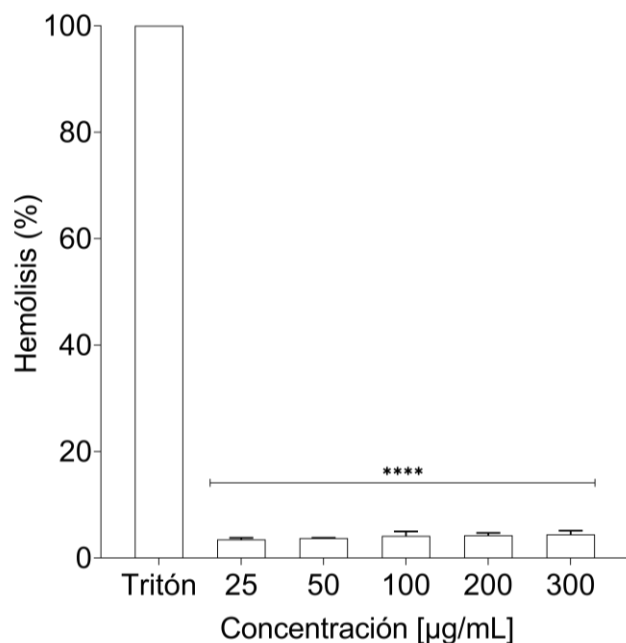


Figura 2-10: Efecto hemolítico de *L. muta* sobre eritrocitos humanos.

Gráfica del porcentaje hemolítico del veneno crudo de *L. muta* para concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL. El control positivo usado fue el detergente (Triton X-100). Se usó ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey para determinar si existe significancia estadística y en cuales grupos del tratamiento se evidencia (**** indica $p < 0,0001$).

3.2. Perfil bioquímico de *L. muta*

La separación bioquímica del veneno crudo de *L. muta* en un sistema RP-HPLC (columna C18) resultó en veintisiete fracciones que eluyeron en 100 min (Figura 3-10). Las toxinas se recolectaron considerando la absorbancia y el tiempo de retención. Se presentaron 6 toxinas con mayor absorbancia desde el minuto 18 (F5), 47 (F12), 63 y 83 (F24, F25 y F26). Se realizaron 36 corridas cromatográficas recolectando cada fracción en los 100 minutos

de elución. Aunque la fracción 5 y 12 presentaron alta absorbancia tras la liofilización no se obtuvo cantidad suficiente de estas toxinas para su posterior análisis. Por lo contrario, las fracciones 16, 24, 25 y 26 obtuvieron mayor cantidad de material (Tabla 1-1).

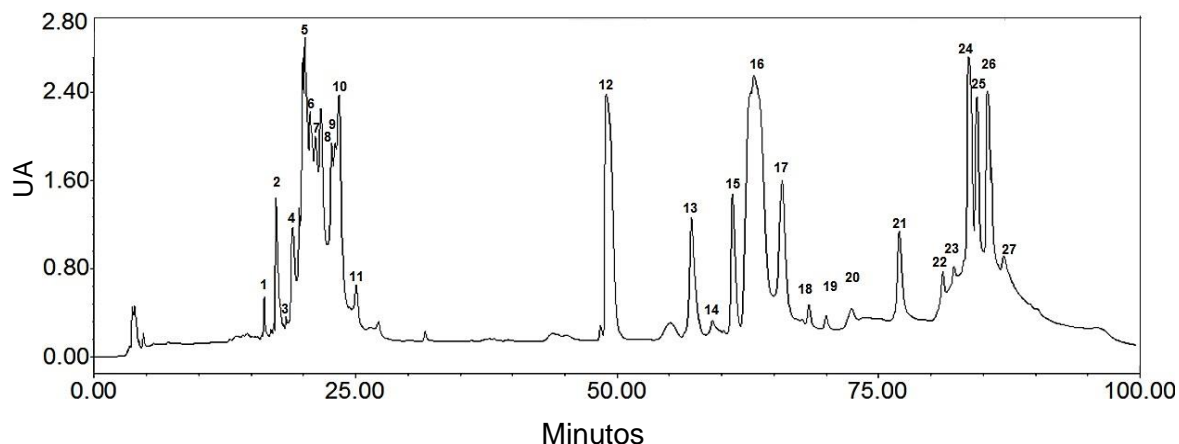


Figura 3-10: Perfil de elución del veneno crudo de la serpiente *L. muta* mediante RP-HPLC en columna C18 Discovery Bio Wide Pore.

Perfil cromatográfico monitoreado a 214 nm del veneno de *L. muta* con 27 fracciones que eluyeron durante 100 minutos.

La Tabla 1-1 recopila datos de las toxinas mayoritarias purificadas, incluyendo el tiempo de retención, el área bajo la curva, y la cantidad liofilizada. El peso obtenido de las fracciones fueron 13,7 mg para F16, 6,2 mg para F24, 3,9 mg para F25 y 2,4 mg para F26.

Tabla 1-1: Área y cantidad de las fracciones liofilizada más abundantes de *L. muta*.

| Fracción | Tiempo de retención (min) | Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) | Peso liofilizado (mg) |
|---------------|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 16 | 63,078 | 208053530 | 13,7 |
| 24 | 83,35 | 49679207 | 6,2 |
| 25 | 84,150 | 22212648 | 3,9 |
| 26 | 85,15 | 52224020 | 2,4 |
| Total: | | | 26,2 |

Realizado por: Rosales, Carolyn, 2022

Se utilizaron 108 mg de veneno crudo de *L. muta*, de los cuales se pudo liofilizar un total de 26,2 mg de fracciones purificadas. La abundancia relativa (%) se obtuvo a partir de la integral del área bajo la curva (Figura 4-10), evidenciando que las cuatro fracciones con mayores valores de absorbancia y muestra liofilizada representa para F16 el 30 % de las toxinas del veneno, seguido de un 7 % para F24, un 4 % para F25 y 7 % para F26.

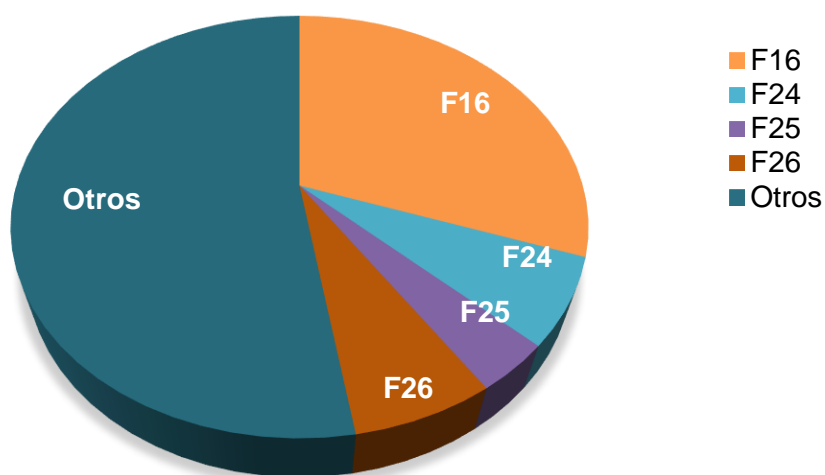


Figura 4-10: Abundancia relativa (%) de las fracciones purificadas más abundantes del veneno *L. muta*

Se observa los porcentajes de abundancia de las fracciones 16 (naranja), 24 (celeste), 25 (violeta) y 26 (marrón) que fueron purificadas por RP-HPLC dentro del veneno *L. muta*.

La electroforesis en gel de poliacrilamida proporcionó información sobre la pureza de las fracciones de veneno (Figura 5-10). La fracción F16 se acerca a 31 kDa, con una banda ligeramente teñida de 11 kDa. F24 y F25 muestra bandas únicas de 24 kDa. F26 presentó bandas de 42 a 57 kDa y una banda en 24 kDa, correspondiente a la fracción que le antecede. Los resultados evidencian la presencia de familia de proteínas correspondientes SVSP, PLA₂ para la fracción 16, metaloproteasas tipo 1 (PI-SVMP) para la fracción 24 y 25 y metaloproteasas tipo 3 (PIII-SVMP) o LAAOs para la fracción 26, basado en los pesos moleculares registrados.

