



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TOXINAS PURIFICADAS DE
***BOTHROCOPHIAS MICROPHTHALMUS* EN**
NEUROBLASTOMA HUMANO

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: EMILIO GUILLERMO CARBONELLY BENÍTEZ

TUTOR: PHD. JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA

Napo – Ecuador

2022

**DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y
RESPONSABILIDAD**

Yo, Emilio Guillermo Carbonelly Benítez con documento de identidad N° 1316555133, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

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

Tena, 15 de julio de 2022

Emilio Guillermo Carbonelly Benítez

1316555133

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Emilio Guillermo Carbonelly Benítez, con documento de identidad N° 1316555133, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Evaluación del efecto de toxinas purificadas de *Bothrocophias microphthalmus* 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, 15 de julio de 2022



Emilio Guillermo Carbonelly Benítez

1316555133

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: Evaluación del efecto de toxinas purificadas de *Bothrocophias microphthalmus* en neuroblastoma humano, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Emilio Guillermo Carbonelly Benítez, bajo mi dirección.

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

Tena, 15 de julio de 2022

José Rafael de Almeida
1757448954

DEDICATORIA

Nunca tuve todas las oportunidades o recursos que me hubiera gustado tener.
Pero si fui bendecido con la mejor familia, mejores amigos y tutores que
haya podido desear.
Gracias a ustedes, todo esto fue posible.

Lo bueno en una persona, siempre atrae más buenas personas.

AGRADECIMIENTO

Me ha tomado largos meses de estudio, dedicación, lágrimas y esfuerzo la realización de este trabajo de tesis, pero, jamás será igual al esfuerzo que puse en resumir todos los agradecimientos que tengo por cada una de las personas que conocí durante mi carrera universitaria. Para mi madre, por ser la mujer más fuerte que he conocido al criar a 3 hijos y darles el mejor de los legados, la educación para ser un profesional que ame su trabajo. A mi padre, que me enseñó el valor del trabajo arduo y el autosacrificio por las personas que amas. A mis hermanos, que no dudaron en darme su mano en los momentos más difíciles de mi vida y apoyarme incondicionalmente en cada una de las decisiones que tomé para nuestra vivencia en una ciudad donde no tuvimos a lado a nuestros padres.

Agradezco desde lo más profundo de mi corazón a mi tutor Rafael que nunca me dio la espalda durante los 6 años que llevo conociéndolo, dándome consejos, regaños y me trató como a un hijo para él. Jamás me va a alcanzar la vida para agradecer todo el apoyo que me dio a lo largo de mi carrera y que ayudaron a formar no solo a un profesional, si no a una mejor persona. Agradezco a Bruno que, sin él, este trabajo de tesis no hubiera podido culminarse y que, si bien, no tengo años conociéndolo demostró ser una excelente calidad de persona y siempre me brindó un cariño incondicional.

Mi más sincera gratitud a Carolyn Rosales y Kamila Jurado que fueron las dos personas más importantes en estos últimos meses de culminación de mi tesis. Sin ustedes, yo no habría podido con todos estos retos que tuve que superar. A Carolyn, que, aunque jamás pueda devolver toda la ayuda que me obsequió desde que nos conocemos, le agradezco infinitamente y la llevaré siempre en mi corazón.

Doy las gracias a Reny Jaramillo por ser la mejor amistad que pude encontrar en la universidad, sin él, nunca hubiera tenido las más gratas experiencias que me llevo de mi trayecto universitario. Agradezco a Anggie Medina que sin falta siempre me apoyo durante estos últimos meses de realización de la tesis.

Y, por último, quiero dar las gracias nuevamente a la mujer más importante en mi vida, mi madre. Sin ella, no sería la persona que soy ahora ni tuviera los ánimos de superarme aún más. Gracias por demostrarme el amor incondicional de una madre por su hijo, gracias por cada gota de sudor, por cada noche de desvelo, por cada te amo a la lejanía y, sobre todo, doy gracias con todo mi ser, poderte llamar mamá. Gracias infinitas por haberte convertido en el mejor símbolo para mí y mis hermanos.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	iv
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Cáncer: Fundamentos y epidemiología	1
1.1.2. Tratamientos actuales contra el cáncer	2
1.1.3. Alternativas a los tratamientos actuales	3
1.1.4. Toxinas	4
1.1.4.1. Acetilcolinesterasa	5
1.1.4.2. L-amino oxidasas	5
1.1.4.3. Hialuronidasas	6
1.1.4.4. Serino proteasas	6
1.1.4.5. Fosfolipasas A ₂	7
1.1.4.6. Metaloproteasas	7
1.1.5. <i>Bothrocophias</i> en Ecuador	8
1.2. Planteamiento del problema.....	9
1.3. Justificación de la investigación	10
1.4. Objetivos de la investigación	11
1.4.1. Objetivo general	11

1.4.2.	Objetivos específicos	11
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO		12
2.1.	Venenos.....	12
2.2.	Métodos	12
2.2.1.	Evaluación del potencial citotóxico del veneno.....	12
2.2.1.1.	Descongelamiento y cultivo de la línea celular	12
2.2.1.2.	Mantenimiento y replique de la línea celular	12
2.2.2.	Ensayos MTT	13
2.2.2.1.	Cosecha de las células	13
2.2.2.2.	Adición de las fracciones, veneno crudo, MTT y SDS	13
2.2.3.	Ensayos hemolíticos	14
2.2.4.	Fraccionamiento del veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i> por RP-HPLC.....	15
2.2.5.	Cromatografía de las fracciones.....	15
2.2.6.	Electroforesis	15
2.2.7.	Evaluación del potencial citotóxico de las toxinas más abundantes	16
2.2.8.	Actividad hemolítica de las toxinas mayoritarias	16
2.2.9.	Ensayos enzimáticos	16
2.2.9.1.	Actividad serinoproteasa.....	17
2.2.9.2.	Actividad caseinolítica.....	17
2.2.9.3.	Actividad fosfolipasa A ₂	17
2.2.10.	Espectrometría de masas	18
2.2.11.	Análisis estadístico.....	18
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS		19
3.1.	Actividad citotóxica del veneno	19
3.2.	Perfil bioquímico del pool de veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i>	20
3.3.	Cromatografía de alta resolución	23
3.4.	Efecto citotóxico de las toxinas purificadas	24

3.5.	Caracterización de actividad enzimática.....	27
3.6.	Espectrometría de masas de la fracción 18.....	29
CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....		31
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		35
REFERENCIAS.....		0

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Cantidad de toxina liofilizada obtenida de las fracciones purificadas por RP-HPLC.....	22
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-12: Efecto del veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i> sobre la línea celular SH-SY5Y	19
Figura 2-12: Ensayos de hemólisis del veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i>	20
Figura 3-12: Perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC del veneno de la serpiente <i>Bothrocophias microphthalmus</i>	21
Figura 4-12: Comparación de la absorbancia entre las fracciones purificadas por RP-HPLC.	22
Figura 5-12: Peso molecular de las fracciones obtenidas por RP-HPLC con mayor absorbancia por SDS-PAGE	23
Figura 6-12: Cromatografía por RP-HPLC de las fracciones purificadas F13 (A), F14 (B) y F18 (C).....	24
Figura 7-12: Efecto de las fracciones 13,14 y 18 de <i>Bothrocophias microphthalmus</i> sobre la línea celular SH-SY5Y	25
Figura 8-12: Obtención del EC ₅₀ de la fracción y del veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i> sobre la línea celular SH-SY5Y.....	26
Figura 9-12: Ensayos de hemólisis de las fracciones F13, F14, F18 del veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i>	27
Figura 10-12: Caracterización enzimática de las actividades fosfolipásicas, proteolíticas y caseinolíticas del veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i>	28
Figura 11-12: Caracterización enzimática de la actividad caseinolítica de las fracciones 13, 14 y 18.....	29
Figura 12-12: Espectrometría de masas de F13 en un barrido espectral de 800 a 1300.	30

RESUMEN

La terapia contra el cáncer representa un importante desafío para la medicina moderna debido a la toxicidad y dependencia de dosis más altas de los quimioterapéuticos tras generar resistencia presentada por algunos tipos celulares. En este escenario, recursos biológicos abundantes en países biodiversos como Ecuador permiten la búsqueda de moléculas novedosas con potencial farmacológico. Por ejemplo, los venenos de serpientes son considerados cocteles de moléculas biológicamente activas que pueden modular diversos procesos biológicos de las células y funciones fisiológicas. En este estudio se caracterizó parcialmente el veneno de *Bothrocophias microphthalmus* y sus toxinas mayoritarias y, se evaluó su efecto sobre la línea SH-SY5Y. Las tres proteínas más abundantes fueron purificadas mediante cromatografía líquida (RP-HPLC) y SDS-PAGE. El veneno es rico en metaloproteasas del tipo I y III. Por otro lado, el veneno crudo redujo significativamente la viabilidad de la línea celular, incluso en las concentraciones más bajas, tales como 12.5 y 25 µg/mL y, no afectó la integridad de la membrana de los eritrocitos de manera significativa. De las toxinas purificadas se reportó una metaloproteasa (F18) no hemolítica y con una ligera toxicidad sobre la línea celular SH-SY5Y (F18: EC₅₀: 420.9 µg/mL). Esta toxina pertenece al tipo I, caracterizado por un peso molecular de 23000 Da. En conclusión, la presente investigación evidencia la importancia de caracterizar venenos de serpientes de especies del país para así ofrecer más información sobre componentes potenciales que tengan actividades farmacológicas de gran interés.

Palabras claves: Cáncer, caracterización, citotoxicidad, metaloproteasa y purificación

ABSTRACT

Cancer therapy represents a major challenge for modern medicine due to the toxicity and dependence of higher doses of chemotherapeutic agents after generating resistance presented by some cell types. In this scenario, abundant biological resources in biodiverse countries such as Ecuador allow the search for novel molecules with pharmacological potential. For example, snake venoms are considered cocktails of biologically active molecules that can modulate various cell biological processes and physiological functions. In this study, *Bothrocophias microphthalmus* venom and its main toxins were partially characterized and their effect on the SH-SY5Y line was evaluated. The three most abundant proteins were purified by liquid chromatography (RP-HPLC) and SDS-PAGE. The venom is rich in PI-metalloproteinases and PII-metalloproteinase. On the other hand, the crude venom significantly reduced the viability of the cell line, even at the lowest concentrations such as 12.5 and 25 µg/mL and did not significantly affect the integrity of the erythrocyte membrane. Of the purified toxins, a non-hemolytic metalloproteinase (F18) with a slight toxicity on the SH-SY5Y cell line (F18: EC₅₀: 420.9 µg/mL) was reported. This toxin belongs to type I, characterized by a molecular weight of 23,000 Da. In conclusion, this research shows the importance of characterizing snake venoms of species from the country is evidenced in order to offer more information on potential components that have pharmacological activities of great interest.

Keywords: Cancer, characterization, cytotoxicity, metalloprotein and purification.

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Cáncer: Fundamentos y epidemiología*

El cáncer es la segunda causa de fallecimiento a nivel mundial representando así un relevante y creciente problema de salud pública con terapias limitadas [1-3]. Las estadísticas globales de cáncer (GLOBOCAN) realizadas en 2020 mostraron que hubo más de 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y alrededor de 10 millones de muertes debido a la enfermedad. A su vez, se espera un aumento a 28.4 millones de nuevos casos para 2040 [4,5]. A pesar de que las técnicas para la detección temprana de la enfermedad han mejorado, la proliferación celular descontrolada y la deficiente especificidad de los tratamientos la seguirá convirtiendo en una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el planeta durante muchas décadas más [6].

América se encuentra en el tercer puesto de incidencia de cáncer en el mundo (20,9%), solo por debajo de Europa (22,8%) en un 2% tanto para hombres como mujeres. A pesar de que se estimó que se llegarían a los 20 millones de casos nuevos para 2025, esta cifra se alcanzó en 2020, volviendo al cáncer un grave peligro para la salud a nivel mundial [4,5]. Si bien, el cáncer es una enfermedad que asedia el planeta entero, más del 65% de los nuevos casos ocurren en países en vías de desarrollo en donde tan solo se dedican el 5% de los recursos globales disponibles para combatir el cáncer y, además, los riesgos de exposición a diversos compuestos cancerígenos son mayores [125,126]. Para finales de 2020, en cada una de las provincias de Ecuador, se registró que una de las principales causas de mortalidad fue el cáncer [124].

El neuroblastoma es considerado uno de los tumores sólidos más comunes en la población infantil, llegando a desarrollarse en menores de un año de edad [127]. En Europa y Estados Unidos esta enfermedad ocupó el 28% de los casos de cáncer registrados en infantes [128]. Aunque, el neuroblastoma no es considerado uno de los casos más comunes de cáncer registrados en Ecuador debido a que la población de niños menores a 3 años no es la más representativa para el país, posee una tasa de mortalidad en niños menores a 1 año de más del 50% [129]. Estas cifras pueden variar

debido a las complicaciones que tienen las actuales formas de tratamientos (cirugía invasiva) en menores de edad [130]. Es por ello, que la baja frecuencia de desarrollo de neuroblastoma sumado a la corta edad de los infantes representa un grave desafío para las quimioterapias colocando como objetivo de los principales centros neuroquirúrgicos, las mejoras de las terapias actuales para disminuir los altos porcentajes de mortalidad [129].

1.1.2. Tratamientos actuales contra el cáncer

El cáncer ha sido considerado una enfermedad radical por lo que la evolución de su tratamiento requirió de medidas exageradas para suplir la falta de eficacia de las terapias. Todos los esfuerzos y avances en el desarrollo de técnicas de diagnóstico y terapias contra el cáncer continúan sin superar la resistencia a los agentes quimioterapéuticos generada tras los tratamientos, alergia a los medicamentos, la especificidad y alta toxicidad de los fármacos. Por lo general, cada uno de estos desafíos se convierten en los desencadenantes de recaídas que pueden empeorar la salud del paciente y aumentar la posibilidad de su muerte [1,4,6,7].

En el siglo XIX, el uso de cirugía invasiva y la medicación de bleomicina durante las quimioterapias, mantuvieron su permanencia como terapia durante décadas a pesar de las graves secuelas que dejaban en los tejidos [17]. La quimioterapia, radioterapia y quimioterapia pueden provocar infertilidad [17,27], los desórdenes del sistema inmunitario [28] y resistencia a los quimioterapéuticos, respectivamente. A pesar de ello, aún son consideradas la primera línea de tratamientos contra el cáncer [1,6,17].

Debido a las falencias de cada uno de las terapias nombradas anteriormente, la búsqueda para el desarrollo de nuevas estrategias nunca se ha detenido, generando así investigaciones con células madre o el uso de biomoléculas activas purificados de animales [15,16]. A medida que el tiempo transcurre y continúa sin aparecer medidas eficaces para los tratamientos se continúa abriendo paso un sinnúmero de investigaciones sobre el cáncer. Dentro de estas estrategias podemos encontrar el uso de modelos de tumores en animales y la inmersión de diversos campos científicos como la inmunología y la biología molecular, los cuales produjeron los actuales tratamientos con inhibidores o pequeños anticuerpos monoclonales [17-19].

El uso de agentes alquilantes, antimetabolitos y moléculas a base de metales aparecieron como opciones de terapia pese a los graves efectos secundarios que producían en el paciente. Sin embargo, la diversidad de tratamientos no se detuvo solamente en la búsqueda de nuevas terapias, sino también en la mejora de las actuales, lo cual llevo a la combinación de varias ellas para conseguir respuestas positivas en la salud del paciente [25].

La diversidad de enfoques que han aparecido para el desarrollo de técnicas en el tratamiento contra el cáncer aún continúa en evolución hasta disminuir el número de limitaciones y efectos secundarios adversos [8,20,21]. En los últimos años, para superar estos retos se puso en desarrollo una estrategia terapéutica potencial, la terapia dirigida [2,8,9]. Esta herramienta se ha convertido en una de las estrategias con potencial actividad farmacológica menos tóxicas que se han podido encontrar [10].