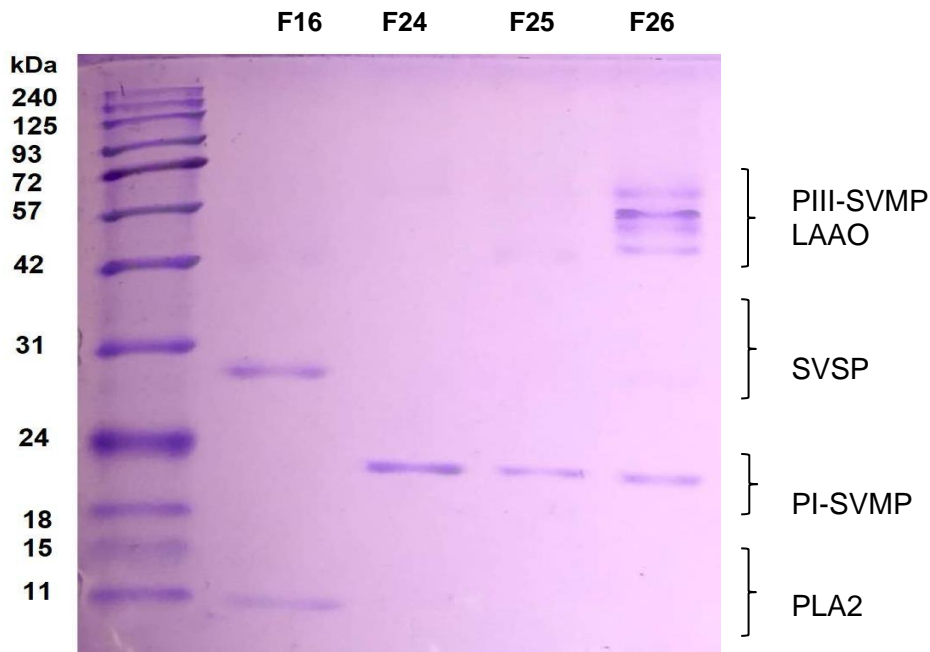


Figura 5-10. Electroforesis por SDS PAGE de las fracciones obtenidas por RP-HPLC.

Las corridas electroforéticas se realizaron para las fracciones 16, 24, 25 y 26 en condiciones reductoras, a la izquierda de los geles se muestra los marcadores de peso molecular en kilodaltons (kDa).

3.3. Cromatografía por RP-HPLC de las principales fracciones del veneno *L. muta*

La homogeneidad proteica de F16, F24, F25 y F26 en un sistema RP-HPLC (columna C18) con gradiente lineal, mostró un único pico en cada cromatograma (Figura 6-10). La recromatografía de la fracción 16, mostró un 85,27 % de pureza, debido a la presencia de dos picos en su tiempo de retención, esta fracción se recolectó junta debido a que, en la purificación del veneno crudo, se visualizó como un solo pico cromatográfico. Para comprobar esto, se separó los picos en la recromatografía y se analizó por SDS-PAGE, observando que ambos tuvieron el mismo peso molecular en kDa (Figura 6-10 parte A). Para la fracción 24 se obtuvo una pureza del 96,2 % (Figura 6-10 parte B); seguido de la fracción 25 con un 95,65 % (Figura 6-10 parte C). La fracción 26 en el gel de electroforesis mostró más de una banda, a razón de esto tuvo un 93,25 % de grado de pureza, hecho que se puede observar (Figura 6-10 parte D), donde el pico cromatográfico no fue separado correctamente al final de la elusión, recolectando parte de la fracción 25 del veneno.

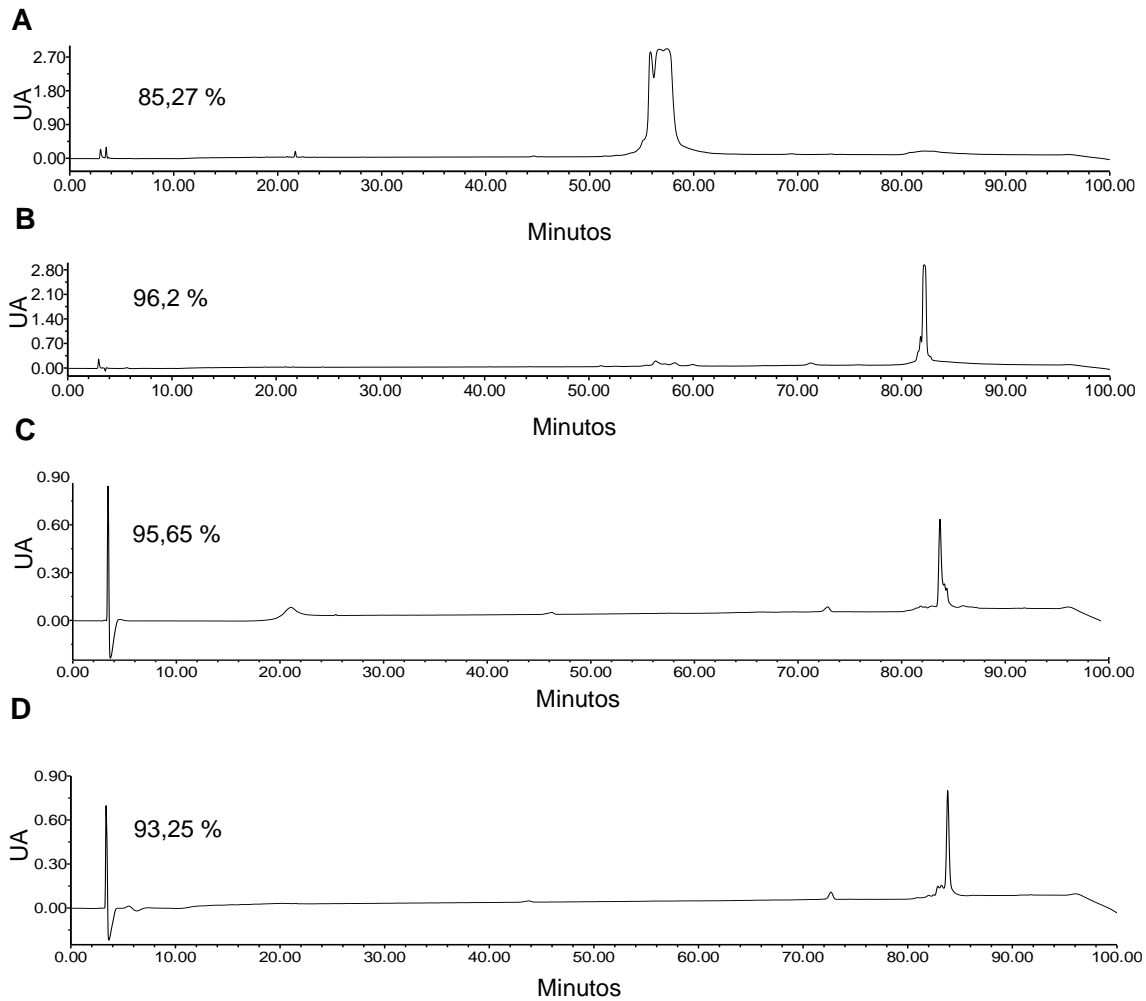


Figura 6-10: Cromatografía de las cuatro fracciones obtenidas por RP-HPLC con mayor absorbancia.

Toxinas aisladas del veneno *L. muta* con sus correspondientes porcentajes de pureza: F16 con 85,37 % (A), F24 con 96,2 % (B), F25 con 95,65 % (C) y F26 con 93,2 % (D).

A partir de la purificación de las proteínas se evaluó el efecto de cada una de las fracciones sobre la línea celular cancerígena SH-SY5Y (Figura 7-10). La línea celular para neuroblastoma mostró 84 % de inhibición de la viabilidad celular en la dosis más alta para la fracción 16 (A), SH-SY5Y no mostró actividad para la fracción 24 y 25 (resultados no mostrados). Asimismo, se evidenció una inhibición de 56 % de la viabilidad celular en la fracción 26 (B) de *L. muta*. En el análisis estadístico se evidenció una diferencia significativa de * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ en las concentraciones más altas respecto al control. Los

resultados indican un efecto citotóxico significativo para las fracciones 16 y 26.

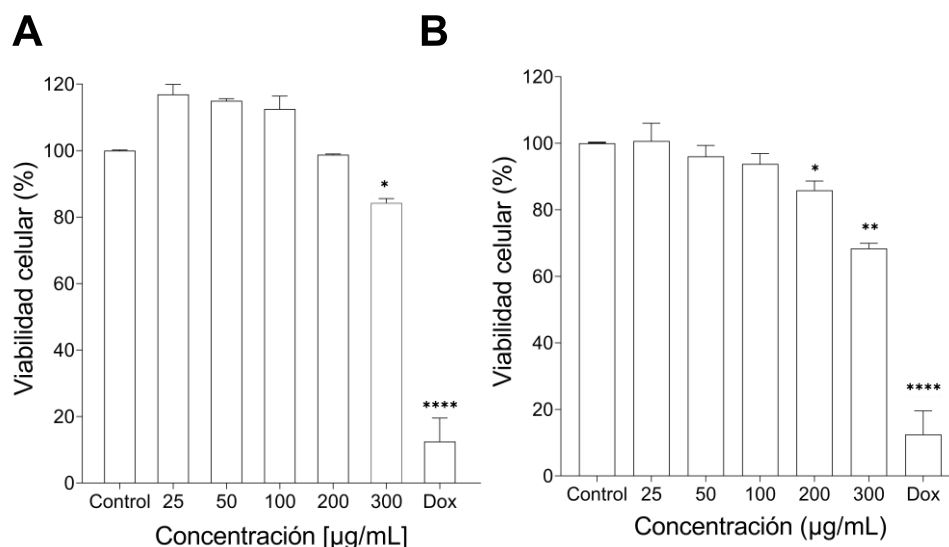


Figura 7-10: Efecto citotóxico de las fracciones del veneno *L. muta* sobre SHSY5Y.

Actividad citotóxica de las fracciones de *L. muta*. La línea celular SH-SY5Y fue incubada durante 24 h con las fracciones de veneno 16 (A), 26 (B). Finalizado el tiempo de incubación se determinó la viabilidad celular con MTT, frente al control negativo (PBS).

El daño a los glóbulos rojos por el detergente aniónico (Tritón) usado como control positivo se consideró como máxima respuesta (100 %) y referencia para el cálculo de la actividad hemolítica. En la Figura 8-10 se observa los modelos celulares (eritrocitos) incubados con las fracciones 15, 24, 25 y 26 del veneno *L. muta* sobre las mismas concentraciones evaluadas anteriormente (Figura 8-10). La fracción 25 fue la que mayor porcentaje (4,54 %) de hemólisis reportó en la concentración de 300 µg/mL. En general, los componentes del veneno *L. muta* no son tóxicos para los eritrocitos, ya que existe una diferencia significativa entre las fracciones y el control.

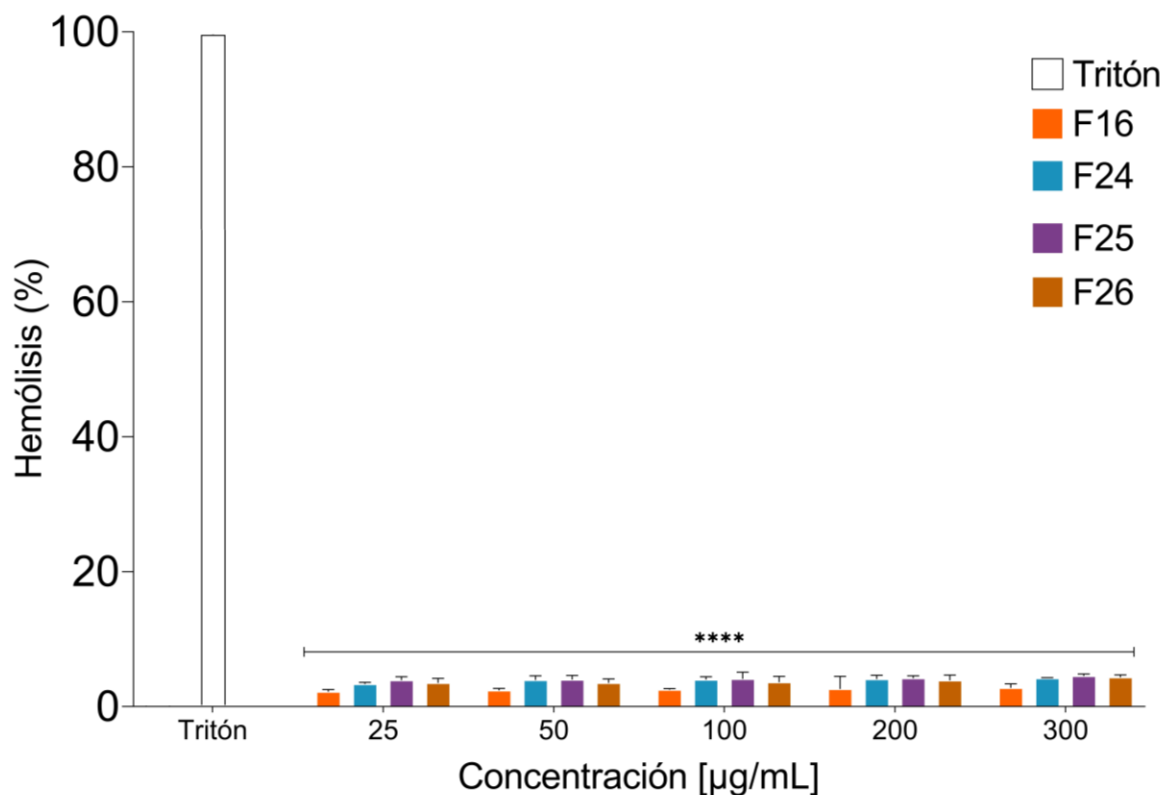


Figura 8-10: Porcentaje de hemólisis de las fracciones purificadas más abundantes de *L. muta*.

Gráfica del porcentaje hemolítico de las fracciones 16 (naranja), 24 (celeste), 25 (violeta) y 26 (marrón) de veneno para las concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL. El control positivo usado fue Triton X-100 (blanco). Se usó ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey para determinar la significancia estadística en eritrocitos humanos (**** indica $p < 0,0001$).

3.4. Identidad molecular de las fracciones más abundantes de *L. muta*

El análisis de la actividad enzimática reveló que el veneno de *L. muta* presenta toxinas catalíticamente activas de la familia de SVSP, PLA₂, SVMP y LAO (Figura 9-10). Los ensayos son independientes entre sí, se evidenció que el veneno crudo mantiene actividad específica de PLA₂ (45 nmol/min/mg), actividad caseinolítica (120 U/min/mg), actividad proteolítica (0,4 nmol/min/mg) y actividad LAAO (140 nM/min/mg). La fracción 16, reveló una actividad de 10 nmol/min/mg para PLA₂ (A) y 0,0843 nmol/min/mg para SVSP (B). La fracción 24, 25 (2,8667 nmol/min/mg) y 26 no mostraron actividad enzimática caseinolítica

significativa respecto al veneno total (C). Sin embargo, la misma fracción 26 evaluada para L-amino oxidasa reportó una actividad específica de 39,432 nM/min/mg.