1.1.3. Alternativas a los tratamientos actuales

La demanda de estrategias novedosas para el tratamiento de cáncer incrementó debido a las investigaciones realizadas en la terapia dirigida y la búsqueda de moléculas con efectos farmacológicos favorables [14,23,25,26]. Bajo esta premisa, el desarrollo prototipos de medicamentos para quimioterapias se convirtió en una meta muy prometedora. Dentro de la terapia dirigida, la búsqueda de componentes naturales nuevos es la base primordial para mejorar la terapia tradicional [6,11]. Para ello, se requiere del uso de agentes terapéuticos novedosos con actividades farmacológicas favorables que sean capaces de aumentar la eficacia de los tratamientos [9,13]. Actualmente, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha aprobado varios medicamentos utilizados en las terapias anticancerígenas como la vinblastina y la vincristina que fueron aislados de la *Catharanthus roseus* [32].

Para suplir la falta de eficiencia de las terapias actuales, como lo sería la quimioterapia tradicional, se centró la búsqueda en el uso de recursos naturales para producir componentes moleculares altamente selectivos que puedan ser asimilados por los pacientes de una mejor manera que los componentes sintéticos producidos hasta ahora [31]. Dentro de estas moléculas de importancia investigativa se encuentran las toxinas purificadas de animales, primordialmente de serpientes, escorpiones, abejas y avispa, las cuales han sido ampliamente estudiadas como posibles fuentes de biomoléculas con

potencial activo [2,7,9,12,14]. Por lo que, comienza a aparecer el uso de moléculas aisladas y caracterizadas de los venenos de animales con potencial farmacológico para reducir la toxicidad de las drogas actuales, los efectos secundarios adversos, la resistencia a las drogas, y a su vez, ampliar el repertorio de fármacos usados en las terapias anticancerígenas [1,6,7].

Hoy en día, hay muchos componentes de venenos de animales que han sido utilizados en la elaboración de medicamentos debido a sus amplias y diversas actividades biológicas y farmacológicas. Una de las principales ventajas para utilizar los recursos naturales provenientes de ellos se debe a su toxicidad sobre líneas celulares cancerígenas y su alta afinidad por células y tejidos [23,24]. Esto coloca a los venenos y toxinas de animales como una fuente de recursos terapéuticos debido a la diversidad y funcional de moléculas con actividad sobre el retraso de crecimiento de células, antimicrobianas, antimaláricas, inmunosupresoras y en el desarrollo de drogas contra el cáncer [14,25].

1.1.4. Toxinas

Las toxinas son un recurso fundamental en la búsqueda de moléculas potenciales con fines farmacológicos para líneas celulares cancerígenas, lo que ha involucrado diversas investigaciones de toxinas de venenos en campos de nanotecnología y migración celular [33,34]. Muchas toxinas aisladas de animales exhiben un amplio repertorio de diversas actividades biológicas sobre el ciclo celular [35], venenos de arañas con actividad citotóxica para desórdenes cardiovasculares y desarrollo de analgésicos [39], venenos de escorpiones como fuente de neurotoxinas y agentes antitumorales [37], caracoles marinos como bloqueadores de canales iónicos [38]. Sin embargo, no hay que dejar de lado que hay otras fuentes para obtener proteínas citotóxicas además de las toxinas, los mejores ejemplos serían las plantas y las bacterias que principalmente comparten estudios de agentes antitumorales [43,44].

La aparición de estos recursos naturales como fuentes prometedoras de medicamentos no se hizo esperar. A partir de una toxina aislada del veneno *Bothrops jararaca* se desarrolló un fármaco que se convertiría en el primer inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina autorizado por la FDA [45]. Los venenos de serpientes forman una parte primordial de los recursos de toxinas con potencial terapéutico gracias a que son

considerados mezclas complejas de proteínas con un alto potencial bioactivo en diversos procesos celulares [40]. Por ello, son reconocidos como un recurso de gran importancia en la obtención de compuestos biológicamente activos que son capaces de interactuar de diversas maneras con la célula, por ejemplo: inducción de apoptosis [41], inhibición del desarrollo celular [24] o despolarización de la membrana celular [42]. Su potencial citotóxico está muy relacionado con las alteraciones que pueden realizar las toxinas sobre el metabolismo celular, lo cual las convierte en el eje central de desarrollo de drogas quimioterapéuticas [46].

Los venenos de serpientes se caracterizan por tener una enorme variedad de diferentes componentes que incluyen grandes familias de péptidos en ellas. De entre las familias más importantes de péptidos con aplicaciones farmacológicas sobre líneas celulares encontramos las acetilcolinesterasas, L-ácido amino oxidasas, hialuronidasas, serino proteasas, metaloproteasas y fosfolipasas A₂ [47].

1.1.4.1. Acetilcolinesterasa

Las acetilcolinesterasas se encuentran en su mayor parte en los tejidos y tejidos nerviosos y juegan un papel muy importante en la hidrolización rápida de los neurotransmisores convirtiendo la acetilcolina en colina y ácido acético [48]. A partir de las caracterizaciones que se han realizado de los venenos de serpientes se ha logrado determinar que la familia Elapidae es una de las mayores productoras de enzimas de acetilcolinesterasa [49].

La citotoxicidad de estas enzimas sobre células cancerígenas ha sido muy poco estudiada. A pesar de ello, se ha demostrado que los venenos con mayor porcentaje de estas toxinas afectan al crecimiento y diferenciación de células neuronales. Cabe recalcar, aún se desconoce los mecanismos de por los cuales es tóxico para esta línea celular [87].

1.1.4.2. L-amino oxidasas

Las l-amino oxidasas a pesar de encontrarse en la naturaleza han sido caracterizadas en su mayoría en los venenos de serpientes. Estas enzimas catalizan la oxidación de un l-aminoácido y liberan peróxido de hidrógeno y amoníaco. Han sido descritas en su

mayoría en los venenos de las familias Elapidae y Viperidae, pero se ha demostrado que la familia más rica en estas enzimas es la familia Crotalidae [50,51]. Aunque existen pocas investigaciones realizadas sobre esta familia se ha logrado evidenciar que poseen un amplio repertorio de actividades (citotóxicas, edema, apoptosis, hemorragia, leishmanicida, antibacterial y antiviral) [51].

Dependiendo de la composición del veneno estas enzimas son las más abundantes dentro del veneno. Su capacidad para producir peróxidos libres ha sido de gran importancia investigativa debido a los efectos biológicos que produce sobre las células, como: la inducción de apoptosis. De esta manera, se han utilizado ampliamente en el estudio de neoplasmas gracias a su capacidad antiproliferativa [88, 89, 90], leucemias a través del uso de células de linfoblastos, adenocarcinomas y melanomas demostrando alta capacidad de fragmentación del ADN a través de la liberación de oxígeno reactivo [46,90,91].

1.1.4.3. Hialuronidasas

Estas enzimas se encuentran presentes en varios venenos de animales, tales como serpientes [115], escorpiones [116] y abejas [117], además de secreciones de bacterias [118], hongos [119] e incluso nemátodos [120]. Las hialuronidasas son capaces de degradar el hialuronato y las responsables de una actividad que se conoce como factor de dispersión, la cual facilita el paso de estas enzimas a través de la matriz extracelular de las células durante el envenenamiento de una serpiente [121,122]. A pesar de los pocos hallazgos relacionados a su actividad citotóxica sobre líneas cancerígenas y su baja efectividad sobre el crecimiento de tumores, no se ha descartado su uso en el cáncer de mama. Esto debido a que los niveles de hialuronato suelen ser indicadores de la agresividad del cáncer y su interacción con la matriz celular a través de las glicoproteínas transmembranas celulares, llamadas CD44 [114].

1.1.4.4. Serino proteasas

Las serino proteasas son las encargadas de catalizar la ruptura de los enlaces peptídicos en las proteínas y tienen diversos roles en los procesos de regulación de la inflamación y coagulación sanguínea [52]. Debido a ello han sido candidatas excelentes en el desarrollo de fármacos para tratar desordenes de coagulación sanguínea [53]. Por

lo general, se encuentran en mayores cantidades en las familias Viperidae, Crotalidae y Elapidae [54,55,56].

De la misma manera que ocurre con las acetilcolinesterasas, existe una limitada información in vivo e in vitro sobre los efectos en líneas celulares tumorales [94]. Pero, de manera general, al igual que las metaloproteasas son capaces de interactuar con la matriz de las células produciendo metástasis y angiogénesis [92,93]. Se ha podido registrar serino proteasas aisladas de serpientes con actividades similares a la calicreína humana que han sido descritas como unas proteasas con gran actividad anticancerígena [95].

1.1.4.5. Fosfolipasas A_2

Las fosfolipasas A_2 tienen la capacidad de hidrolizar glicerofosfolípidos por lo que juegan roles muy importantes en la permeabilidad de la membrana liberando de esta manera ácidos grasos y lisofosfolípidos lo que facilita la digestión de la presa [45]. Se ha demostrado que se encuentra presente en las familias Viperidae y Elapidae [60].

Además de los efectos miotóxicos de los que son responsables las fosfolipasas gracias a su capacidad de hidrolizar los fosfolípidos de membrana, se ha estudiado la actividad citotóxica que posee. Las isoformas de PLA_2 que son llamadas miotóxicas han sido muy usadas en líneas celulares de leucemia, melanoma y cáncer de mama gracias a su capacidad de producir apoptosis y citotoxicidad [64]. Como se ha demostrado en diversos estudios algunas fosfolipasas aisladas de especies como *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* demuestran no ser dependientes del tipo de línea celular sobre el que actúen gracias a sus diversos mecanismos de interacción con la célula [66, 96]. Al mismo tiempo, las PLA_2 purificadas del veneno y péptidos derivados de las regiones que otorgan la capacidad citotóxica han sido ampliamente estudiados debido a su gran capacidad citotóxica y antimicrobiana [97,98,99].

1.1.4.6. Metaloproteasas

Las metaloproteasas son la familia proteolítica más grande dentro de los venenos de serpientes y se las puede encontrar en su mayoría dentro de las familias Crotalidae y Viperidae. [45] Son enzimas dependientes de Zn^{2+} y gracias a ello tienen su principal rol

en las proteínas de la superficie celular promoviendo la ruptura de los capilares y favoreciendo la hemorragia en las presas que son víctimas de esta familia de enzimas [58,59].

Varios estudios previos han demostrado que esta clase de toxinas pueden producir apoptosis en células endoteliales y, aunque se ha visto que, cuando se merma la actividad proteolítica muchas veces pierden esta facultad apoptótica, hay casos en los que esta actividad continúa, como sería el caso de las metaloproteasas con múltiples dominios [100]. A pesar de que no se ha elucidado por completo el proceso por el cual estas biomoléculas producen la muerte de células endoteliales y epiteliales, se cree que hay una asociación entre el corte que se realiza en la interacción de la matriz celular con su supervivencia, lo cual no permite el anclaje molecular por parte de las células y se produce la apoptosis [101,102].

La diversidad de metaloproteasas ha provocado que se aborde estas toxinas desde diversos enfoques. Las toxinas del tipo I y III son las más representativas dentro del veneno de serpientes. Las metaloproteasas tipo I son menos hemorrágicas que las metaloproteasas tipo III. [104,105]. Las clases de estas proteínas se pueden diferenciar por el tipo de dominio que posee, tipo I un dominio, tipo II un dominio de metaloproteasas seguido por uno de desintegrina y tipo III con un dominio de metaloproteasa catalítica dependiente de zinc, desintegrina y un dominio rico en cisteína. Esta última, gracias a los diversos dominios que posee, como sería el caso de las desintegrinas, ha sido ampliamente estudiada sobre la adhesión y migración de células de cáncer de mama [58, 103].

1.1.5. *Bothrocophias en Ecuador*

La caracterización de venenos se considera una base en la búsqueda de moléculas con alto potencial farmacológico y descubrimiento y diseño de novedosos fármacos con diversas actividades biológicas [64-68]. Existen muchas toxinas que han sido aisladas a partir de venenos de serpientes y caracterizadas de acuerdo a los tipos de actividades que posea, como antiparasitaria, antimicrobiana y con actividades antitumorales y citotóxicas [69,70]. En 2001, el género *Bothrocophias* se separó del género *Bothrops* y comenzó como un clado independiente. Pronto, se añadieron 4 especímenes al clado independiente *Bothrocophias campbelli*, *B. hyoprurus*, *B. microphthalmus* y *B. myersi*, y

más tarde se uniría *B. andianus*, *B. colombianus* y *B. lojanus* [71]. A pesar de que, hasta la fecha, su género ha sido pobremente caracterizado se cuenta con diversos estudios relacionados a sus diversas actividades toxicológicas, siendo la actividad miotóxica la más recurrente entre los especímenes que conforman el género, provocando mionecrosis [61,62].

Actualmente el género *Bothrocophias* no ha sido del todo explorado en Ecuador, teniendo hasta ahora solo dos estudios de venómica referentes a *Bothrocophias myersi* y *Bothrocophias campbelli* en el país [61, 62]. Por lo que, la caracterización funcional de toxinas del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* (BM) representa una adición a la falta de información sobre las especies de este género y cubrirá el primer reporte realizado en esta especie.

1.2. Planteamiento del problema

El cáncer es un creciente problema de salud pública mundial que consta de terapias limitadas. Además, la resistencia a los agentes quimioterapéuticos, la especificidad de los medicamentos, la alta toxicidad de los fármacos y las altas dosis que deben ser suministradas en los tratamientos provocan que las terapias actuales tengan graves efectos secundarios adversos sobre los pacientes [1,6,7,24]. Los tratamientos más comunes para combatir el desarrollo del cáncer son la cirugía invasiva [72] y la quimioterapia [73]. Desafortunadamente, estas terapias provocan problemas a largo plazo en sus pacientes y, eventualmente, se volverán más susceptibles al desarrollo de tumores en su cuerpo [74].

El neuroblastoma es un cáncer sólido común en la población infantil y tiende a desarrollarse en niños menores a un año de edad. En Ecuador, se registran tasas de mortalidad de 50% para infantes que padecen esta enfermedad. Aunque su incidencia no es tan representativa como otros tipos de cáncer que asedian al país, las complicaciones que tienen los tratamientos actuales (cirugía invasiva) pueden aumentar las posibilidades de muerte en niños [127-130].

La situación actual implica que el cáncer continuará siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. Dado que los tratamientos actuales aún pueden mejorarse o reemplazarse, como es el caso de la cirugía invasiva y la quimioterapia tradicional, la

búsqueda de moléculas con alto potencial biológico derivadas de recursos naturales supone un paso importante en la obtención de un fármaco [4,6,8]. El interés por obtener moléculas con potencial biológico citotóxico a partir de recursos naturales se ha centrado en las toxinas de serpientes, las cuales demostraron tener un amplio rango de actividades farmacológicas [1,57,75-76].

Por lo consiguiente, los hallazgos que se han realizado sobre la actividad citotóxica en líneas cancerígenas de las toxinas aisladas de venenos de serpientes garantizan la relevancia de continuar con la búsqueda de moléculas prometedoras que mejoren la eficiencia de los tratamientos actuales [2,23,25]. *Bothrocophias microphthalmus* es una serpiente que se puede encontrar en Ecuador y pertenece a uno de los géneros de serpientes pobremente estudiados dentro de la literatura [61,62]. En consecuencia, el estudio se centrará en la búsqueda de toxinas citotóxicas de una serpiente del género *Bothrocophias* para demostrar el potencial de los venenos de serpientes en el tratamiento del cáncer [37,43-44] y, a su vez, aumentar la cantidad de información que se tiene sobre serpientes del país.

1.3. Justificación de la investigación

El potencial farmacológico de compuestos bioactivos de los venenos de serpientes ha sido ampliamente estudiadas y descritas en la literatura [1,2,37,43]. Se considera a los venenos de serpientes como un coctel de moléculas potencialmente activas con un alto valor farmacológico gracias a su amplio repertorio de actividades citotóxicas sobre líneas celulares [1,75-75]. A pesar de que Ecuador posee una amplia diversidad de serpientes (237 especies), de acuerdo a las registradas en la página web “Reptiles del Ecuador”, hay muy pocos o nulos estudios sobre caracterización de sus venenos y su potencial farmacológico en actividad cancerígena [135]. Como resultado, se recalca la importancia de caracterizar venenos de serpientes del país para ofrecer más información sobre moléculas potenciales con actividades farmacológicas de gran interés.