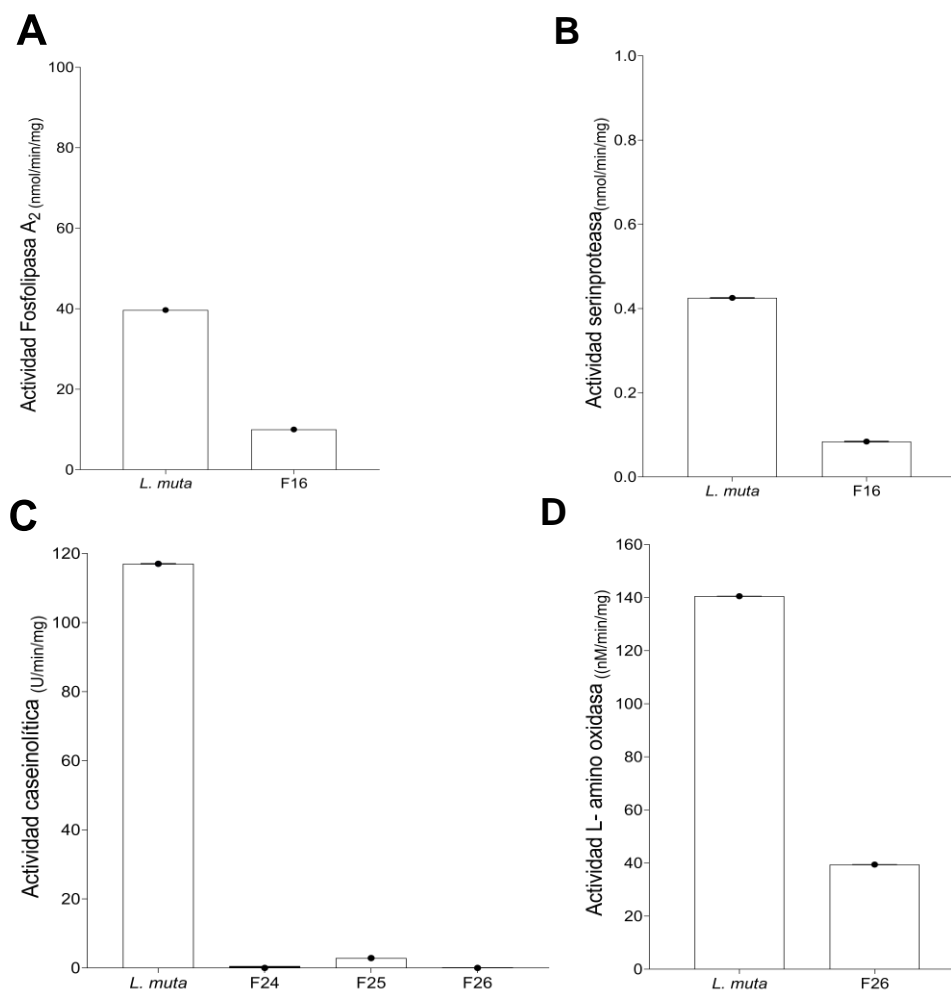


Figura 9-10: Actividad enzimática del veneno crudo y fracciones purificadas de *L. muta*.

Se presenta la actividad PLA₂ (A), SVSP (B), caseinolítica (C) y LAAO (D), evaluadas mediante sustratos cromogénicos específicos: NOBA, BapNa, azocaseína y L-metionina y respectivamente. El veneno crudo fue analizado para las cuatro actividades enzimáticas. La fracción 16 fue evaluada para SVSP y PLA₂, las fracciones 24 y 25 para actividad caseinolítica, y la fracción 26 para LAAO y caseinolítica.

3.5. Espectrometría de masas

El análisis directo de masa intacta para las fracciones 24, 25 y 26 con potencial citotóxico se realizó por LC-ESI-QTOF (Figura 10-10) mediante un rango espectral de 500 a 1900 (m/z). Los resultados corroboraron el peso molecular evidenciado por electroforesis SDS-PAGE, mostrando la presencia de iones de alta intensidad que se utilizaron para el cálculo del peso molecular. La fracción 16 mostró una masa intacta de 28,629 kDa (A) y una masa intacta de 13,967 kDa (resultados no mostrados). La fracción 24 (B), 25 (C) y 26 (D) tuvieron un valor de 24,677, 24,677 y 24,674 kDa respectivamente, pesos que corresponden a una PI-SVMP. Para la fracción 26 no fue posible elucidar la masa intacta de la banda de 45 kDa mostrada en el gel de electroforesis (Figura 5-10).

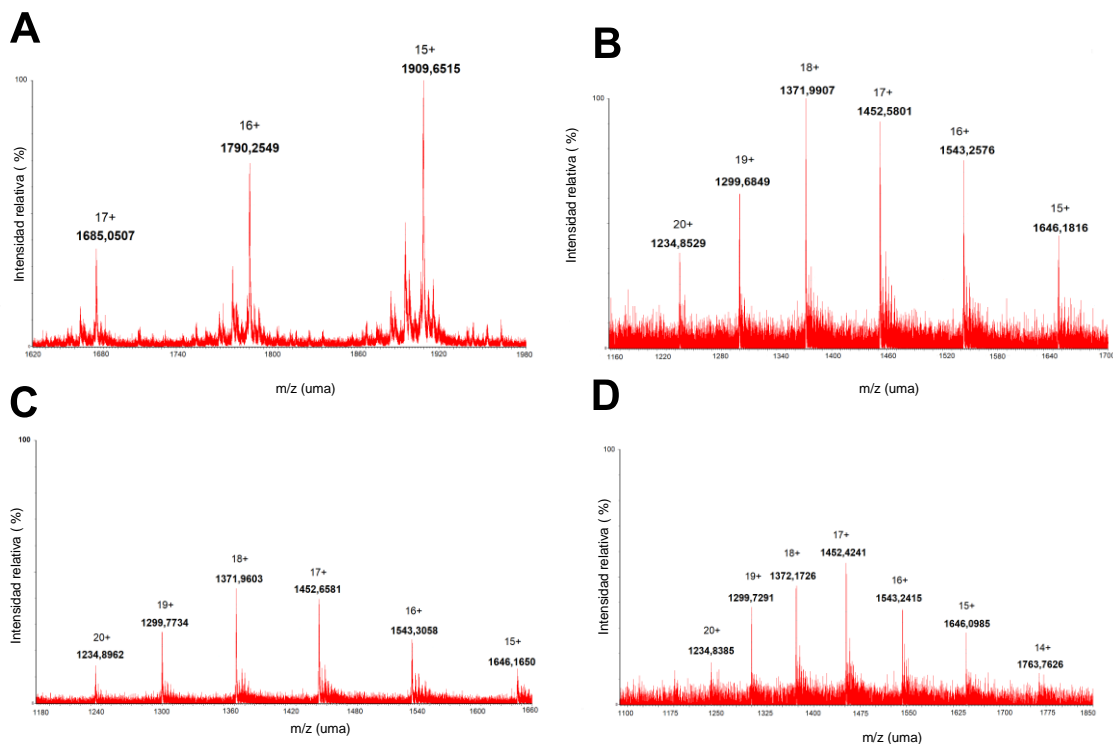


Figura 10-10: Espectros por LC-ESI-TOF para las fracciones 16, 24, 25 y 26 con potencial citotóxico.

Se muestra los espectros de las fracciones *L. muta* con un rango espectral de 1000 a 1900 (m/z) para la fracción 16 (A), 24 (B), 25 (C) y 26 (D), con proteínas de 28,629 kDa y 24,67 kDa con diferentes intensidades relativas (%).

A fin de determinar la identidad de las proteínas evaluadas, mediante la digestión de los fragmentos de gel adquiridos por electroforesis SDS-PAGE se evidenció la secuencia correspondiente a las fracciones y las familias de proteínas registradas en SwissProt y se reportó la secuencia en la **Tabla 1-2** . Posterior a la digestión en gel de las bandas de gel de electroforesis con tripsina, seguida del análisis LC-ESI-TOF, se obtuvieron asignaciones de familias de proteínas para cinco bandas, que se estima que representan el 48 % de las proteínas totales del veneno. La fracción 16-1 corresponde a la banda de 28 kDa mostrada por electroforesis, evidenciando un score de 13 con una familia de proteína SVSP. La banda de la fracción 24 corresponde a una PI-SVMP con una masa aparente de 22,923 kDa. La fracción 25 contiene la misma información que la fracción 24 (Resultados no mostrados). La fracción 26-1 corresponde a la banda de alto peso molecular registrada porelectroforesis SDS-PAGE, evidenciando una masa aparente de 58,894 kDa relacionada ala familia de proteínas L-amino oxidasa.