El tratamiento de neuroblastoma con venenos de serpientes no ha ampliamente explorado en el mundo. Sin embargo, la actual tasa de mortalidad (50%) y las complicaciones que conlleva realizar cirugía invasiva a menores de 3 años de edad puede aumentar este número considerablemente [129,130]. Por ello, la evaluación de

la citotoxicidad de los venenos de serpientes sobre la línea celular SH-SY5Y es de vital importancia para encontrar moléculas prometedoras. Entre ellos, los péptidos aislados de *Bothrops jararaca* [132], las fracciones purificadas del veneno de *Protobothrops flavoviridis*, así como el veneno crudo [133], péptidos de bajo peso molecular aislados de *Bothrops jararaca* [134] y fosfolipasas A₂ dentro del veneno de *Naja sumatrana*, que si bien, mostraron una citotoxicidad menor que el veneno crudo ofrecen un primer acercamiento al descubrimiento de moléculas prometedoras [108].

En este contexto, el veneno de *Bothrocophias microphthalmus*, ha sido muy poco estudiado en la literatura y su perfil bioquímico, así como la caracterización de sus toxinas no ha sido investigado. Por lo tanto, la caracterización de las toxinas del veneno en la búsqueda de compuestos citotóxicos para la línea celular SH-SY5Y implica una oportunidad de descubrir moléculas con alto valor biomédico [1,6,8].

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la acción citotóxica de las toxinas aisladas de *Bothrocophias microphthalmus* sobre la línea celular SH-SY5Y y eritrocitos humanos.

1.4.2. Objetivos específicos

- Demostrar el potencial citotóxico del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* sobre la línea SH-SY5Y y eritrocitos humanos.
- Purificar y caracterizar las toxinas más abundantes del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*
- Identificar los componentes del veneno con actividad citotóxica y su efecto hemolítico.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Venenos

Las muestras de veneno de *B. microphthalmus* fueron obtenidas de serpientes adultas de la Amazonía ecuatoriana bajo los permisos del MAE, MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115. Para la obtención del veneno se realizó el procedimiento descrito por Salazar-Valenzuela [62]. El veneno recolectado se colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL y se deshidrató al vacío con sulfato de calcio anhidro. La muestra deshidratada se almacenó a -20 °C hasta su caracterización.

2.2. Métodos

2.2.1. Evaluación del potencial citotóxico del veneno

2.2.1.1. Descongelamiento y cultivo de la línea celular

La línea celular estaba congelada con DMSO, por lo cual, el descongelamiento se realizó gradualmente. La línea celular se mantuvo en bloques fríos mientras se preparaba el frasco estéril de 25 cm² con filtro ventilado en la tapa. Se centrifugó la línea celular en un tubo cónico de 15 mL a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C. Luego se eliminó el medio sobrenadante y se resuspendió las células en 1 mL de medio RPMI. Las células se cultivaron en un frasco con 20 mL de medio RPMI suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS), 1 mM de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina, 40 mM de HEPES y 2mM de L-glutamina. La línea celular SH-SY5Y (neuroblastoma de tumor óseo ATCC® CRL-2266) fue mantenida a 37°C con 5% CO₂ y cosechadas al 90 % de confluencia.

2.2.1.2. Mantenimiento y replique de la línea celular

Para observar la confluencia y mantener un seguimiento del medio se observó en el microscopio invertido el estado de la línea celular. Se realizó un cambio de medio cada dos días. Para ello, se centrifugó el medio de los frascos a 1500 rpm durante 10 min a 37 °C y, se resuspendieron en 1 mL de medio. En un frasco nuevo y estéril se colocó el

1 mL de medio en conjunto con 20 mL de medio RPMI suplementado. El cultivo se suplementó con 1% de penicilina/estreptomicina. Los subcultivos celulares se realizaron cuando se alcanzó una confluencia cercana al 90% mediante la adición de 300 µL de tripsina y una espátula estéril. Los repliques realizados alcanzaron la novena generación hasta obtener la cantidad de células/mL necesarios para los ensayos.

2.2.2. Ensayos MTT

2.2.2.1. Cosecha de las células

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron mediante el ensayo colorimétrico MTT. Para ello, se cosecharon las células con una confluencia cercana al 90% y se alcanzó una concentración de 3×10^4 células/mL de la línea celular. Por ello, se colocó 10 µL de medio en una cámara de Neubauer para medir la concentración de células/mL. El contenido de los frascos se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 37°C y tras realizar los cálculos se decidió resuspender las células en 15 mL de medio DMEM, véase la Ec.1. El medio se mantuvo en bloques de hielo hasta ser depositado en una microplaca de 96 pocillos. La microplaca de 96 pocillos se cargó con 130 µL de medio DMEM con células y se esperó una aclimatación de 1 h antes de continuar con el ensayo.

$$Ec. 1 : C = \frac{n}{10} * 25 * 10^4$$

Donde;

C=Concentración de células/mL

n= número de células observadas en la cámara Neubauer

2.2.2.2. Adición de las fracciones, veneno crudo, MTT y SDS

Las fracciones y el veneno crudo se evaluaron en las concentraciones finales de 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 µg/mL disueltos en PBS. Una vez se aclimataron las células, se adicionó las fracciones y el veneno crudo por triplicado en la microplaca de 96 pocillos y se dejó en incubación a 37°C con 5% CO₂ durante 24 h. Posteriormente, alcanzadas

las 24 h se añadió 30 µL de MTT y se dejó incubar nuevamente a 37 °C con 5% CO₂ durante 3h. Después, se añadió 30 µL de SDS al 20% y se procedió a realizar la lectura en un lector de microplacas a 600 nm. El control negativo constó de 130 µL de medio DMEM con células y el control positivo tenía una concentración final de doxorubicina de 50 mM, ambos por triplicada. Se tomó el control negativo como el 100% de la viabilidad celular para los cálculos del % de viabilidad celular media y se usaron las medias y la desviación estándar de las absorbancias obtenidas.

2.2.3. Ensayos hemolíticos

Para la realización de los ensayos hemolíticos se preparó una solución de eritrocitos al 4% (v/v) en 50 mL de PBS 1x autoclavado. Se colocó en varios eppendorfs 200 µL de cada una de las concentraciones usadas en los ensayos de viabilidad celular para las fracciones y el veneno crudo, por triplicada, y 200 µL de la solución de eritrocitos al 4%. El control negativo usado se preparó con 200 µL de eritrocitos al 4% y 200 µL de PBS 1x. Mientras que, el control positivo contenía 200 µL de eritrocitos al 4%, 195 µL de PBS 1x y 5 µL de Tritón X-100. Cada uno de los eppendorfs se incubó durante 2 h a 37 °C y después, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Se tomaron 200 µL del sobrenadante y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos para su lectura a 570 nm en el lector de microplaca (GloMax® Discover, Promega). Se tomó el control positivo como el 100% de hemólisis y se usó el control negativo para la obtención del % de hemólisis, véase la Ec.2.

$$(Ec. 2) \%H = \frac{DO - DO_0}{DO_x - DO_0} * 100$$

Donde;

%H: porcentaje de hemólisis

DO: Valor de la densidad óptica de la concentración de las fracciones y el veneno crudo

DO₀: Densidad óptica del control negativo

DO_x: Densidad óptica del control positivo

2.2.4. Fraccionamiento del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* por RP-HPLC

Para el análisis por RP-HPLC, se disolvió 3 mg de veneno desecado en 200 µL de buffer de muestra (0,05% TFA, 5% ACN y 99,45% agua) y se homogenizó en un vórtex durante 2 min. La muestra se colocó en una centrifuga (DLAB) durante 10 min a 13000 rpm. Después se recolectó 200 µL de sobrenadante para la inyección en una columna C18 de HPLC Discovery Bio Wide Pore (250x4 mm, tamaño de partícula 5 µm). Se utilizó un gradiente lineal con una elución de 1 mL/min de solvente A (0,1% TFA) y solvente B (acetonitrilo y 0,1% TFA) durante 100 min. Se monitoreó el fraccionamiento a 214 nm y las fracciones se colectaron manualmente. Se colocó cada una de las fracciones recogidas en el liofilizador (BenchTop Pro) y se repitió este procedimiento hasta obtener suficiente cantidad de muestra para los siguientes ensayos.

2.2.5. Cromatografía de las fracciones

La cromatografía de las fracciones purificadas por RP-HPLC se realizó con 200 µg de cada una de ellas disueltas en 200 µL de buffer de muestra (0,05% TFA, 5% ACN y 99,45% agua) y se homogenizó en vórtex durante 2 min. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 13000 rpm y se recolectó 200 µL de sobrenadante para inyectar en una columna C18 de HPLC Discovery Bio Wide Pore. El gradiente de elución fue de 1 mL/min del solvente A (0,1% TFA) y solvente B (acetonitrilo y 0,1% TFA) durante 100 min. La corrida cromatográfica se realizó a 214 nm y se recolectó cada una de las fracciones de forma manual. Se utilizaron las absorbancias de cada una de las corridas para obtener el porcentaje de pureza de las fracciones.

2.2.6. Electroforesis

Se sometieron a electroforesis las fracciones con mayor área bajo la curva obtenidas por RP-HPLC y con cantidad de material liofilizado adecuado. Para la separación en gel de poliacrilamida en una cámara vertical (Thermo Scientific™) se disolvió 100 µg de cada una de las fracciones liofilizadas en 45 µL de buffer de carga (0,075 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% (v:v) glicerol, 4% (m:s) SDS, 0,001% (m/v) azul de bromofenol). La electroforesis se realizó en condiciones reductoras con presencia de DTT utilizando una

concentración de 5% para el gel de apilamiento y 12.5% para el gel de corrida. La separación se realizó a 30 mA durante los primeros 15 min, luego a 70 mA durante los próximos 30 min y, por último, se subió a 120 mA a temperatura ambiente. Las bandas se tiñeron con 0,2% de azul de Comassie (Blue brilliant R-250) durante toda la noche, se decoloró el gel con 40% metanol y 10 % ácido acético (decolorante) y se eliminó el excedente de decolorante con agua. Se utilizó Runblue Tricolor (Novus biologicals a biotechne Brand) como marcador de peso molecular.

2.2.7. Evaluación del potencial citotóxico de las toxinas más abundantes

El mismo protocolo descrito para el análisis de la actividad citotóxica del veneno crudo fue empleado para caracterización del efecto citotóxico de las proteínas de mayor abundancia del veneno de *B. microphthalmus*.

2.2.8. Actividad hemolítica de las toxinas mayoritarias

El efecto de las toxinas aisladas por RP-HPLC en la membrana de eritrocitos fue evaluada de acuerdo a la metodología descrita en la sección de hemólisis para el veneno, usando las mismas concentraciones de los ensayos de citotoxicidad sobre la línea SH-SY5Y

2.2.9. Ensayos enzimáticos

Las fracciones de interés purificadas por RP-HPLC e identificadas por electroforesis fueron sometidas a la evaluación de su actividad enzimática, al igual que el veneno total. El veneno de *B. microphthalmus* se evaluó en las actividades serinoproteasa, caseinolítica y fosfolipásica mediante el uso de los sustratos cromogénicos BapNa, azocaseína y NOBA, respectivamente. Por otro lado, gracias a los tiempos de retención obtenidos tras la purificación por RP-HPLC para las fracciones y el peso molecular de las bandas observadas en el gel de electroforesis se evaluó solo la actividad caseinolítica para las 3 fracciones. La actividad enzimática se midió en un lector de microplacas multipocillo Versamax 190 (Promega). Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y cada una de las lecturas se expresó en porcentajes como la media + la desviación estándar.

2.2.9.1. *Actividad serinoproteasa*

La actividad serinoproteasa del veneno total se determinó usando L-BapNa (Sigma-Aldrich) como sustrato cromogénico. Por ello, se disolvió el veneno en tampón A (10 mM Tris HCl, 1 M CaCl₂, 10 mM NaCl, pH 7.8) en una concentración de 1 mg/mL. La solución sustrato se preparó disolviendo 1,0464 mg BapNa en 1188 µL de tampón B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) y 12 µL de DMSO. Se cargó la microplaca de 96 pocillos con 50 µL de buffer, 20 µL de veneno y 200 µL de sustrato y luego, se dejó incubar a 37°C durante 30 min. El blanco fue cargado en la microplaca con 70 µL de buffer y 200 µL de BapNa y se utilizó para corregir los valores de absorbancia. La lectura de la actividad se realizó a 405 nm posterior a la incubación y 20 min después de la primera lectura. La actividad específica se determinó de acuerdo a Patiño [124].

2.2.9.2. *Actividad caseinolítica*

La actividad caseinolítica se midió para el veneno crudo y para las fracciones purificadas por RP-HPLC usando azocaseína como sustrato cromogénico. Las fracciones y el veneno crudo se diluyeron en una relación 1 mg/mL en tampón B. Por otro lado, la preparación de la solución sustrato se preparó diluyendo 7,5 mg de azocaseína en 1500 µL de tampón B. Se cargó en varios eppendorfs de 1,5 mL con 10 µL de veneno y 90 µL de azocaseína para su incubación a 37°C durante 90 minutos. Posteriormente se añadió 200 µL de 5% ácido tricloroacético y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos. Se tomaron 150 µL de sobrenadante y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos a la cual se le agregó 150 µL de 0.5 M NaOH. Las lecturas se realizaron a 450 nm y la actividad proteolítica se corrigió mediante los valores obtenidos por el blanco (10 µL buffer y 90 µL de azocaseína). La actividad se determinó usando una unidad de actividad como la cantidad de veneno responsable de cambiar 0,005 unidades de absorbancia [124].

2.2.9.3. *Actividad fosfolipasa A₂*

El veneno total se usó para evaluar la actividad fosfolipásica mediante el uso de NOBA (Sigma-Aldrich) como sustrato cromogénico. Para ello, la solución sustrato se preparó disolviendo 0,341 mg de NOBA en 110 µL de acetonitrilo y 1100 µL de tampón B. El veneno crudo fue disuelto en buffer B en una relación 1 mg/mL. Se cargó una microplaca

de 96 pocillos con 200 μ L de sustrato, 20 μ L de las fracciones y 20 μ L de buffer y se incubó a 37°C en el lector de placas. El lector midió la actividad a 405 nm y se tomaron las absorbancias cada 10 minutos desde la finalización de la incubación hasta tener 5 lecturas. El blanco cargado en la placa tenía 20 μ l agua destilada y 220 μ l de solución sustrato y se usó para corregir los valores de absorbancia. Los valores de actividad se determinaron usando un cambio en la absorbancia de 0,10 unidades para la producción de 25,8 nmoles de cromóforo [124].

2.2.10. Espectrometría de masas

La determinación de la masa molecular se realizó por espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI) usando una columna UPLC C-18 (phenomenex C-18; 4,6 x150 mm) del sistema acoplado UPLC Xevo G2-XS-QTOF de la marca Waters. Se usó 100 μ g de la fracción 18 purificada por RP-HPLC disuelta en 30 μ l de una solución agua y acetonitrilo (50%) y se inyectaron 10 μ L de la muestra. La fracción se evaluó en un gradiente lineal de 99 % de tampón A, compuesto por agua y 0,01% ácido fórmico, y 1% de tampón B, acetonitrilo y 0,01% ácido fórmico durante 24 min a un flujo de 300 μ L/min con una presión de 1500 psi. La espectrometría de masas con tiempo de vuelo cuadripolar (MS-QTOF) utilizó 0,50 kV de capilaridad a una temperatura de solvatación de 450 °C y con un flujo de gas de solvatación de 900 L/h en modo continuo. El rango de recorrido espectral utilizado fue de 500 a 1700 m/z en condiciones de escaneo continua a 0.1 segundos. El modo de adquisición se encontraba en polaridad positiva y el análisis se realizó en modo sensibilidad con una rampa de colisión de alta energía de 20 a 40 V.

2.2.11. Análisis estadístico

Para el tratamiento de los resultados se empleó un análisis de varianza de una cola (ANOVA), a su vez, que se realizó un análisis de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Se utilizó el programa Graphpad Prism 9 para realizar los análisis y obtener las gráficas.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Actividad citotóxica del veneno

El veneno crudo posee un fuerte efecto citotóxico sobre SH-SY5Y en todas las concentraciones evaluadas, mostrando ser una valiosa fuente de posibles arquetipos moleculares con actividad anticáncer. Se observó una elevada toxicidad del veneno incluso en las concentraciones más bajas (12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$), véase la figura 1-12 y se obtuvo valores muy cercanos a nuestro control positivo (doxorubicina). Estos resultados demuestran la capacidad de convertirse en un principal recurso biológico, fuente de agentes quimioterapéuticos.

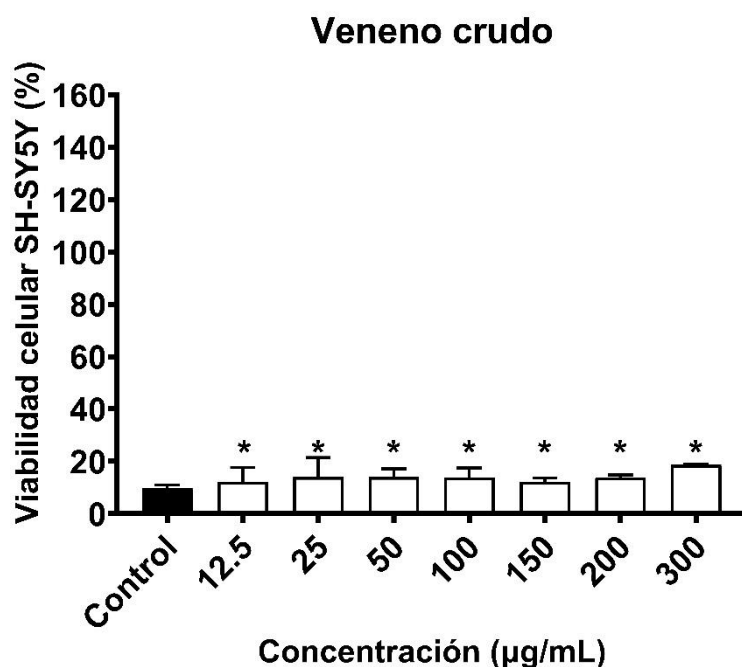


Figura 1-12: Efecto del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* sobre la línea celular SH-SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y fue cultivada con 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 ($\mu\text{g/mL}$) del veneno crudo. Las diferencias significativas (*) en la viabilidad celular se realizaron tomando el control negativo como el 100% de la viabilidad celular y se determinaron por un análisis de ANOVA ($p < 0.05$). El control positivo mostrado en la figura corresponde a doxorubicina.

Por otro lado, aunque la citotoxicidad del veneno sobre la línea celular sea elevada, aún es necesario comprobar su capacidad para dañar células normales. La evaluación del veneno no mostró un efecto hemolítico significativo en las mismas concentraciones evaluadas para el ensayo citotóxico. Estos resultados demuestran que no hubo daño en las membranas de los eritrocitos (figura 2-12) y abre paso a la caracterización de las toxinas del veneno para aislar la toxina encargada de la citotoxicidad sobre SH-SY5Y.

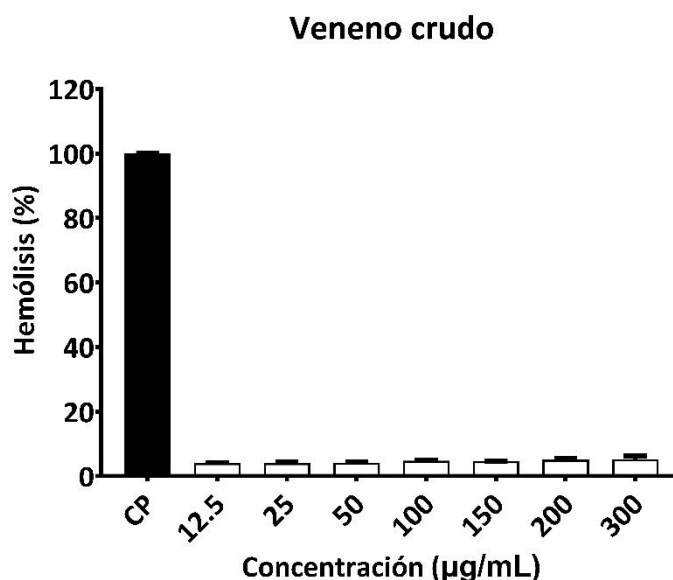


Figura 2-12: Ensayos de hemólisis del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*.

El veneno crudo no mostró un efecto hemolítico significativo en las concentraciones evaluadas, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 (µg/mL). Se utilizó como control positivo a Tritón X-100 como el 100% de hemólisis. Ninguna de las concentraciones evaluadas logró superar el 7% de porcentaje de hemólisis.

3.2. Perfil bioquímico del pool de veneno de *Bothrocophias microphthalmus*

Tomando en cuenta la prometedora actividad citotóxica del veneno se llevó a cabo la separación cromatográfica a fin de obtener las toxinas aisladas para los posteriores análisis biológicos. La caracterización del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* por RP-HPLC mostró 19 fracciones que eluyeron en un tiempo total de 100 minutos (figura 3-12). Las toxinas fueron colectadas de acuerdo con la absorbancia y su tiempo de retención. De esta manera, los picos con mayor absorbancia fueron aquellos que se recogieron a partir del minuto 70. En primera instancia, se observaron 3 fracciones de la corrida cromatográfica del veneno que poseen las absorbancias y áreas bajo la curva

más elevadas, lo cual recae en que sean las toxinas purificadas con mayor peso tras liofilizar los picos recogidos de la separación cromatográfica (tabla 1-1). Se liofilizó en total 5,7 mg para la fracción 13, 6,1 mg para la 14 y 4,1 mg para la 18. La fracción 3 presenta alta absorbancia, pero no se obtiene cantidad de material suficiente para su caracterización posterior a la liofilización de la muestra.

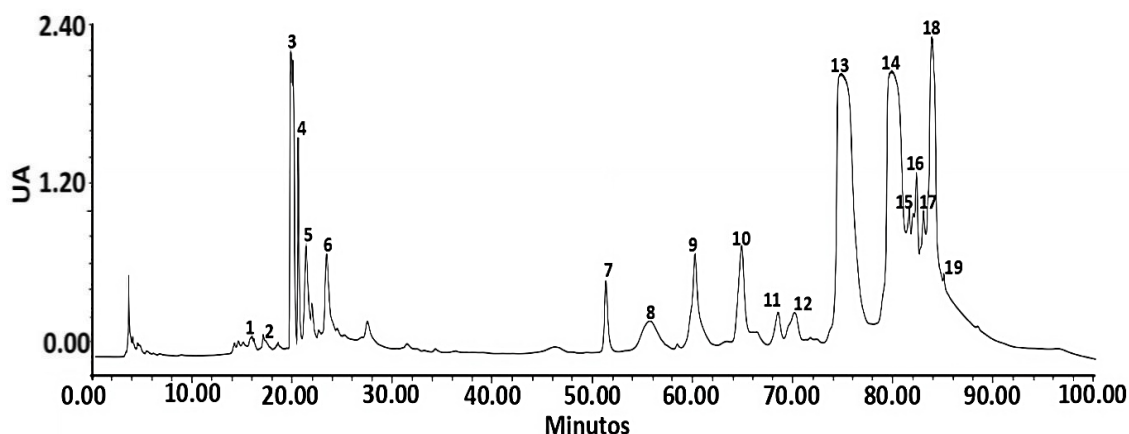


Figura 3-12: Perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC del veneno de la serpiente *Bothrocophias microphthalmus*.

Se observan 19 fracciones que se recolectaron a lo largo de 19 corridas cromatográficas durante 100 minutos. La corrida de RP-HPLC se monitoreó a 214 nm.

Para la separación cromatográfica se disponía de 57 mg de un pool del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*. Así se logró realizar un total de 19 RP-HPLC que representaron tras la liofilización un total de 15,9 mg de proteínas purificada. Tras integrar el área bajo la curva para determinar la abundancia de cada una de las fracciones recolectadas se observó que 3 de las fracciones representaban más del 60% de todo el veneno (figura 4-12). Por ello, se decidió continuar con la purificación del veneno hasta alcanzar 4 mg toxina liofilizada para los siguientes ensayos.

Tabla 1-1: Cantidad de toxina liofilizada obtenida de las fracciones purificadas por RP-HPLC.

Fracción	Área	Fracción liofilizada (mg)
13	246423495	5,7
14	228866701	6,1
18	141243222	4,1

Realizada por: Carbonelly, Emilio, 2022

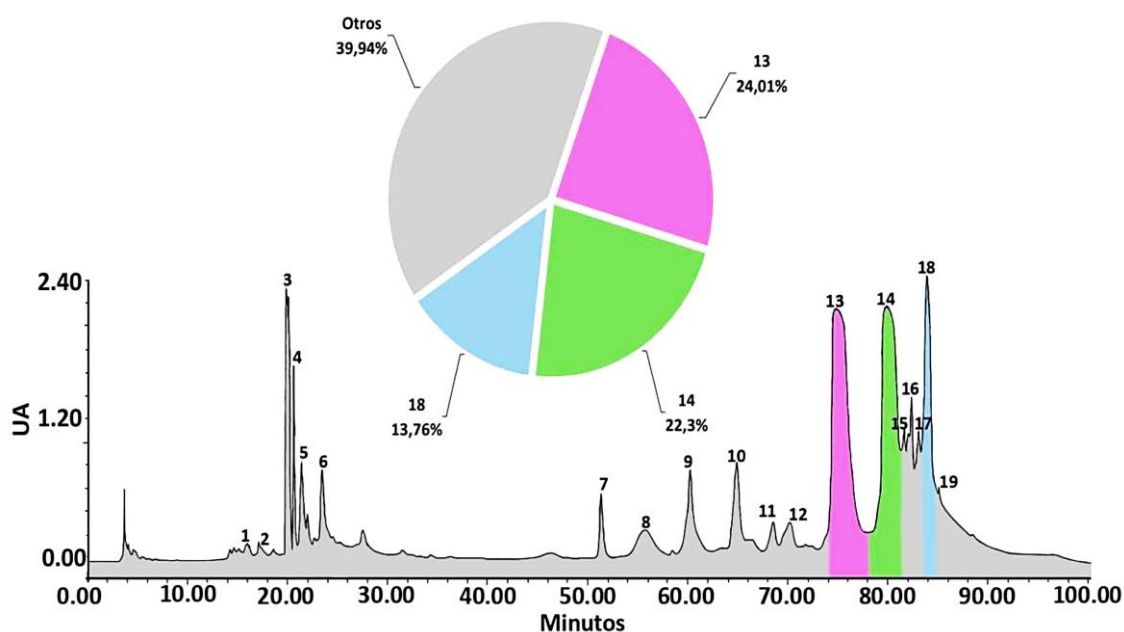


Figura 4-12: Comparación de la absorbancia entre las fracciones purificadas por RP-HPLC.

Se observa los 3 picos en el cromatograma con mayor absorbancia y sus porcentajes con respecto a la corrida cromatográfica total.

La caracterización bioquímica se realizó de las 3 fracciones con mayor abundancia y material liofilizado. El análisis de peso molecular por SDS-PAGE unidimensional reveló una masa molecular para la fracción 13 y 14 de alrededor de 57 kDa y la fracción 18 con un peso alrededor de 24-28 kDa. Los resultados indican una presencia de bandas correspondientes a PIII-SVMP y LAAO para las bandas alrededor de 57 kDa (13,14) y PI-SVMP con 24-28 kDa (18). La identificación de estas familias se realizó con la ayuda del tiempo de retención de cada familia y su elución en RP-HPLC y la masa correspondiente en el gel de electroforesis (figura 5-12). De esta manera, se muestra

que la elución en los últimos minutos de la corrida cromatográfica corresponde a las moléculas con mayor absorbancia e hidrofóbicas que, a su vez, sugieren una mayor presencia de metaloproteasas con respecto al resto de toxinas en la familia.

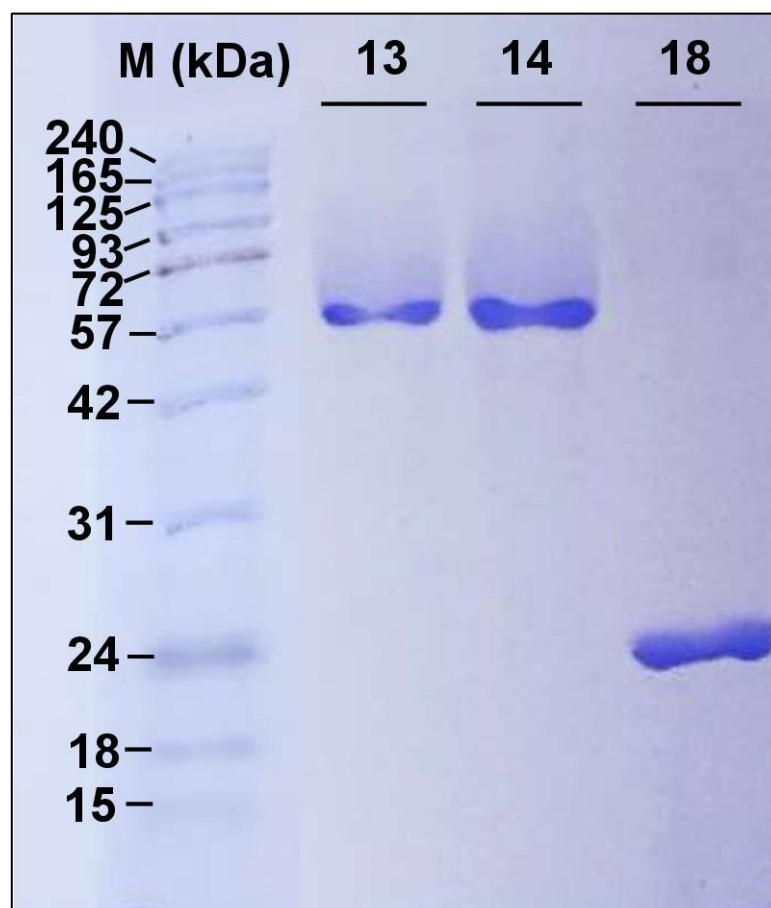


Figura 5-12: Peso molecular de las fracciones obtenidas por RP-HPLC con mayor absorbancia por SDS-PAGE.

Los geles de electroforesis se realizaron en condiciones reductoras para las fracciones 13, 14 y 18. Se muestra en la primera banda el marcador de peso molecular en kDa.

3.3. Cromatografía de alta resolución

Para comprobar la homogeneidad y el porcentaje de pureza de cada una de las fracciones purificadas por RP-HPLC se realizó una cromatografía por RP-HPLC a las mismas condiciones en las que se fraccionó el veneno crudo de *B. microphthalmus* mostrando así unos porcentajes de pureza para la F13 de 97.02%, F14 de 96.25% y

F18 de 95.77 % para los respectivos picos. Los picos observados eluyeron en los mismos tiempos en los que se recogieron en el fraccionamiento del veneno crudo. Estos valores de pureza coinciden con la presencia de una única banda en el gel electroforético (figura 6-12).

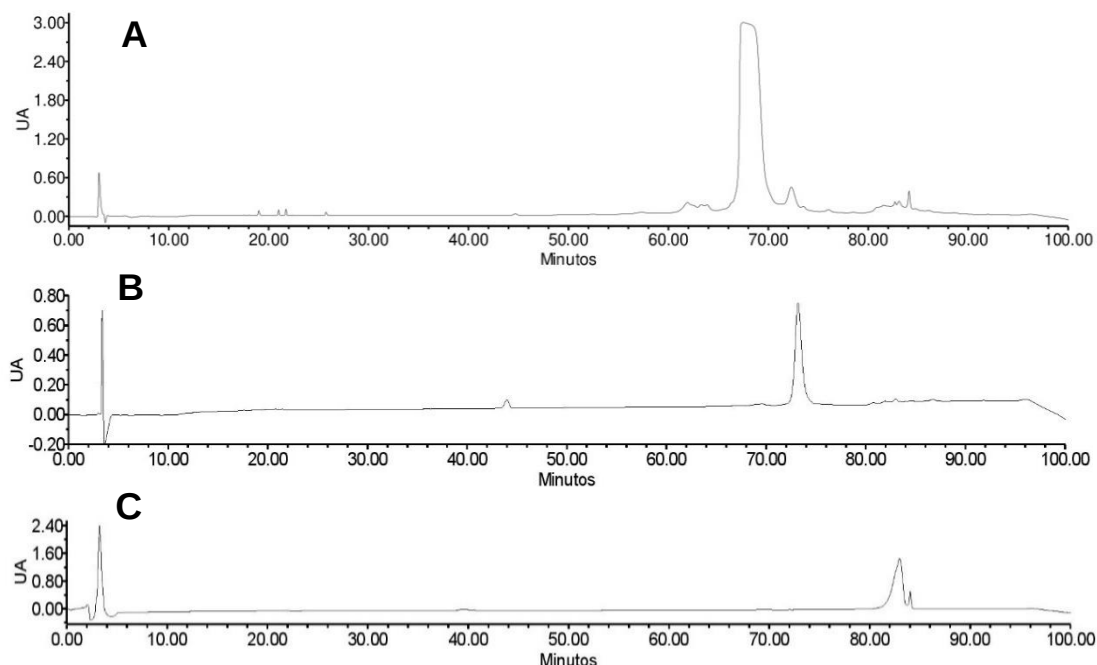


Figura 6-12: Cromatografía por RP-HPLC de las fracciones purificadas F13 (A), F14 (B) y F18 (C).