Tabla 1-2: Identidad de las fracciones RP-HPLC del veneno de *L. muta* (Ecuador) por secuenciación LC-ESI-TOF-MS de bandas de proteínas digeridas con tripsina.

| Fracción | Masa aparente [kDa] | Mr (expt) | Mr (calc) | Expect | Secuencia | Familia de proteína, proteína relacionada |
|----------|---------------------|-----------|-----------|----------|---|---|
| F16-1 | 28,717 | 1115,5991 | 1115,6009 | 0,06 | VLCAGILEGGK | SVSP, <i>Crotalus adamanteus</i> |
| F24 | 22,923 | 1063,5405 | 1063,541 | 9,50E-05 | YNGNLNTIR | SVMP, <i>L. muta</i> |
| | | 1279,6531 | 1279,6521 | 3,30E-06 | NSVGIVQD HSPK | |
| F26-1 | 58,894 | 3331,5829 | 3331,5806 | 8,30E-09 | EGNLSPGA VDMIGDLLN EDSGYYVS FIESLK | LAEO, <i>L. muta</i> |
| | | 3320,7142 | 3320,7187 | 8,30E-09 | HVVIVGAG MSGLSAAY VLAEAGHQ VTVLEASER | |
| | | 1280,6274 | 1280,6248 | 2,80E-06 | SAGQLYEE SLGK | |

Realizado por: Rosales, Carolyn, 2022

Los péptidos sugeridos por el software de identificación automática se muestran. Los valores de confianza (Expt) y puntuación (Sc) se calcularon mediante el software MASCOT.

4. INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Los venenos son reservorios de compuestos farmacológicamente activos, siendo los de serpientes, abejas, escorpiones, entre otros, altamente promisorios para la generación de nuevas terapias anticáncer [47,36]. Estudios bioquímicos y moleculares han explorado este potencial y han revelado caminos útiles para el futuro desarrollo de agentes terapéuticos.

En este estudio, se demostró por primera vez el potencial citotóxico del veneno de *L. muta* de Ecuador sobre la línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y). Estudios con este veneno y toxinas aisladas en países como Argentina, donde demostraron efectiva la combinación de O-LM compuesta por oligoelementos (Se-2, Zn+2 y Mg+2) y veneno de *L. muta* como efecto radioprotector en tumores de ratón y en células de cultivo [71]. Por otro parte, en Brasil aislaron una L-amino oxidasa con propiedades citotóxicas para cáncer de mama (MCF-7) y un adenocarcinoma gástrico (AGS) [72], surgiendo así esta capacidad y posible aplicación. Debido a la variabilidad en la composición, y diferentes isoformas es imperativo conocer la actividad citotóxica y proteínas farmacológicamente activas presentes en el veneno ecuatoriano [71].

Las micrografías demostraron que, las células que no fueron incubadas con veneno mantenían una forma alargada distribuidas proporcionalmente en toda la placa. Sin embargo, después de 24 h de incubación con el veneno, la morfología del modelo celular usado cambió a residuos circulares con presencia de gránulos. Un estudio en el 2010 sobre citotoxicidad inducida por una PLA2 para células MDCK (células epiteliales renales) reporta que las células en proceso apoptótico cambian su morfología de células alargadas adheridas a células redondeadas y agrupamientos con presencia de gránulos en el intento de reorganización para restablecer la monocapa parcialmente perdida [73]. A pesar de los reportes escasos sobre la morfología de SHSY5Y por efecto citotóxico, en el 2019 se evaluó la morfología por muerte celular inducida por hierro, dando como resultado células extendidas con forma piramidal a células no diferenciadas con neuritas retraídas característica de la perdida de la integridad neural y muerte de celular [74]. En este estudio

fue visible la presencia de células agrupadas sin adherencia, sin embargo, es necesario comprobarlo con técnicas microscópicas capaces de observar estructuras celulares que están por debajo del límite de resolución óptica [75].

La capacidad de inhibición celular del veneno crudo de *L. muta* fue de (82 % a 56 %) para las concentraciones de 25 a 300 µg/mL. Estos datos sugieren que la composición del veneno *L. muta* contiene moléculas bioactivas con capacidad de controlar la viabilidad de células tumorales del tipo neuroblastoma. Se desconoce el mecanismo de acción, sin embargo, investigaciones citotóxicas con *L. muta* de Brasil sobre líneas celulares cancerígenas (HELA, MCF-7, MDCK y C2C12) han demostrado alteración de las vías de muerte celular por autofagia y eventos apoptóticos [76]. A partir del análisis estadístico ANOVA y la prueba complemento Tukey se comprobó que los porcentajes de 82 % a 56 % son significativamente diferentes respecto al control.

El veneno de *L. muta* y sus componentes no mostraron una naturaleza hemolítica, manteniendo un porcentaje de lisis por debajo del 5 % respecto al control (100 %) en todas las concentraciones. Los eritrocitos constituyen un modelo ampliamente usado y reconocido para estudios de toxicidad en etapas iniciales del desarrollo de productos farmacéuticos, por su fácil manejo y disponibilidad [77]. Sin embargo, la ausencia de núcleo y sus características particulares dificultan un acercamiento a células neuronales normales. En este sentido, futuros estudios deberían explorar un tipo celular más similar al modelo de célula cancerosa usada en la presente investigación.

Estos hallazgos sugieren una posible selectividad e impulsan la evaluación de las toxinas purificadas del veneno sobre una línea celular tumoral. Inicialmente, el fraccionamiento del veneno evidenció un conjunto de veintisiete picos con diferentes abundancias. Es sabido que el veneno de cada serpiente es diferente debido a factores como edad, hábitat y el clima en el que se ha adaptado el individuo [78]. Por ejemplo, *L. muta* rhombeata de Brasil en el 2013 por RP- HPLC fue purificada y presentó veintitrés fracciones, con actividad amidolítica y coagulante [79]. Montero y colaboradores en 2021, fraccionaron el veneno *L. muta* por dos metodologías, cromatografía de exclusión molecular (columna de 13 x 130 mm) evidenciando ocho picos a 280 nm y por cromatografía de intercambio catiónico de carboximetil-sefarosa (CMS) cinco fracciones contenidas en el veneno crudo [80]. En

Bolivia la separación del veneno *L. muta* por RP-HPLC mostró 38 fracciones y 32 fracciones para *Lachesis stenophys* [81]. Esto evidencia la variación proteómica del veneno de serpiente *L. muta* de la región ecuatoriana respecto a los registros a nivel latinoamericano. Luego de la liofilización se obtuvo material en cantidad suficiente para los ensayos biológicos de cuatro fracciones, que coinciden con las proteínas de mayor absorbancia en el cromatograma, con excepción del pico cinco y doce, los cuales presentaron alta absorbancia, pero baja cantidad liofilizada para su análisis.

En los resultados de la electroforesis SDS-PAGE, la fracción 16 presentó dos bandas con peso molecular en el rango de 10 a 12 kDa y 24 a 31 kDa, con familias de proteínas probables de PLA2 y SVSP. Las fracciones 24 y 25 tuvieron una única banda con peso molecular en el rango de 18 a 24 kDa, con una presencia probable de PI-SVMP. La fracción 26 presentó múltiples bandas en la región de 42 a 57 kDa y en la región de 18 a 24 kDa, esta última podría ser parte de fracción 25 que le antecede, con familia de proteína probable de LAAO o PIII-SVMP, esto se corroboró con la presencia de proteínas con masa intacta similar por espectrometría de masas. Ante la presencia de varios compuestos por pocillo del gel, fue necesario evaluar el porcentaje de pureza de las muestras.

La evaluación biológica o citotóxica de nuevos agentes requiere de alto grado de pureza (90 %). En este estudio se obtuvo un porcentaje de pureza mínimo, pero dentro de los rangos establecidos para estudios biológicos [82]. El porcentaje de pureza para F16 fue de 85,27 % por la presencia de un pico cromatográfico que eluye muy cerca de la fracción 16. F24 obtuvo un 96,2 %, F25 un 95,65 % y F26 alcanzó un grado de 93,25 %, considerando que en este último hubo una elución muy cercana al pico de interés, con un peso molecular correspondiente a la fracción que le antecede. Por lo tanto, en este primer acercamiento en la búsqueda de agentes activos contra neuroblastoma, se tiene un porcentaje de pureza suficiente para los ensayos biológicos.

El resultado de la evaluación del potencial citotóxico en las toxinas más abundantes sobre SH-SY5Y, mostró 84 % de inhibición para la fracción 16 y 68 % de inhibición para la fracción 26 en las concentraciones más altas. Aunque el mecanismo de acción no se ha podido elucidar en esta investigación. Se ha informado que el veneno de *L. muta* en las líneas

celulares (MGSO-3, HELA y EA.hy926) provoca la despolarización transitoria de la membrana mitocondrial después de 12 h, provocando la abertura de poros y liberación de moléculas pro-apoptóticas [76]. Otro de los aspectos importantes a examinar sería la resistencia presentada por SH-SY5Y sobre estas familias de proteínas con potencial citotóxico conocido para otros modelos celulares. Stransky, en 2018 evaluó la toxicidad de *L. muta* de Brasil en células HELA (adenocarcinoma de cuello uterino), MGSO-3 (tejido de cáncer de mama) y células VERO (de riñón de mono epitelial normal), donde reportó actividad citotóxica desde 0,6 µg/mL para las células VERO [76]. Abdelkafi en 2021 reportó la citotoxicidad de una LAAO para glioblastoma (U87) con valores de EC50 de 0,3 µg/mL [83]. Aunque es otro tipo celular, es necesario evaluar la sensibilidad en otros modelos de estudio para estas fracciones purificadas de *L. muta* de Ecuador.

La caracterización enzimática evidenció actividad caseinolítica significativa, LAAO, PLA2 y SVSP en el veneno crudo de *L. muta*. Todas estas familias de proteínas están asociadas a estudios con fines terapéuticos, es por esto que es importante obtener información adicional acerca de la citotoxicidad de las proteínas aisladas sobre diferentes líneas celulares [84]. De igual forma en varios estudios sobre *L. muta* se presenta una composición de PLA2 de 68 % a 80 % de la composición del veneno [79]. Igualmente se registra a las SVMP y PLA2 como toxinas de mayor abundancia, esto ha sido descrito por Jiménez y colaboradores, quienes aislaron PLA2 de *L. muta* de Perú [85]. De igual forma en Venezuela se ha purificado una toxina fibrinolítica de *L. muta*, la misma que se une a SVMP para intervenir en los procesos de coagulación [72]. Aunque las AVMP hayan reducido su actividad caseinolítica, esto no significa que no sean de tipo SVMP, más bien corrobora el efecto que tienen los solventes cromatográficos para provocar este tipo de eventos [67].

Las familias de proteínas reportadas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) fueron una SVSP (F16), PI-SVMP (F24) y una LAAO acompañada de una PI-SVMP (F26). El porcentaje de citotoxicidad de F26 puede estar atribuido a la combinación entre estas dos familias de proteínas. Hoy en día este efecto puede representar una ventaja sobre la investigación, ya que se puede observar una toxicidad mejorada sinérgicamente para los procesos metabólicos dada por interacciones inter moleculares y supramoleculares con una misma cantidad de veneno [86,87] Sin embargo, para corroborar esta información sería

necesario la evaluación de toxinas combinadas, para así evaluar el efecto en conjunto de LAAO.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se evidenció por primera vez un significativo efecto citotóxico del veneno crudo en la línea celular (SH-SY5Y) de la especie *L. muta* de la región ecuatoriana. Otro hallazgo es la baja capacidad del veneno de provocar lisis celular, evidenciando que el veneno tuvo un 4 % de hemólisis significativamente diferente respecto al veneno incubado sobre eritrocitos humanos. Se obtuvieron 27 fracciones, entre ellas cuatro mostraron mayor abundancia relativa. Las familias de proteínas evidenciadas por electroforesis SDS-PAGE fueron SVMP, PLA2, SVSP y LAAO. Estos resultados se confirmaron por espectrometría de masas evidenciando proteínas con masa intacta de 13, 24 y 28 kDa, respectivamente. Los ensayos enzimáticos identificaron la actividad de familias de proteínas con un importante interés terapéutico. En esta sección se ha presentado que SVMP, LAAO y PLA2 son las enzimas de mayor concentración en el veneno. En contraste, la actividad enzimática, junto a la digestión de las bandas con tripsina evidenció que las familias de proteínas asociadas a las fracciones fueron SVSP en la fracción 16, PI-SVMP en la fracción 24-25 y LAAO junto a PI-SVMP en la fracción 26 con una masa aparente similar a las del estudio. Este trabajo contribuye a la literatura existente sobre caracterización de los componentes más abundantes de la especie *L. muta* a nivel latinoamericano.

L- amino oxidasas y metaloproteasas han reportado alta citotoxicidad para otras líneas celulares, es por esto que es importante que se realice el análisis con un modelo de línea celular diferente, debido a que, todo esto con el fin de indagar más a fondo el potencial citotóxico de las proteínas involucradas. De igual forma, se recomienda analizar el efecto citotóxico respecto al sinergismo de las proteínas, para así comprobar bajo las mismas condiciones la efectividad de las moléculas purificadas en contraste con la información ya reportada. Finalmente, se recomienda la investigación sobre los mecanismos celulares involucrados en el veneno *L. muta* que provocan una inhibición celular de este tipo, el cual permitirá conocer el potencial de estas toxinas como candidatos iniciales para la terapéutica de neuroblastoma.

REFERENCIAS

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M et al. Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer [Internet]. Global Cancer Observatory. 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today>
2. Plutynski A. Cancer. En: Edward N. Zalta, editor. The Stanford Encyclopedia of Philosophy. Summer 2019.
3. Ward EM, De Santis CE, Lin CC, Kramer JL, Jemal A, Kohler B, et al. Cancer statistics: Breast cancer in situ. *CA Cancer J Clin* [Internet]. noviembre de 2015;65(6):481–95. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21321>
4. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Las cifras del cáncer en España. 2022; Disponible en: https://seom.org/images/seomcms/stories/recursos/NdP_Dia_Mundial_Cancer_2022.pdf
5. Urry LA., Cain ML., Wasserman SA., Minorsky PV., Reece JB. *Campbell Biology* [Internet]. Twelfth edition. Pearson., editor. 2017 [citado el 30 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://lcn.loc.gov/2019039139>
6. Raymond W. Ruddon MD. PD. *Cancer Biology. FOURTH.* Arbor A, editor. University of Michigan Medical School;
7. Crosby D, Bhatia S, Brindle KM, Coussens LM, Dive C, Emberton M, et al. Early detection of cancer. *Science* (80-) [Internet]. el 18 de marzo de 2022;375(6586): eaay9040. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aay9040>
8. Amaro C L. Terapéutica farmacológica del cáncer. *Panorama Actual del Medicamento* [Internet]. junio de 2012;4(354):419–48. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3969857>
9. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* [Internet]. el 12 de enero de 2021;71(1):7–33. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21654>
10. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* [Internet]. el 12 de enero de 2022;72(1):7–33. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21708>
11. World Health Organization. Ecuador Source: Globocan 2020 [Internet]. 2021 [citado el 30 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/218-ecuador-fact-sheets.pdf>
12. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. febrero de 2020;8(2):e180–90. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X19304887>
13. World Health Organization. CureAll framework: WHO global initiative for childhood cancer: increasing access, advancing quality, saving lives. World Health Organization. [Internet]. 2021 [citado el 30 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/347370>
14. Tan C, Tasaka H, Yu K-P, Murphy ML, Karnofsky DA. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* [Internet]. 1967;20(3):333–53. Disponible en: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(1967\)20:3%3C333::AID-CNCR2820200302%3E3.0.CO;2-K](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(1967)20:3%3C333::AID-CNCR2820200302%3E3.0.CO;2-K)
15. Couanet D, Valteau-Couanet D. Neuroblastoma. *EMC - Pediatría* [Internet]. enero de 2007;42(1):1–15. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1245178907702615>
16. Palma-Padilla V, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Siordia-Reyes AG, Mejía-Arangur JM, Carreón-Cruz R, et al. [Incidence and trends of neuroblastoma in Mexican children attending at Instituto Mexicano del Seguro Social]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* [Internet]. 2010;48(2):151–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929618>
17. Murillo-Zolezzi A, Quijano-Orvañanos F, Toledo-Valdovinos S, Padilla-Longoria R, Montañez-Ramírez H., Zerrweck-López C. Neuroblastoma en el adulto. Informe de un caso. *Cirugía y Cirujanos* [Internet]. Redalyc [Internet]. 2009 [citado el 30 de agosto de 2022];77(5):397–401. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=66211745010>
18. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* [Internet]. el 22 de abril de 2012;12(4):237–51. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc3237>
19. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, et al. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol* [Internet]. junio de 2017;18(6):719–31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28410997>
20. Instituto Nacional de Cáncer (NIH). Terapias dirigidas contra el cáncer. Hélice E, editor. 2022.
21. Riñón Pastor CC, De Mingo Misena L, Alvarez Bernaldo de Quirós M, Morató Robert P, Alonso Calderón J, Cortés Gómez MJ, et al. [Laparoscopic adrenalectomy for neuroblastoma. Our serie and review of literature]. *Cir Pediatr* [Internet]. abril de 2013;26(2):53–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24228353>
22. Ministerio de Salud Argentina, Donato M. Naxitamab para neuroblastoma en recaída o refractario.
23. Sánchez-Suárez P, Benítez-Bribiesca L. Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. En: Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN S-XXI, IMSS, México