Se realizó una cromatografía por RP-HPLC a las mismas condiciones en las que se realizó el fraccionamiento inicial del veneno de *B. microphthalmus*.

3.4. Efecto citotóxico de las toxinas purificadas

Los ensayos de viabilidad celular también se realizaron para las 3 fracciones purificadas del RP-HPLC, 13, 14 y 18. Se observó que, para la fracción 13 y 14 no hubo diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad celular (figura 7A-12, 7B-12). En contraste, las concentraciones más altas para F18 mostraron una ligera actividad citotóxica, con un 62% de inhibición de la viabilidad celular para la concentración más alta (figura 7C-12). El control positivo, doxorrubicina redujo significativamente la viabilidad celular de SH-SY5Y.

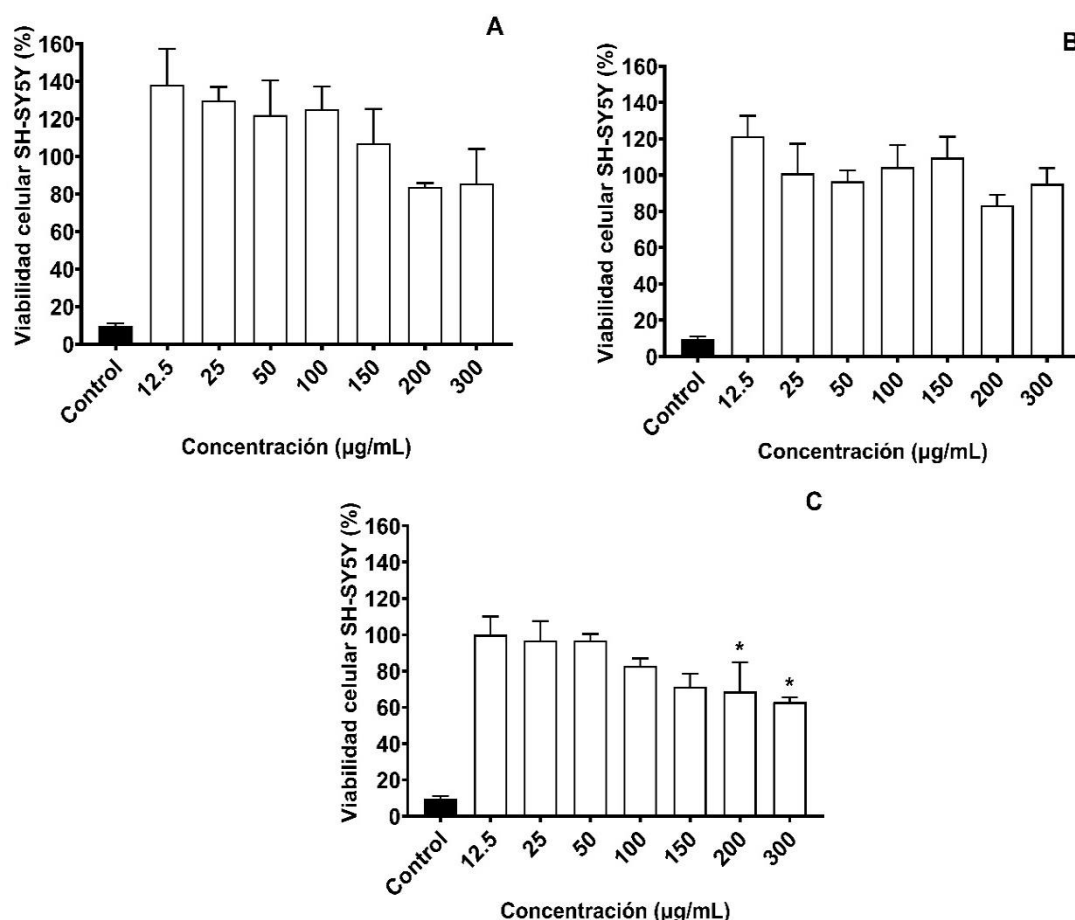


Figura 7-12: Efecto de las fracciones 13,14 y 18 de *Bothrocophias microphthalmus* sobre la línea celular SH-SY5Y.

(A) F13, (B) F14, (C) F18 fueron cultivadas con 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 (µg/mL) de las 3 fracciones. Las diferencias significativas en la viabilidad celular comparadas al control negativo se determinaron por un análisis de ANOVA ($p < 0.05$) y se representan por *. Se usó el control negativo como el 100% de viabilidad celular y el control positivo mostrado en la figura corresponde a doxorrubicina 50 µM.

Los datos observados se representaron mediante un ajuste no lineal bajo una curva dosis-respuesta utilizando el software GraphPad Prism 9 utilizando las medias de viabilidad celular (%) y sus desviaciones estándar (figura 8-12). Los resultados mostraron un $EC_{50} = 420.9$ µg/mL para F18, mostrando una ligera toxicidad para la línea SH-SY5Y.

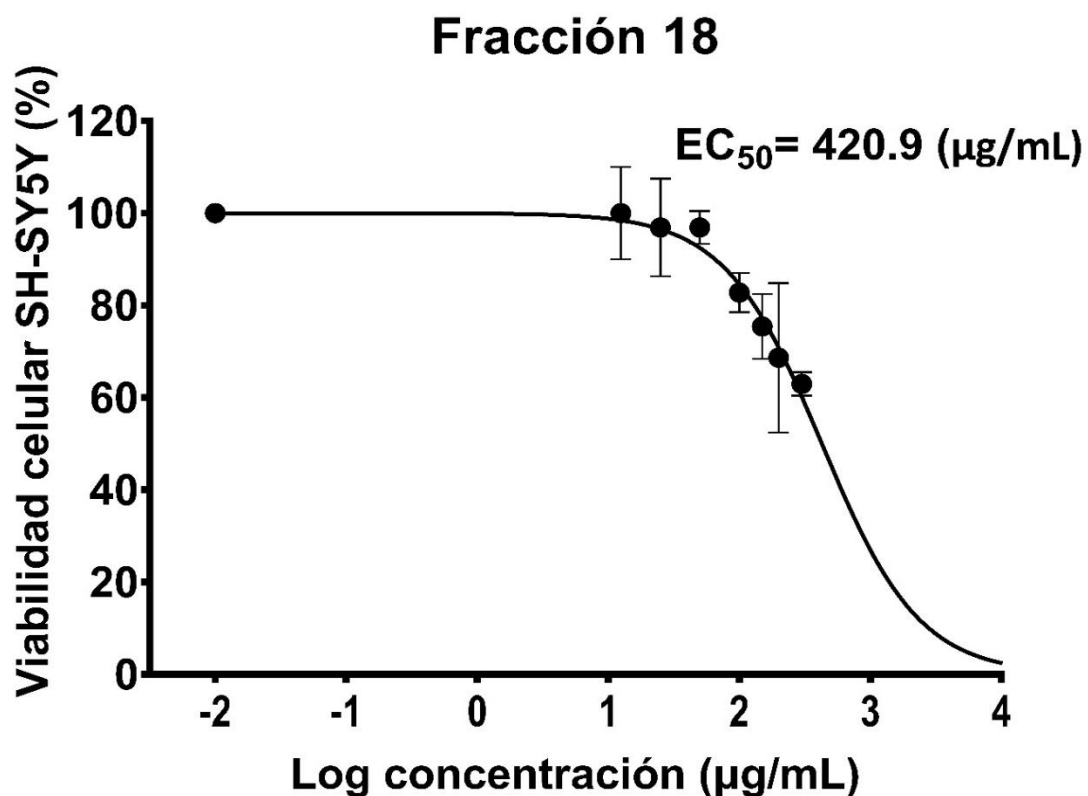


Figura 8-12: Obtención del EC_{50} de la fracción y del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* sobre la línea celular SH-SY5Y.

Se utilizaron las concentraciones 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 ($\mu\text{g/mL}$) para la obtención del EC_{50} de F18, así como las medias de los porcentajes de viabilidad celular y sus desviaciones estándar.

A diferencia de los ensayos de viabilidad celular, en la realización de los ensayos hemolíticos las fracciones 13, 14 y 18 no indujeron porcentaje de hemólisis significativo. Siendo el caso que ninguna de las evaluaciones realizadas sobre los eritrocitos logró superar el 6% de hemólisis, véase la figura 9-12. El control positivo mostró una elevada lisis eritrocitaria, siendo considerado como el 100% de daño celular.

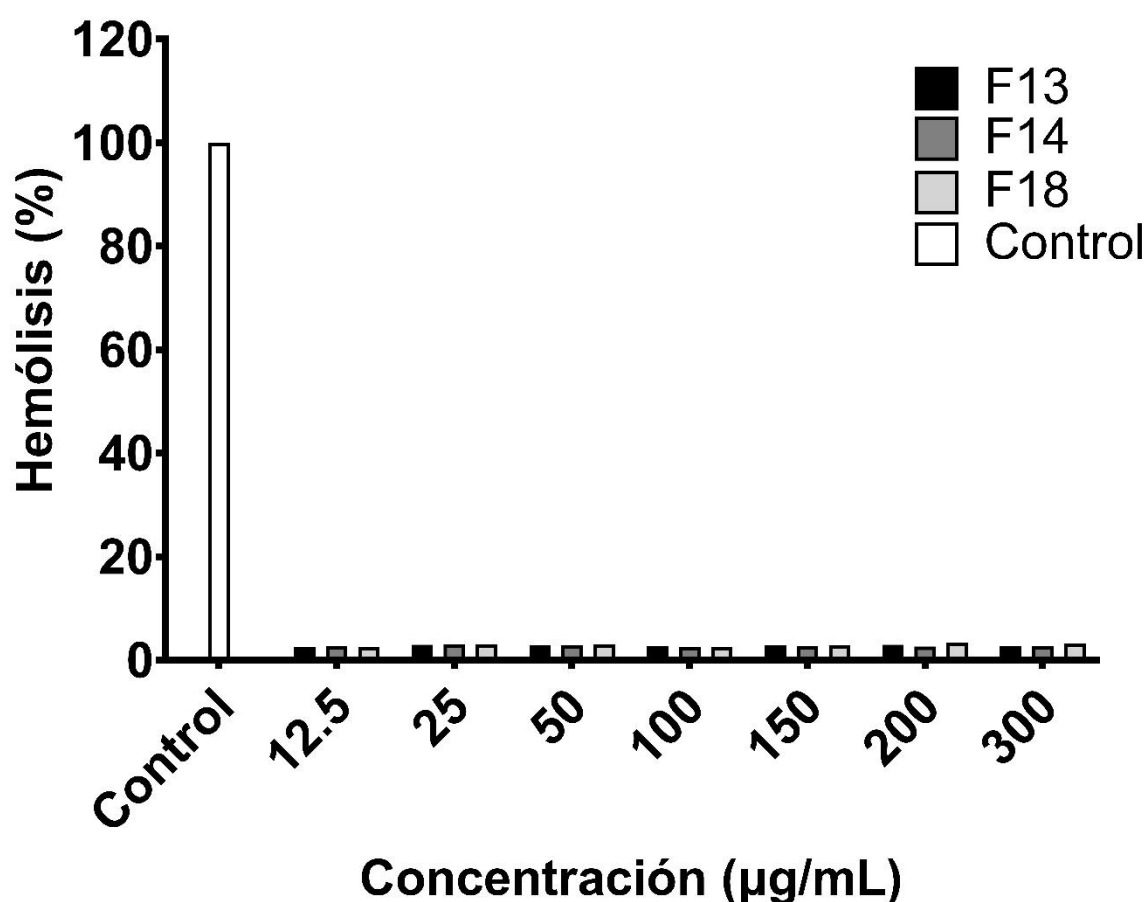


Figura 9-12: Ensayos de hemólisis de las fracciones F13, F14, F18 del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*.

Una solución de eritrocitos al 4% fue incubada con 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 (µg/mL) de las 3 fracciones purificadas. Se utilizó como control positivo a Tritón X-100 para el 100% de hemólisis. No se observa un porcentaje de hemólisis significativo.

3.5. Caracterización de actividad enzimática

El análisis de la actividad catalítica del veneno evidenció la presencia de enzimas fosfolipasas, serinoproteasas y metaloproteasas (figura 10-12). A fin de identificar las fracciones purificadas por RP-HPLC se realizó los ensayos con los sustratos correspondientes de acuerdo a la masa molecular observada en el gel de electroforesis. Los resultados evidencian que el veneno posee una moderada actividad fosfolipásica y proteolítica (figura 10A-12 y 10B-12). Al mismo tiempo, se puede observar una fuerte actividad caseinolítica por parte del veneno (figura 10C-12).

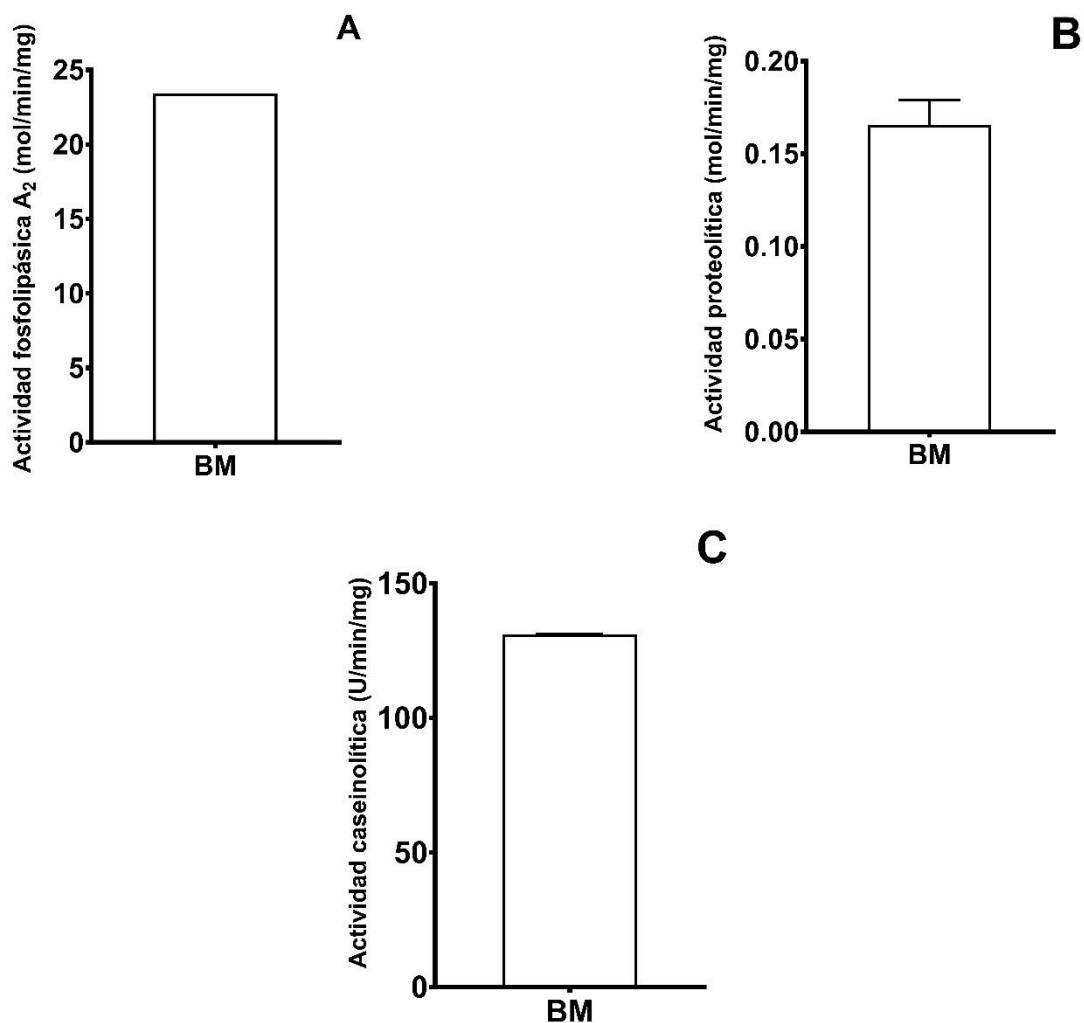


Figura 10-12: Caracterización enzimática de las actividades fosfolipásicas, proteolíticas y caseinolíticas del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*.