- DF. 2006. p. 187–99.
24. Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, Sears CR, Pawelczak KS, et al. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol Ther* [Internet]. abril de 2016;160:65–83. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725816000322>
 25. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Stem Cell or Bone Marrow Transplant Side Effects [Internet]. 2018 [citado el 30 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/bone-marrowstem-cell-transplantation/side-effects-bone-marrow-transplant-stem-cell-transplant>
 26. Thakor AS, Gambhir SS. Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(6):395–418.
 27. Blanco-Luquin I, Lázcoz P, Celay J, Castresana JS, Encío IJ. In Vitro Assessment of the Role of p53 on Chemotherapy Treatments in Neuroblastoma Cell Lines. *Pharmaceuticals* [Internet]. el 19 de noviembre de 2021;14(11):1184. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/11/1184>
 28. Astudillo-De La Vega H, Ruiz-García E, Martínez-Cedillo J, Ochoa-Carrillo FJ. El papel de la quimiorresistencia en los tumores sólidos. *Gac Mex Oncol*. 2010;9(3):117–26.
 29. Chan HSL, Haddad G, Thorner PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, et al. P-Glycoprotein Expression as a Predictor of the Outcome of Therapy for Neuroblastoma. *N Engl J Med* [Internet]. el 5 de diciembre de 1991;325(23):1608–14. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199112053252304>
 30. Michon, J., Quintana, E., & Calle D. Los Neuroblastomas. *Oncol* [Internet]. 8(3). el 6 de septiembre de 2019;8(3). Disponible en: <https://roe-solca.ec/index.php/johs/article/view/133>
 31. Zafar A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F, et al. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev* [Internet]. el 6 de marzo de 2021;41(2):961–1021. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33155698>
 32. Roy A, Jauhari N, Bharadvaja N. Medicinal Plants as a Potential Source of Chemopreventive Agents. En: *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 109–39. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8064-7_6
 33. Karpiński TM, Adamczak A. Anticancer activity of bacterial proteins and peptides. *Pharmaceutics*. 2018;10(2).
 34. García GA, García Cardona A. Fosfolipasas A2: Grandes familias y mecanismos de acción. *Rev Repert Med y Cirugía* [Internet]. el 1 de diciembre de 2009;18(4):199–209. Disponible en: <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/555>
 35. Ortiz-Prado E, Molina C, Ramírez D, Espín E, Fierro D. Perspectivas actuales sobre el uso terapéutico del veneno de serpientes. *Rev Médica Vozandes*. 2015;26(1):47–52.
 36. Instituto Nacional del Cáncer (NIH). Anticuerpos monoclonales [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/anticuerpos-monoclonales>
 37. Haaheim LR. Monoclonal antibodies—their diagnostic potential. *J Hosp Infect* [Internet]. junio de 1991;18:443–50. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/019567019190055D>
 38. Jaramillo Toapanta MV, Borja A. Anticuerpos monoclonales en cáncer infantil. *Ecuador J Med* [Internet]. el 15 de junio de 2022;2(Esp):35–46. Disponible en: <https://revistafecim.org/index.php/tejom/article/view/98>
 39. Li L, Huang J, Lin Y. Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future. *Toxins (Basel)*. 2018;10(9):1–8.
 40. Barrios C, Freitas-Junior R, Martins S, Bines J, Estevez-Diz MDP, Caleffi M. Challenge of Incorporating New Drugs for Breast Cancer in Brazil: A Proposed Framework for Improving Access to Innovative Therapies. *JCO Glob Oncol*. diciembre de 2021;(7):474–85.
 41. Rojo P. Access to essential drugs in developing countries. *Gac Sanit* [Internet]. 2001;15(6):540–5. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9111\(01\)71619-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9111(01)71619-6)
 42. Roy A, Bharadvaja N. Venom-Derived Bioactive Compounds as Potential Anticancer Agents: A Review. *Int J Pept Res Ther* [Internet]. el 16 de marzo de 2021;27(1):129–47. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/s10989-020-10073-z>
 43. Maris JM. Recent Advances in Neuroblastoma. *N Engl J Med* [Internet]. el 10 de junio de 2010;362(23):2202–11. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0804577>
 44. Wang L, Dong C, Li X, Han W, Su X. Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources (Review). *Oncol Rep* [Internet]. 2017 [citado el 30 de agosto de 2022];38(2):637–51. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/or.2017.5778>
 45. Pereáñez Jiménez JA, Vargas Muñoz LJ. Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina. *Iatreia* [Internet]. 2009 [citado el 30 de agosto de 2022];22(4):382–91. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932009000400007&Ing=en
 46. Wang D, Starr R, Chang WC, Aguilar B, Alizadeh D, Wright SL, et al. Chlorotoxin-directed CAR T cells for specific and effective targeting of glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2020;12(533).
 47. Ojeda PG, Wang CK, Craik DJ. Chlorotoxin: Structure, activity, and potential uses in cancer therapy. *Biopolymers*. 2016;106(1):25–36.

48. Xuan HL, Duc TD, Thuy AM, Chau PM, Tung TT. Chemical approaches in the development of natural nontoxic peptide Polybia-MP1 as a potential dual antimicrobial and antitumor agent. *Amino Acids* [Internet]. 2021;53(6):843–52. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00726-021-02995-9>
49. Ejaz S, Hashmi FB, Malik WN, Ashraf M, Nasim F ul-H, Iqbal M. Applications of Venom Proteins as Potential Anticancer Agents. *Protein Pept Lett*. 2018;25(7).
50. Cajiao Garcés VL. Determinación de la bioactividad de fracciones peptídicas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae) [Internet]. Vol. 3, Biomass Chttp://repositorio.puce.edu.ec/hem Eng. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR; 2018. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/15832>
51. Jain D, Kumar S. Snake venom: A potent anticancer agent. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2012;13(10):4855–60.
52. Dan Vivas RI, Yarlequé A. Uso potencial de componentes del veneno de serpiente en el tratamiento del cáncer. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2012 [citado el 30 de agosto de 2022];29(3):396–401. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342012000300017&lng=es.
53. Calderon LA, Sobrinho JC, Zaqueo KD, de Moura AA, Grabner AN, Mazzi M V., et al. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [citado el 30 de agosto de 2022];2014:1–19. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2014/203639>
54. Bernardes-Oliveira E, Gomes DL, Martelli Palomino G, Juvenal Silva Farias K, da Silva WD, Rocha HAO, et al. Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Promote Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis via the Mitochondrial Depolarization of Cervical Cancer Cells. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2016 [citado el 30 de agosto de 2022];2016:1–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1574971>
55. Zainal Abidin S, Rajadurai P, Hoque Chowdhury M, Othman I, Naidu R. Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptosis Activity of L-Amino Acid Oxidase from Malaysian Cryptelytrops *purpureomaculatus* (CP-LAAO) Venom on Human Colon Cancer Cells. *Molecules* [Internet]. el 8 de junio de 2018;23(6):1388. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/6/1388>
56. Rodríguez Guerra A, Carvajal Campos A. *Lachesis muta* Verrugosas del oriente Linnaeus (1766) [Internet]. Reptiles del Ecuador, Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2020. Disponible en: https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Lachesis_muta, acceso Viernes, 13 de Mayo de 2022.
57. Ministerio del Ambiente. Ministerio del Ambiente. 2005.
58. Chacón GM, Fuentes Rodríguez JM, Diop SMSY, Arribas MR, Paredes Barquero M, Cortés EA, et al. Procedimientos, experimentación e investigación en enfermedades neurodegenerativas. *Protocolos para un laboratorio de neurociencias* [Internet]. 2021. Disponible en: <https://dehesa.unex.es:8443/handle/10662/12413>
59. Pesini Martín C, Pardo Jimeno J, Ramírez Labrada A. Caracterización de un modelo de cultivo celular 3D de neuroblastoma para el estudio de inmunoterapia con células NK [Internet]. 2019 [citado el 30 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/87457?ln=es>
60. Rodríguez Torres M, Arenas Arrocena C, García Contreras R, Torres Acosta L. Manual para la enseñanza práctica del Ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas. En: *Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León*. 2018.
61. Proaño-Bolaños C, Blasco-Zúñiga A, Almeida JR, Wang L, Llumiquinga MA, Rivera M, et al. Unravelling the Skin Secretion Peptides of the Gliding Leaf Frog, *Agalychnis spurrelli* (Hylidae). *Biomolecules* [Internet]. el 30 de octubre de 2019;9(11):667. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/11/667>
62. Almeida JR, Mendes B, Patiño RSP, Pico J, Laines J, Terán M, et al. Assessing the stability of historical and desiccated snake venoms from a medically important Ecuadorian collection. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* [Internet]. Abril de 2020;230(January):108702. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31911190>
63. Patiño RSP, Salazar-Valenzuela D, Medina-Villamizar E, Mendes B, Proaño-Bolaños C, da Silva SL, et al. *Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals. *Toxicon* [Internet]. el 15 de abril de 2021;193:63–72. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33503404>
64. Isobe K, Satou S, Matsumoto E, Yoshida S, Yamada M, Hibi M, et al. Characterization and application of a L-specific amino acid oxidase from *Rhodococcus* sp. AIU LAB-3. *J Biosci Bioeng*. junio de 2013;115(6):613–7.
65. Kishimoto M, Takahashi T. A Spectrophotometric Microplate Assay for -Amino Acid Oxidase. *Anal Biochem* [Internet]. el 1 de noviembre de 2001;298(1):136–9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269701953813>
66. Munuera Mora J. Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico [Internet]. [Valencia]: Universidad Politécnica de Valencia; 2016 [citado el 30 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/70417?show=full>
67. Lomonte B, Calvete JJ. Strategies in “snake venomics” aiming at an integrative view of compositional,

- functional, and immunological characteristics of venoms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* [Internet]. el 28 de diciembre de 2017;23(1):26. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28465677>
68. Science, "Mascot Distiller." . <https://www.matrixscience.com/distiller.html>;
69. Uniprot, "Swiss-Prot/TrEMBL." . <https://www.uniprot.org/>;
70. GraphPad Prism 9. <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>;
71. Crescenti E, Croci M, Mohamad N, Medina V, Sambuco L, Gutiérrez A, et al. Modulación de Enzimas Antioxidantes como Mecanismo Radioprotector de Oligoelementos y *Lachesis muta* en Tejidos Normales. Instituto de Inmunooncología. 2006. p. 1–10.
72. Bregge-Silva C, Nonato MC, de Albuquerque S, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM, Vasconcelos Diniz MR, et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel l-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. *Toxicon* [Internet]. 2012;60(7):1263–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.008>
73. Damico DCS, Nascimento JM, Lomonte B, Ponce-Soto LA, Joazeiro PP, Novello JC, et al. Cytotoxicity of *Lachesis muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. *Toxicon* [Internet]. abril de 2007;49(5):678–92. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010106004247>
74. Rakshit J, Mallick A, Roy S, Sarbajna A, Dutta M, Bandyopadhyay J. Iron-Induced Apoptotic Cell Death and Autophagy Dysfunction in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. el 5 de enero de 2020;193(1):138–51. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-019-01679-6>
75. Paniagua Gómez Álvarez R. Biología celular.
76. Stransky S, Costal-Oliveira F, Lopes-de-Souza L, Guerra-Duarte C, Chávez-Olórtegui C, Braga VMM. In vitro assessment of cytotoxic activities of *Lachesis muta* snake venom. Calvete JJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. el 16 de abril de 2018;12(4):e0006427. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006427>
77. Robles-Loaiza AA, Pinos-Tamayo EA, Mendes B, Ortega-Pila JA, Proaño-Bolaños C, Plisson F, et al. Traditional and Computational Screening of Non-Toxic Peptides and Approaches to Improving Selectivity. *Pharmaceuticals (Basel)* [Internet]. el 8 de marzo de 2022;15(3). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35337121>
78. Izidoro LFM, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, et al. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014; 2014:1–19. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/196754/>
79. Torres-Huaco FD, Werneck CC, Vicente CP, Vassequi-Silva T, Nery-Diez ACC, Mendes CB, et al. Rapid Purification and Procoagulant and Platelet Aggregating Activities of Rhombobin: A Thrombin-Like/Gyroxin-Like Enzyme from *Lachesis muta* rhombeata Snake Venom. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013 [citado el 30 de agosto de 2022];2013:1–12. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/903292>
80. Montero Y, Girón ME, Medina R, Guerrero B, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. The Bushmaster (*Cuaima*) snake (*Lachesis muta muta*) of the Neotropical forest: the description of several haemostatic and biological activities in its venom. *Rev Científica la Fac Ciencias Vet* [Internet]. el 21 de diciembre de 2021;XXXII:1–7. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/37459>
81. Sanz L, Escolano J, Ferretti M, Biscoglio MJ, Rivera E, Crescenti EJ, et al. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J Proteomics* [Internet]. el 30 de abril de 2008;71(1):46–60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541473>
82. Ronco AE. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. 2004. 190 p.
83. Abdelkafi-Koubaa Z, ELBini-Dhouib I, Souid S, Jebali J, Doghri R, Sairi-Abid N, et al. Pharmacological Investigation of CC-LAAO, an L-Amino Acid Oxidase from *Cerastes cerastes* Snake Venom. *Toxins (Basel)*. el 16 de diciembre de 2021;13(12):904.
84. Mohamed AE-A, Garcia S, Stockand. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins (Basel)*. el 25 de septiembre de 2019;11(10):564.
85. Jimenez KL, Zavaleta AI, Izaguirre V, Yarleque A, Inga RR. Clonaje caracterización molecular in silico de un transcrito de fosfolipasa A, aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010;27(4):2–6.
86. Pucca MB, Ahmadi S, Cerni FA, Ledsgaard L, Sørensen C V., McGeoghan FTS, et al. Unity Makes Strength: Exploring Intraspecies and Interspecies Toxin Synergism between Phospholipases A2 and Cytotoxins. *Front Pharmacol*. el 7 de mayo de 2020;11.
87. Laustsen AH. Toxin synergism in snake venoms. *Toxin Rev*. el 22 de octubre de 2016;35(3–4):165–70.