La actividad fosfolipásica (A), proteolítica (B) y caseinolítica (C) se evaluaron usando sus sustratos cromogénicos correspondientes. Se utilizó las medias de las absorbancias corregidas y su desviación estándar.

Por otro lado, a partir del peso se decidió realizar el ensayo de actividad caseinolítica para las 3 fracciones purificadas. Las toxinas aisladas, a diferencia del veneno crudo redujeron significativamente su actividad enzimática (figura 11-12). En líneas generales, se observó una baja absorbancia y capacidad de hidrólisis del sustrato cromogénico en condiciones de incubación con las toxinas purificadas por RP-HPLC.

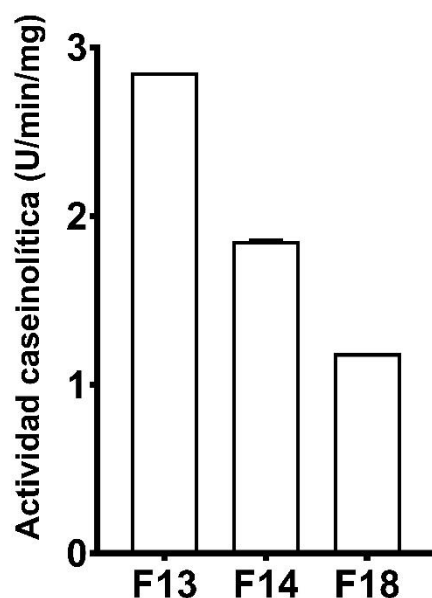


Figura 11-12: Caracterización enzimática de la actividad caseinolítica de las fracciones 13, 14 y 18.

La actividad de metaloproteasas se determinó para cada una de las fracciones F13, F14 y F18. Se utilizaron las medias de las absorbancias corregidas con el blanco.

3.6. Espectrometría de masas de la fracción 18

Debido al potencial citotóxico, se determinó la identidad y el peso molecular de la fracción 18 mediante ESI MS-MS en un barrido espectral de 500 a 1700 (m/z). Los resultados muestran picos en el rango de 800 a 1300 (m/z). Los iones observados se tomaron como referencia para el cálculo del peso molecular de F18. De esta manera, se obtuvo un valor de 23,00 kDa que correspondería al rango de una metaloproteasa del tipo I (figura 12-12).

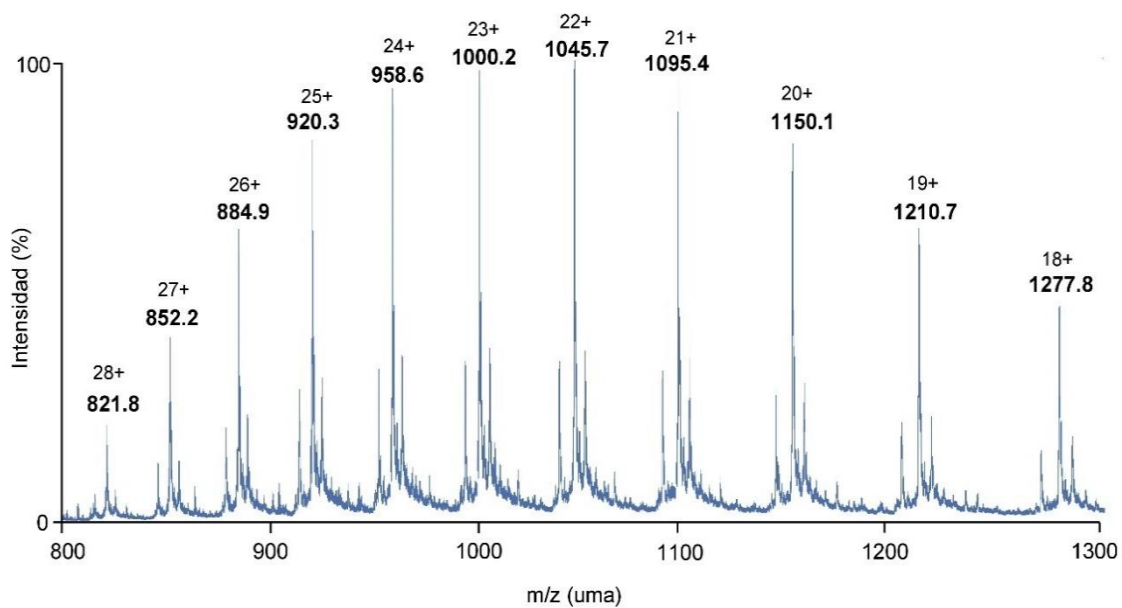


Figura 12-12: Espectrometría de masas de F13 en un barrido espectral de 800 a 1300.

Se observa un barrido espectral en la región de 800 a 1300 (m/z) con cada uno de los iones usados para el cálculo del peso de F18. El peso molecular obtenido a través de los iones corresponde a 23,00 kDa.

CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

La caracterización del perfil bioquímico logró purificar de manera exitosa 19 fracciones. Aunque, una vez calculada el área bajo la curva se decidió trabajar sobre 3 picos con los mayores valores de absorbancia dentro del cromatograma. Tras los resultados obtenidos al realizar la caracterización del perfil del veneno de *B. microphthalmus* se observó que las toxinas con mayor abundancia y, por ende, mayor presencia dentro del veneno, podrían corresponder a las familias de metaloproteasas, como se indica en el trabajo de Guerra-Duarte donde se realizó una caracterización de la actividad enzimática de once venenos de serpientes peruanas en el que consta el veneno de *B. microphthalmus* [113].

La mayor cantidad de fracciones está desplazada hacia la derecha, teniendo una cantidad de 13 picos respecto a los 19 que fueron recogidos, puede indicar la mayor predominancia de familias de toxinas de pesos moleculares grandes (SVMP y LAAO). La clara predominancia de metaloproteasas en el veneno puede deberse a diversos factores, por ejemplo, el tipo de alimentación. Sin embargo, lo más predominante dentro del veneno es la falta de fosfolipasas A₂, lo cual puede implicar una falta o baja actividad miotóxica directa. Este resultado parece ser congruente con estudios realizados sobre varias especies de serpientes de Perú, donde el veneno de *B. microphthalmus* mostró un fenotipo marcado hacia la baja cantidad de esta proteína [77].

La variación de la composición proteómica de los venenos incluso entre serpientes de una misma familia puede ser muy grande. Los resultados previos registrados sobre dos especies del género *Bothrocophias* demostraron que *Bothrocophias myersi* y *campbelli* tienen mayores actividades de PLA₂ catalíticamente inactivas (54,04% y 43,01%, respectivamente) que *microphthalmus* [61, 62]. Estos ejemplos demuestran la gran variación del perfil proteómico entre serpientes de la misma familia lo que muestra su potencial para diversas actividades farmacológicas de relevancia [79]. Además, a pesar de que la falta de PLA₂ es notable entre los venenos de esta misma familia, también se puede observar una clara presencia de metaloproteasas (21,50% y 22,08% respectivamente) que implica una posible predilección por parte de la familia *Bothrocophias* por actividades toxicológicas hemorrágicas [81].

La falta de grandes cantidades de veneno condujo a la purificación de las toxinas más representativas del veneno. De esta manera, se escogió las toxinas más abundantes del veneno (13,14 y 18). Tras los resultados obtenidos por SDS-PAGE para la fracción 13 y 14 que mostraron bandas únicas con pesos alrededor de 57 a 64 kDa y, en conjunto con el tiempo de elución en un rango de 65 a 85 minutos, se definió que estas dos fracciones podrían corresponder a la familia de toxinas de PIII-SVMP o L-aminoxidasas que vendrían a ser las moléculas más hidrofóbicas y grandes [82]. A su vez, la fracción 18 que eluyó al minuto 85 y mostró un peso molecular de alrededor de 22 a 30 kDa, mostraría ser una PI-SVMP [83]. Las metaloproteasas tipo I y tipo III poseen actividad anticancerígena y son moléculas prometedoras con potencial farmacológico gracias a su capacidad de interactuar con la matriz extracelular convirtiéndolas en inhibidores de proliferación celular [84,85,86].

La purificación de toxinas de venenos puede ser realizada por la combinación de métodos cromatográficos o en una sola etapa, de acuerdo con la toxina de interés y complejidad de la mezcla [131]. Para verificar la homogeneidad de las fracciones y su pureza, se realizó una cromatografía por RP-HPLC bajo las mismas condiciones en las que se fraccionó el veneno crudo. La pureza de las fracciones es un factor relevante para la evaluación de la actividad biológica de nuevos compuestos debido a que la presencia de impurezas puede afectar la correcta interpretación o determinación de los determinantes funcionales, es decir, las moléculas responsables por el efecto evaluado. La cromatografía mostró picos que eluyeron en los mismos tiempos en los que se recolectó las fracciones de la cromatografía del veneno puro. Los datos recolectados mostraron un porcentaje de pureza de F13 de 97,02%, F14 de 96,25% y F18 de 95,77%, lo cual reafirma los datos obtenidos en los geles electroforesis donde solo se observa una única banda para cada una de las fracciones.

La caracterización enzimática del veneno mostró una fuerte actividad caseinolítica que puede atribuirse a la gran presencia de metaloproteasas dentro del veneno. A su vez, la actividad fosfolipásica mostró ser muy baja en comparación a venenos de serpientes de Ecuador caracterizados anteriormente, como sería *Bothrops atrox* [124]. Esto corrobora la falta de fosfolipasas A₂ observada en la caracterización del perfil bioquímico y lo descrito por Lomonte para su carencia de fosfolipasas A₂ del veneno de *B. microphthalmus* de Perú [77]. Por otro lado, las fracciones F13, F14 y F18 dado el peso molecular observado por SDS-PAGE se evaluaron para actividad caseinolítica. Sin

embargo, aunque el veneno mostrara gran actividad caseinolítica esta no se ve reflejada en las fracciones más abundantes. Esto se puede explicar, gracias a que las metaloproteasas que son purificadas por RP-HPLC pueden llegar a ser inactivadas enzimáticamente por los solventes orgánicos que se usaron tras su caracterización por RP-HPLC. Sin embargo, se requiere realizar los ensayos L-aminoxidasas para F13 y F14 y lograr descartar que pertenezcan a esta familia. Esto se puede lograr gracias a que, a diferencia de las metaloproteasas, las L-aminoxidasas no pierden su actividad tras ser purificadas [82].

Motivados por este antecedente, se evaluó el potencial de las toxinas más abundantes purificadas del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*. De las toxinas purificadas, F13 y F14 no mostraron significativa actividad citotóxica. Por otro lado, F18 presentó una ligera actividad citotóxica mostrada con un EC_{50} de 420.9 $\mu\text{g/mL}$. Tras realizar espectrometría de masas para F18 se observó un peso molecular de 23 000 Da correspondiente al peso molecular de las PI-SVMP [83]. La búsqueda del peso molecular de F18 es importante la identificación precisa de la toxina para establecer los posibles mecanismos por el cual el veneno crudo disminuyó en su totalidad la viabilidad celular de SH-SY5Y.

El mecanismo por el cual el veneno es citotóxico ante esta línea celular es aún desconocido, pero la gran presencia de metaloproteasas [113] dentro del veneno y la interacción de la membrana extracelular y sus componentes sugieren que la principal causa de muerte de las células SH-SY5Y sería por apoptosis, como ha sido previamente reportada en otros estudios. A su vez, esta citotoxicidad observada sobre SH-SY5Y por parte del veneno crudo y F18, no se mostró sobre eritrocitos para ninguna de las concentraciones usadas (12.5-300 $\mu\text{g/mL}$). La actividad hemolítica por parte de las toxinas purificadas al realizar ensayos sobre líneas celulares siempre es un tema de importancia al igual que la selectividad sobre células cancerígenas por encima de las normales [111]. El veneno a pesar de su alta toxicidad sobre la línea celular cancerígena no mostró una actividad hemolítica superior al 6%, lo cual nos ayuda a inferir cierta selectividad del veneno sobre células cancerígenas que, por el resto de las células, aunque se tendría que evaluar la actividad del veneno sobre una célula con núcleo [112]. La línea celular SH-SY5Y muestra tanto células adherentes como células en suspensión [107], el veneno crudo mostró ser muy citotóxico para ambos tipos de células sin mostrar una preferencia por alguna de ellas. Estos hallazgos demuestran que F18 es menos

citotóxico para la línea celular que el veneno crudo, lo cual, puede deberse primordialmente por los efectos citotóxicos causados por el resto de toxinas dentro del veneno, como lo serían la presencia de fosfolipasas [113] o debido a la pérdida de actividad enzimática de la metaloproteasa durante la purificación por RP-HPLC, la cual se sugiere podría ser determinante para este efecto. En este contexto, la citotoxicidad puede ser resultado de la acción de otra toxina menos abundante dentro del veneno que no pudo ser liofilizada con éxito, la sinergia entre varias de estas toxinas o producto de la acción enzimática de las metaloproteasas [80,108]. De acuerdo a Bustillo, en el veneno de *Bothrops alternatus*, baltergin (SVMP) mostró una ligera actividad de desprendimiento de células sobre la línea celular C2C12 hasta que se incubó en conjunto con una PLA₂ ácida sin actividad miotóxica sobre la línea, lo cual resultó en un incremento de la actividad de la SVMP demostrando una sinergia entre estas proteínas [109,110].

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los venenos son productos naturales con toxinas citotóxicas que han sido ampliamente explorados en el diseño de terapias anticancerígenas. En este estudio, caracterizamos por primera vez la actividad citotóxica del veneno de *B. microphthalmus* sobre la línea celular SH-SY5Y. Los resultados mostraron una gran actividad citotóxica por parte del veneno sobre neuroblastoma incluso en las concentraciones más bajas usadas (12.5 y 25 µg/mL). Al mismo tiempo, el veneno no produce daños significativos en la membrana de los eritrocitos. Colectivamente, estos datos sugieren la presencia de compuestos de alto interés biomédico dentro de este veneno que ha sido pobremente estudiado.

La caracterización del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* de la región amazónica de Ecuador mostró una gran presencia de metaloproteasas del tipo I y III sin actividad caseinolítica. Se purificaron las 3 fracciones más abundantes del veneno, mostrando ser el primer acercamiento a una metaloproteasa caracterizada a partir de un veneno ecuatoriano. Por otra parte, se observó claramente la falta de PLA₂ como se registró en serpientes de la misma especie caracterizadas en Perú.

Gracias a la gran capacidad citotóxica del veneno sobre la línea SH-SY5Y se concluye que una familia de toxinas de baja abundancia dentro del veneno, la sinergia entre varias de ellas o la actividad enzimática de las metaloproteasas son las encargadas de otorgar la actividad citotóxica al veneno. De acuerdo a los resultados, F18 mostró una ligera toxicidad sobre la línea y aunque su mecanismo de interacción con SH-SY5Y no pudo ser dilucidado, se sugiere que la metaloproteasa tipo I pueda poseer un mecanismo independiente de la actividad enzimática.

El trabajo actual sólo usó un tipo de línea celular por lo que la actividad de F18 hacia otro tipo de líneas celulares continúa siendo desconocido, pero provee información adicional sobre los efectos de una metaloproteína purificada sobre una línea celular neuronal.

Aunque no se pudo encontrar el origen por el cual el veneno resulta ser tan tóxico para la línea celular y, a su vez, no presentar porcentajes de hemólisis significativos, estos resultados demuestran la importancia de generar más estudios representativos con

venenos de serpientes del país. Se recomienda una evaluación del resto de toxinas presentes en el veneno para la purificación de la proteína que genera esta fuerte citotoxicidad y, al mismo tiempo, establecer un índice de selectividad para la línea celular con respecto a otras líneas celulares cancerígenas.

Adicionalmente, sería oportuno usar otros métodos de purificación que preserven la actividad enzimática de las metaloproteasas con la finalidad de verificar si su actividad enzimática influye en su potencial citotóxico. Es fundamental la caracterización de la estructura primaria de F18 para futuros estudios enfocados en la búsqueda de determinantes estructurales.

REFERENCIAS

1. Tran TV, Siniavin AE, Hoang AN, Le MTT, Pham CD, Phung TV, et al. Phospholipase A2 from krait *Bungarus fasciatus* venom induces human cancer cell death in vitro. *PeerJ*. 2019;7: e8055. doi:10.7717/peerj.8055
2. Li L, Huang J, Lin Y. Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future. *Toxins (Basel)*. 2018;10: 346. doi:10.3390/toxins10090346
3. Pérez-Peinado C, Defaus S, Andreu D. Hitchhiking with nature: Snake venom peptides to fight cancer and superbugs. *Toxins (Basel)*. 2020;12: 255. doi:10.3390/toxins12040255
4. Arruda Macedo J, Fox J, Souza Castro M. Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. *Curr Protein Pept Sci*. 2015;16: 532–548. doi:10.2174/1389203716666150515125002
5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71: 209–249. doi:10.3322/caac.2166
6. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Canc Drug Resist*. 2019;2: 141–160. doi:10.20517/cdr.2019.10
7. Khuroo A, Aarti C, Barabosa-Pliego A, Rivas-Cáceres RR, Cipriano-Salazar M. Venom as therapeutic weapon to combat dreadful diseases of 21st century: A systematic review on cancer, TB, and HIV/AIDS. *Microb Pathog*. 2018;125: 96–107. doi:10.1016/j.micpath.2018.09.003
8. Hoda M. Potential alternatives to conventional cancer therapeutic approaches: The way forward. *Curr Pharm Biotechnol*. 2021;22: 1141–1148. doi:10.2174/1389201021666201016142408
9. Nikodijević DD, Jovankić JV, Cvetković DM, Anđelković MZ, Nikezić AG, Milutinović MG. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2021;910: 174466. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174466
10. Gibbs JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*. 2000;287: 1969–1973. doi:10.1126/science.287.5460.1969
11. Uzair B, Atlas N, Malik SB, Jamil N, Salaam TO, Rehman MU, et al. Snake venom as an effective tool against colorectal cancer. *Protein Pept Lett*. 2018;25: 626–632. doi:10.2174/0929866525666180614112935
12. Vyas VK, Brahmabhatt K, Bhatt H, Parmar U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3: 156–162. doi:10.1016/S2221-1691(13)60042-8
13. İlhan S, Çiçek K, Tok CV, Atmaca H. Profiling of apoptosis-associated proteins in human prostate cancer cells in response to *Montivipera bulgardaghica albizona* venom by protein array. *Toxin Rev*. 2021;40: 1040–1047. doi:10.1080/15569543.2020.1826970
14. Lafnoute A, Lee S-Y, Heo J-Y, Gourja I, Darkaoui B, Abdelkafi-Koubaa Z, et al. Anti-cancer effect of Moroccan cobra *Naja haje* venom and its fractions against hepatocellular carcinoma in 3D cell culture. *Toxins (Basel)*. 2021;13: 402. doi:10.3390/toxins13060402
15. Shanbhag VKL. Applications of snake venoms in treatment of cancer. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5: 275–276. doi:10.1016/s2221-1691(15)30344-0
16. Mimeault M, Batra SK. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*. 2006;24: 2319–2345. doi:10.1634/stemcells.2006-0066
17. Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*. 2019;54: 407–419. doi:10.3892/ijo.2018.4661
18. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*. 2018;834: 188–196. doi:10.1016/j.ejphar.2018.07.034

19. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2012;12: 237–251. doi:10.1038/nrc3237
20. Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R, Rolfe M, Linette GP, Stec J, et al. Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol*. 2004;122: 598–609. doi:10.1309/5cwpu41afr1vym3f
21. Ciavarella S, Milano A, Dammacco F, Silvestris F. Targeted therapies in cancer. *BioDrugs*. 2010;24: 77–88. doi:10.2165/11530830-000000000-00000
22. Chong HP, Tan KY, Tan CH. Cytotoxicity of snake venoms and cytotoxins from two southeast Asian cobras (*Naja sumatrana*, *Naja kaouthia*): Exploration of anticancer potential, selectivity, and cell death mechanism. *Front Mol Biosci*. 2020;7: 583587. doi:10.3389/fmolb.2020.583587
23. Calderon LA, Sobrinho JC, Zaqueo KD, de Moura AA, Grabner AN, Mazzi MV, et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 203639. doi:10.1155/2014/203639
24. Jiménez-Charris E, Lopes DS, Gimenes SNC, Teixeira SC, Montealegre-Sánchez L, Solano-Redondo L, et al. Antitumor potential of PLLans-II, an acidic Asp49-PLA2 from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells. *Int J Biol Macromol*. 2019;122: 1053–1061. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053
25. Kalita B, Saviola AJ, Mukherjee AK. From venom to drugs: a review and critical analysis of Indian snake venom toxins envisaged as anticancer drug prototypes. *Drug Discov Today*. 2021;26: 993–1005. doi:10.1016/j.drudis.2020.12.021
26. Abdel-Ghani LM, Rahmy TR, Tawfik MM, Kaziri I, Al-Obaidi A, Rowan EG, et al. Cytotoxicity of Nubein6.8 peptide isolated from the snake venom of *Naja nubiae* on melanoma and ovarian carcinoma cell lines. *Toxicon*. 2019;168: 22–31. doi:10.1016/j.toxicon.2019.06.220
27. Qu N, Itoh M, Sakabe K. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis: The role of testicular immunology. *Int J Mol Sci*. 2019;20: 957. doi:10.3390/ijms20040957
28. Liu Y-H, Zang X-Y, Wang J-C, Huang S-S, Xu J, Zhang P. Diagnosis and management of immune related adverse events (irAEs) in cancer immunotherapy. *Biomed Pharmacother*. 2019;120: 109437. doi:10.1016/j.biopha.2019.109437
29. Moga M, Dimienescu O, Arvătescu C, Ifteni P, Pleş L. Anticancer activity of toxins from bee and snake venom—an overview on ovarian cancer. *Molecules*. 2018;23: 692. doi:10.3390/molecules23030692
30. Lovelace DL, McDaniel LR, Golden D. Long-term effects of breast cancer surgery, treatment, and survivor care. *J Midwifery Womens Health*. 2019;64: 713–724. doi:10.1111/jmwh.13012
31. Kuruppu A I, Paranagama P, De Silva R. Anticancer potential of natural products: a review focusing on Sri Lankan plants. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2019;11: 161–177. doi:10.2741/S532
32. Qu Y, Safonova O, De Luca V. Completion of the canonical pathway for assembly of anticancer drugs vincristine/vinblastine in *Catharanthus roseus*. *Plant J*. 2019;97: 257–266. doi:10.1111/tjp.14111
33. Bhowmik T, Saha PP, Sarkar A, Gomes A. Evaluation of cytotoxicity of a purified venom protein from *Naja kaouthia* (NKCT1) using gold nanoparticles for targeted delivery to cancer cell. *Chem Biol Interact*. 2017;261: 35–49. doi:10.1016/j.cbi.2016.11.007
34. Selistre-de-Araujo HS, Pontes CLS, Montenegro CF, Martin ACBM. Snake venom disintegrins and cell migration. *Toxins (Basel)*. 2010;2: 2606–2621. doi:10.3390/toxins2112606
35. Attarde SS, Pandit SV. Cytotoxic activity of NN-32 toxin from Indian spectacled cobra venom on human breast cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17: 503. doi:10.1186/s12906-017-2018-3
36. Waheed H, Moin SF, Choudhary MI. Snake venom: From deadly toxins to life-saving therapeutics. *Curr Med Chem*. 2017;24: 1874–1891. doi:10.2174/0929867324666170605091546
37. Uzair B, Bint-E-Irshad S, Khan BA, Azad B, Mahmood T, Rehman MU, et al. Scorpion venom peptides as A potential source for human drug candidates. *Protein Pept Lett*. 2018;25: 702–708. doi:10.2174/0929866525666180614114307

38. Himaya SWA, Lewis RJ. Venomics-accelerated cone snail venom peptide discovery. *Int J Mol Sci.* 2018;19: 788. doi:10.3390/ijms19030788
39. Pineda SS, Undheim EAB, Rupasinghe DB, Ikonomopoulou MP, King GF. Spider venomics: implications for drug discovery. *Future Med Chem.* 2014;6: 1699–1714. doi:10.4155/fmc.14.103
40. Serna N, Sánchez-García L, Unzueta U, Díaz R, Vázquez E, Mangues R, et al. Protein-based therapeutic killing for cancer therapies. *Trends Biotechnol.* 2018;36: 318–335. doi:10.1016/j.tibtech.2017.11.007
41. Malekara E, Pazhouhi M, Rashidi I, Jalili C. Anti-proliferative and cytotoxic effect of Iranian snake (*Vipera raddei kurdistanica*) venom on human breast cancer cells via reactive oxygen species-mediated apoptosis. *Res Pharm Sci.* 2020;15: 76–86. doi:10.4103/1735-5362.278717
42. Moras AM, Steffens L, Nordio BE, Saffi J, Dallegrave E, Rossato-Grando LG, et al. Cytotoxic mechanism of *Bothrops jararaca* venom mediated by mitochondrial depolarization. *Adv Toxicol Toxic Effects.* 2020;4: 001–008. doi:10.17352/atte.000007
43. Bolognesi A, Bortolotti M, Maiello S, Battelli MG, Polito L. Ribosome-inactivating proteins from plants: A historical overview. *Molecules.* 2016;21: 1627. doi:10.3390/molecules21121627
44. Michl P, Gress TM. Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004;4: 689–702. doi:10.2174/1568009043332727
45. Mohamed Abd El-Aziz T, Garcia Soares A, Stockand JD. Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins (Basel).* 2019;11: 564. doi:10.3390/toxins11100564
46. Zhang L, Wei L-J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. *Life Sci.* 2007;80: 1189–1197. doi:10.1016/j.lfs.2006.12.024
47. Oliveira AL, Viegas MF, da Silva SL, Soares AM, Ramos MJ, Fernandes PA. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat Rev Chem.* 2022; 1–19. doi:10.1038/s41570-022-00393-7
48. Ahmed M, Khan SZ, Sher N, Rehman ZU, Mushtaq N, Khan RA. Kinetic and toxicological effects of synthesized palladium(II) complex on snake venom (*Bungarus sindanus*) acetylcholinesterase. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2021;27: e20200047. doi:10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0047
49. Frobert Y, Créminon C, Cousin X, Rémy MH, Chatel JM, Bon S, et al. Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1339: 253–267. doi:10.1016/s0167-4838(97)00009-5
50. Abdelkafi-Koubaa Z, Morjen M, Srairi-Abid N, El Ayeb M, Marrakchi N. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases potential biomedical applications. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 2014;91: 15–32. Available: <https://europepmc.org/article/med/26402967>
51. Ullah A. Structure-function studies and mechanism of action of snake venom L-amino acid oxidases. *Front Pharmacol.* 2020;11: 110. doi:10.3389/fphar.2020.00110
52. Amorim FG, Menaldo DL, Carone SEI, Silva TA, Sartim MA, De Pauw E, et al. New insights on Moojase, a thrombin-like Serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxins (Basel).* 2018;10: 500. doi:10.3390/toxins10120500
53. Vander dos Santos R, Villalta-Romero F, Stanisic D, Borro L, Neshich G, Tasic L. Citrus bioflavonoid, hesperetin, as inhibitor of two thrombin-like snake venom serine proteases isolated from *Crotalus simus*. *Toxicon.* 2018;143: 36–43. doi:10.1016/j.toxicon.2018.01.005
54. Dos Santos RV, Grillo G, Fonseca H, Stanisic D, Tasic L. Hesperetin as an inhibitor of the snake venom serine protease from *Bothrops jararaca*. *Toxicon.* 2021;198: 64–72. doi:10.1016/j.toxicon.2021.04.016
55. Boldrini-França J, Pinheiro-Junior EL, Peigneur S, Pucca MB, Cerni FA, Borges RJ, et al. Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. *Sci Rep.* 2020;10: 4476. doi:10.1038/s41598-020-61258-x

56. Debono J, Bos MHA, Do MS, Fry BG. Clinical implications of coagulotoxic variations in Mamushi (Viperidae: Gloydius) snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2019;225: 108567. doi:10.1016/j.cbpc.2019.108567
57. Soares AM, Guerra-Sá R, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys*. 2000;378: 201–209. doi:10.1006/abbi.2000.1790
58. Olaoba OT, Karina Dos Santos P, Selistre-de-Araujo HS, Ferreira de Souza DH. Snake Venom Metalloproteinases (SVMs): A structure-function update. *Toxicon X*. 2020;7: 100052. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100052
59. Bertholim L, Chaves AFA, Oliveira AK, Menezes MC, Asega AF, Tashima AK, et al. Systemic effects of hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Untargeted peptidomics to explore the pathodegradome of plasma proteins. *Toxins (Basel)*. 2021;13: 764. doi:10.3390/toxins13110764
60. Teixeira SC, Borges BC, Oliveira VQ, Carregosa LS, Bastos LA, Santos IA, et al. Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. *Int J Biol Macromol*. 2020;164: 616–625. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178
61. Pereañez JA, Preciado LM, Fernández J, Camacho E, Lomonte B, Castro F, et al. Snake venomomics, experimental toxic activities and clinical characteristics of human envenomation by *Bothrocophias myersi* (Serpentes: Viperidae) from Colombia. *J Proteomics*. 2020;220: 103758. doi:10.1016/j.jprot.2020.103758
62. Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernández ML, Loaiza-Lange A, Gibbs HL, Lomonte B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon*. 2014;90: 15–25. doi:10.1016/j.toxicon.2014.07.012
63. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227: 680–685. doi:10.1038/227680a0
64. Benati RB, Costa TR, Cacemiro M da C, Sampaio SV, de Castro FA, Burin SM. Cytotoxic and pro-apoptotic action of MjTX-I, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, towards leukemic cells. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2018;24: 40. doi:10.1186/s40409-018-0180-9
65. Lu W, Hu L, Yang J, Sun X, Yan H, Liu J, et al. Isolation and pharmacological characterization of a new cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bungarus multicinctus* snake venom. *J Ethnopharmacol*. 2018;213: 311–320. doi:10.1016/j.jep.2017.11.026
66. Muller SP, Silva VAO, Silvestrini AVP, de Macedo LH, Caetano GF, Reis RM, et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom: In vitro cytotoxic activity of a heterodimeric phospholipase A2 on human cancer-derived cell lines. *Toxicon*. 2018;156: 13–22. doi:10.1016/j.toxicon.2018.10.306
67. Bezerra PHA, Ferreira IM, Franceschi BT, Bianchini F, Ambrósio L, Cintra ACO, et al. BthTX-I from *Bothrops jararacussu* induces apoptosis in human breast cancer cell lines and decreases cancer stem cell subpopulation. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019;25: e20190010. doi:10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0010
68. Prinholato da Silva C, Costa TR, Paiva RMA, Cintra ACO, Menaldo DL, Antunes LMG, et al. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2015;21: 44. doi:10.1186/s40409-015-0044-5
69. Costa Torres AF, Dantas RT, Toyama MH, Diz Filho E, Zara FJ, Rodrigues de Queiroz MG, et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon*. 2010;55: 795–804. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.013
70. Machado ART, Aissa AF, Ribeiro DL, Costa TR, Ferreira RS Jr, Sampaio SV, et al. Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-inducing effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararacussu* venom in a co-culture model of HepG2 and HUVEC cells. *Int J Biol Macromol*. 2019;127: 425–432. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.059

71. Castro F, Ayerbe S, Calderón JJ, Cepeda B. Nuevo registro para Colombia de *Bothrocophias campbelli* y notas sobre *B. colombianus* y *B. myersi* (serpentes: Viperidae). Revista Novedades Colombianas. Available: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/novedades/article/view/1237>
72. Oberlin O, Martelli H. Enfermedades benignas del ovario y tumores malignos de ovario, útero y vagina en la niña y en la adolescente. EMC - Ginecol-Obstet. 2011;47: 1–8. doi:10.1016/s1283-081x(11)70989-4
73. Oñate Miranda M, Pinho DF, Wardak Z, Albuquerque K, Pedrosa I. Resonancia magnética en la planificación de la braquiterapia intracavitaria para el tratamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado. Radiologia. 2016;58: 16–25. doi:10.1016/j.rx.2015.09.005
74. Lim Z-F, Ma PC. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy. J Hematol Oncol. 2019;12: 134. doi:10.1186/s13045-019-0818-2
75. Cavalcante WLG, Silva MD-P, Gallacci M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. Chem Biol Interact. 2005;151: 95–100. doi:10.1016/j.cbi.2004.12.001
76. Bedoya-Medina J, Mendivil-Perez M, Rey-Suarez P, Jimenez-Del-Rio M, Núñez V, Velez-Pardo C. L-amino acid oxidase isolated from *Micrurus mipartitus* snake venom (MipLAAO) specifically induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells mostly via oxidative stress-dependent signaling mechanism. Int J Biol Macromol. 2019;134: 1052–1062. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.174
77. Lomonte B, Díaz C, Chaves F, Fernández J, Ruiz M, Salas M, et al. Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A2 expression. Toxicon X. 2020;7: 100044. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100044
78. Monzavi, S. M., Afshari, R., Khoshdel, A. R., Salarian, A. A., Khosrojerdi, H., & Mihandoust, A. Interspecies Variations in Clinical Envenoming Effects of Viper Snakes Evolutionized in a Common Habitat: A Comparative Study on *Echis carinatus sochureki* and *Macrovipera lebetina obtusa* Victims in Iran. Available: https://apjmt.mums.ac.ir/article_14328_9cb24e67b624f0c49e8eb5d19fc3b6aa.pdf
79. Ay More S, Moreira LC, Magalhães MR, Valadares MC, da Cunha LC. Cytotoxic activity in basal and tumoral cell lines of the COK3N3 protein from the snake venom *Crotalus durissus collilineatus*, variety crotamine negative. Toxicon. 2022;210: 155–157. doi:10.1016/j.toxicon.2022.02.021
80. Pucca MB, Ahmadi S, Cerni FA, Ledsgaard L, Sørensen CV, McGeoghan FTS, et al. Unity makes strength: Exploring intraspecies and interspecies toxin synergism between phospholipases A2 and cytotoxins. Front Pharmacol. 2020;11: 611. doi:10.3389/fphar.2020.00611
81. Scovino Loboguerrero S, Sarmiento K, Galvis C, Castiblanco AL, Aristizabal F. Analysis of the protein profile of the venoms of snakes *Bothrops asper*, *Bothrocophias myersi* and *Crotalus durissus* from the Colombian Andean Region obtained by RP-HPLC. Rev Colomb Biotecnol. 2021;23: 24–31. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.94211
82. Lomonte B, Calvete JJ. Strategies in “snake venomomics” aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017;23: 26. doi:10.1186/s40409-017-0117-8
83. Aguiar W da S, Galizio N da C, Serino-Silva C, Sant’Anna SS, Grego KF, Tashima AK, et al. Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. PLoS One. 2019;14: e0222206. doi:10.1371/journal.pone.0222206
84. Fernández J, Gutiérrez JM, Angulo Y, Sanz L, Juárez P, Calvete JJ, et al. Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. Biochimie. 2010;92: 273–283. doi:10.1016/j.biochi.2009.12.006
85. Burin SM, Ghisla S, Ouchida AT, Aissa AF, Coelho MGB, Costa TR, et al. CR-LAAO antileukemic effect against Bcr-Abl + cells is mediated by apoptosis and hydrogen peroxide. Int J Biol Macromol. 2016;86: 309–320. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.069
86. Bhat SK, Joshi MB, Vasishta S, Jagadale RN, Biligiri SG, Coronado MA, et al. P-I metalloproteinases and L-amino acid oxidases from *Bothrops* species inhibit angiogenesis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2021;27: e20200180. doi:10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0180

87. Petrilla V, Polláková M, Bekešová B, Andrejčáková Z, Vlčková R, Marcincáková D, et al. A comprehensive study monitoring the venom composition and the effects of the venom of the rare Ethiopian endemic snake species *Bitis parviocula*. *Toxins (Basel)*. 2021;13. doi:10.3390/toxins13050299
88. Tavares C, Maciel T, Burin S, Ambrósio L, Ghisla S, Sampaio S, et al. L-Amino acid oxidase isolated from *Calloselasma rhodostoma* snake venom induces cytotoxicity and apoptosis in JAK2V617F-positive cell lines. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2016;38: 128–134. doi:10.1016/j.bjhh.2016.03.004
89. Paloschi MV, Pontes AS, Soares AM, Zuliani JP. An update on potential molecular mechanisms underlying the actions of snake venom L-amino acid oxidases (LAAOs). *Curr Med Chem*. 2018;25: 2520–2530. doi:10.2174/0929867324666171109114125
90. de Vieira Santos MM, Sant'Ana CD, Giglio JR, da Silva RJ, Sampaio SV, Soares AM, et al. Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102: 533–542. doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00229.x
91. Naumann GB, Silva LF, Silva L, Faria G, Richardson M, Evangelista K, et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810: 683–694. doi:10.1016/j.bbagen.2011.04.003
92. Calderon LA, Sobrinho JC, Zaqueo KD, de Moura AA, Grabner AN, Mazzi MV, et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 203639. doi:10.1155/2014/203639
93. Borgoño CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4: 876–890. doi:10.1038/nrc1474
94. Markland FS Jr. Antitumor action of crotalase, a defibrinogenating snake venom enzyme. *Semin Thromb Hemost*. 1986;12: 284–290. doi:10.1055/s-2007-1003568
95. Nalbantsoy A, Hempel B-F, Petras D, Heiss P, Göçmen B, Işci N, et al. Combined venom profiling and cytotoxicity screening of the Radde's mountain viper (*Montivipera raddei*) and Mount Bulgar Viper (*Montivipera bulgardaghica*) with potent cytotoxicity against human A549 lung carcinoma cells. *Toxicon*. 2017;135: 71–83. doi:10.1016/j.toxicon.2017.06.008
96. Damico DCS, Nascimento JM, Lomonte B, Ponce-Soto LA, Joazeiro PP, Novello JC, et al. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. *Toxicon*. 2007;49: 678–692. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.014
97. Gebrim LC, Marcussi S, Menaldo DL, de Menezes CSR, Nomizo A, Hamaguchi A, et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals*. 2009;37: 222–229. doi:10.1016/j.biologicals.2009.01.010
98. Costa TR, Menaldo DL, Oliveira CZ, Santos-Filho NA, Teixeira SS, Nomizo A, et al. Myotoxic phospholipases A(2) isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*. 2008;29: 1645–1656. doi:10.1016/j.peptides.2008.05.021
99. Peña-Carrillo MS, Pinos-Tamayo EA, Mendes B, Domínguez-Borbor C, Proaño-Bolaños C, Miguel DC, et al. Dissection of phospholipases A2 reveals multifaceted peptides targeting cancer cells, Leishmania and bacteria. *Bioorg Chem*. 2021;114: 105041. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105041
100. You W-K, Seo H-J, Chung K-H, Kim D-S. A novel metalloprotease from *Gloydus halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J Biochem*. 2003;134: 739–749. doi:10.1093/jb/mvg202
101. Brenes O, Muñoz E, Roldán-Rodríguez R, Díaz C. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. *Exp Mol Pathol*. 2010;88: 424–432. doi:10.1016/j.yexmp.2010.02.002
102. Tanjoni I, Weinlich R, Della-Casa MS, Clissa PB, Saldanha-Gama RF, de Freitas MS, et al. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis*. 2005;10: 851–861. doi:10.1007/s10495-005-2945-1

103. Guimarães D de O, Lopes DS, Azevedo FVPV, Gimenes SNC, Silva MA, Achê DC, et al. In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom. *Int J Biol Macromol.* 2017;97: 770–777. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.064
104. Torres-Huaco FD, Maruñak S, Teibler P, Bustillo S, Acosta de Pérez O, Leiva LC, et al. Local and systemic effects of BtaMP-1, a new weakly hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinase purified from Bothriopsis taeniata Snake Venom. *Int J Biol Macromol.* 2019;141: 1044–1054. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.032
105. Baldo C, Tanjoni I, León IR, Batista IFC, Della-Casa MS, Clissa PB, et al. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from Bothrops neuwiedi venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon.* 2008;51: 54–65. doi:10.1016/j.toxicon.2007.08.005
106. Díaz C, Valverde L, Brenes O, Rucavado A, Gutiérrez JM. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells: Metalloproteinase-Induced Apoptosis/Anoikis in Endothelial Cells. *J Cell Biochem.* 2005;94: 520–528. doi:10.1002/jcb.20322
107. Kovalevich J, Santerre M, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol.* 2021;2311: 9–23. doi:10.1007/978-1-0716-1437-2_2
108. Abdullah NAH, Rusmili MRA, Zainal Abidin SA, Shaikh MF, Hodgson WC, Othman I. Isolation and characterization of A2-EPTX-Nsm1a, a secretory phospholipase A2 from Malaysian spitting cobra (Naja sumatrana) venom. *Toxins (Basel).* 2021;13: 859. doi:10.3390/toxins13120859
109. Bustillo S, Gay CC, García Denegri ME, Ponce-Soto LA, Bal de Kier Joffé E, Acosta O, et al. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from Bothrops alternatus venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon.* 2012;59: 338–343. doi:10.1016/j.toxicon.2011.11.007
110. Bustillo S, García-Denegri ME, Gay C, Van de Velde AC, Acosta O, Angulo Y, et al. Phospholipase A(2) enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chem Biol Interact.* 2015;240: 30–36. doi:10.1016/j.cbi.2015.08.002
111. Vitorino KA, Alfonso JJ, Gómez AF, Santos APA, Antunes YR, Caldeira CA da S, et al. Antimalarial activity of basic phospholipases A2 isolated from Paraguayan Bothrops diporus venom against Plasmodium falciparum. *Toxicon X.* 2020;8: 100056. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100056
112. Giribaldi J, Smith JJ, Schroeder CI. Recent developments in animal venom peptide nanotherapeutics with improved selectivity for cancer cells. *Biotechnol Adv.* 2021;50: 107769. doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107769
113. Guerra-Duarte C, Lopes-Peixoto J, Fonseca-de-Souza BR, Stransky S, Oliveira D, Schneider FS, et al. Partial in vitro analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. *Toxicon.* 2015;108: 84–96. doi:10.1016/j.toxicon.2015.09.007
114. Feng L, Gao R, Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion Buthus martensi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008;148: 250–257. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.003
115. Kemparaju K, Girish KS. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem Funct.* 2006;24: 7–12. doi:10.1002/cbf.1261
116. Salabi F, Jafari H. New insights about scorpion venom hyaluronidase; isoforms, expression and phylogeny. *Toxin Rev.* 2022; 1–16. doi:10.1080/15569543.2021.2018613
117. Jung H. Hyaluronidase: An overview of its properties, applications, and side effects. *Arch Plast Surg.* 2020;47: 297–300. doi:10.5999/aps.2020.00752
118. Khan N, Niazi ZR, Rehman F, Akhtar A, Khan MM, Khan S, et al. Hyaluronidases: A therapeutic enzyme. *Protein Pept Lett.* 2018;25. doi:10.2174/0929866525666180629121823
119. Ma Z, Wang X, Li C. Strategies of drug delivery for deep fungal infection: A review. *Pharm Nanotechnol.* 2020;8: 372–390. doi:10.2174/2211738508666200910101923

120. Bala E, Hazarika R, Singh P, Yasir M, Shrivastava R. A biological overview of Hyaluronidase: A venom enzyme and its inhibition with plants materials. *Mater Today*. 2018;5: 6406–6412. doi:10.1016/j.matpr.2017.12.252
121. Bordon KCF, Perino MG, Giglio JR, Arantes EC. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie*. 2012;94: 2740–2748. doi:10.1016/j.biochi.2012.08.014
122. Oliveira-Mendes BBR de, Miranda SEM, Sales-Medina DF, Magalhães B de F, Kalapothakis Y, Souza RP de, et al. Inhibition of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase affects venom biodistribution. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13: e0007048. doi:10.1371/journal.pntd.0007048
123. Abdelgllil MI, Abdallah SO, El-Desouky MA, Alfaifi MY, Elbehairi SEI, Mohamed AF. Evaluation of the anticancer potential of crude, irradiated *Cerastes cerastes* snake venom and Propolis ethanolic extract & related biological alterations. *Molecules*. 2021;26: 7057. doi:10.3390/molecules26227057
124. 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*. 2021;193: 63–72. doi:10.1016/j.toxicon.2021.01.007
125. Campoverde Merchán F, Campoverde Arévalo N, García Matamoros EK. La tasa de Mortalidad General del Ecuador del INEC subestima erróneamente al Cáncer: Artículo Original. *Oncol (Guayaquil)*. 2020;30: 178–191. doi:10.33821/488
126. Xia C, Dong X, Li H, Cao M, Sun D, He S, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants: Profiles, trends, and determinants. *Chin Med J (Engl)*. 2022;135: 584–590. doi:10.1097/CM9.0000000000002108
127. Gao R-N, Levy IG, Levy IG, Woods WG, Coombs BA, Gaudette LA, et al. Incidence and mortality of neuroblastoma in Canada compared with other childhood cancers. 1997;8: 745–754. doi:10.1023/a:1018483405637
128. Saddozai U, Khattak S, Abbas A, Khan F, Wu D-D, Ji X-Y, et al. PCNP is a Novel Regulator of Neuroblastomas Cancer. *J Clin Neurol Neurosurg*, 2(106), 2 Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/29bb7399ad4fe2a284f7583757a519d91aec956c>
129. Flores, C., Torres, A., Bernal, J., & Castro, J. Experiencia en el diagnóstico y tratamiento de tumores del sistema nervioso central en niños menores de 2 años en el Hospital Pediátrico Baca Ortiz, Quito-Ecuador, 2016-2019. Disponible en: Perujournalneurosurgery.org.130.
130. Sharma R, Aashima, Nanda M, Fronterre C, Sewagudde P, Ssentongo AE, et al. Mapping cancer in Africa: A comprehensive and comparable characterization of 34 cancer types using estimates from GLOBOCAN 2020. *Front Public Health*. 2022;10: 839835. doi:10.3389/fpubh.2022.839835
131. Tan CH. Snake venomomics: Fundamentals, recent updates, and a look to the next decade. *Toxins (Basel)*. 2022;14: 247. doi:10.3390/toxins14040247
132. Querobino SM, Ribeiro CAJ, Alberto-Silva C. Bradykinin-potentiating PEPTIDE-10C, an argininosuccinate synthetase activator, protects against H₂O₂-induced oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Peptides*. 2018;103: 90–97. doi:10.1016/j.peptides.2018.03.017
133. Damm M, Hempel B-F, Nalbantsoy A, Süssmuth RD. Comprehensive snake venomomics of the Okinawa habu pit viper, *Protobothrops flavoviridis*, by complementary mass spectrometry-guided approaches. *Molecules*. 2018;23: 1893. doi:10.3390/molecules23081893
134. Querobino SM, Costa MS, Alberto-Silva C. Protective effects of distinct proline-rich oligopeptides from *B. jararaca* snake venom against oxidative stress-induced neurotoxicity. *Toxicon*. 2019;167: 29–37. doi:10.1016/j.toxicon.2019.06.012
135. Torres-Carvajal O, Pazmiño-Otamendi G, Salazar-Valenzuela D. Reptiles of Ecuador: a resource-rich online portal, with dynamic checklists and photographic guides. En: [Amphibian-reptile-conservation.org](http://amphibian-reptile-conservation.org) [Internet]. 2019 [citado el 7 de julio de 2022]. Recuperado: [http://amphibian-reptile-conservation.org/pdfs/Volume/Vol_13_no_1/ARC_13_1_\[General_Section\]_209-229_e178.pdf](http://amphibian-reptile-conservation.org/pdfs/Volume/Vol_13_no_1/ARC_13_1_[General_Section]_209-229_e178.pdf)