

**Caracterización del veneno de serpiente *Porthidium lansbergii*
lansbergii y purificación de una fosfolipasa A₂ con efecto
antitumoral sobre células de cáncer de cuello uterino**

Eliécer de Jesús Jiménez Charris



Universidad del Valle
Facultad de Salud
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Santiago de Cali
2018

Caracterización del veneno de serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii* y purificación de una fosfolipasa A₂ con efecto antitumoral sobre células de cáncer de cuello uterino

Eliécer de Jesús Jiménez Charris

Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de Doctor en Ciencias Biomédicas

Director

Leonardo Fierro Pérez, PhD



Universidad del Valle

Facultad de Salud

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Santiago de Cali

2018

Nota de aceptación

La tesis de grado titulada “**Caracterización del veneno de serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii* y purificación de una fosfolipasa A₂ con efecto antitumoral sobre células de cáncer de cuello uterino**”, presentado por el estudiante ELIÉCER DE JESÚS JIMÉNEZ CHARRIS, para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas, fue revisado por el jurado y calificado como:

Firma: _____

LEONARDO FIERRO PÉREZ

Director

Firma: _____

Nombre:

Jurado 1

Firma: _____

Nombre:

Jurado 2

Firma: _____

Nombre:

Jurado 3

Dedicatoria

En la búsqueda de nuevas moléculas farmacológicas a partir de animales majestuosos, que cuentan con un sin número de compuestos proteicos que requieren ser investigados...a las serpientes, mi mayor admiración.

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a los Doctores Pimienta por su apoyo incondicional tanto en lo académico como personal que han sido fundamentales para la obtención de este objetivo.

Agradezco al grupo de Nutrición por su acogimiento, participación, tiempo y colaboración. Un agradecimiento especial a Leonel Montealegre Sánchez, por su apoyo ilimitado en el desarrollo de esta investigación y al profesor Leonardo Fierro, por ser parte de este maravilloso proyecto.

Por la amistad, apoyo y ayuda durante este proceso, quiero agradecer a mis amigos Luis Manuel Solano Redondo, Alejandra Arbeláez, Daniela Barco, Alejandro Montoya, Raúl Charris, Daiana Silva López, Sarah Cirilo Gimenez y Samuel Cota Teixeira.

A mis padres Eliécer Jiménez Vargas y Sor María Charris Corro, a mis hermanos Liseth y Jorge, a mi esposa Liliana Orozco Muñoz y a mi hijo Samuel por su amor incondicional, entendimiento, soporte y colaboración durante estos años.

A la entidad financiadora de este trabajo, El Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias.

Tabla de contenido

Nota de aceptación	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Lista de abreviaturas	11
Lista de figuras	14
Lista de tablas	17
Resumen	18
Abstract	19
Palabras claves	19
Planteamiento del problema	20
Marco conceptual	22
Características del cáncer	22
Señalización proliferativa crónica	22
Evasión de los supresores del crecimiento	23
Resistencia a la muerte celular	23
Inmortalidad celular	25
Inducción de angiogénesis	25
Invasión y metástasis	26
Cáncer de cuello uterino	27
Infección por el virus del papiloma humano	29
Tratamiento para el cáncer de cuello uterino	30
Los venenos de serpientes como fuente terapéutica	31
Fosfolipasas de venenos de serpiente	32
Fosfolipasas como posibles agentes anticancerígenos	33
Modelos tumorales in vitro	33
Venómica de serpientes	34
Objetivos	36
Objetivo General	36
Objetivos Específicos	36

Capítulo 1.....	37
Análisis proteómico y funcional del veneno de <i>Porthidium lansbergii</i>	
<i>lansbergii</i> proveniente del Departamento del Atlántico	38
1. Resumen.....	38
2. Introducción	39
3. Materiales y métodos.....	40
3.1. Venenos de serpiente.....	40
3.2. HPLC en fase reversa y SDS–PAGE	41
3.3. Caracterización de las fracciones del veneno obtenidas por RP–HPLC	42
3.4. Perfil toxicológico.....	43
3.4.1. Animales.....	43
3.4.2. Letalidad del veneno	43
3.4.3. Actividad miotóxica.....	43
3.4.4. Actividad hemorrágica	44
3.4.5. Actividad edemática inducida por el factor de crecimiento endotelial	
vascular–VEGF purificado del veneno de <i>P. lansbergii lansbergii</i>	44
3.4.6. Parámetros hematológicos.....	44
3.5. Actividades enzimáticas in vitro.....	44
3.5.1. Actividad de fosfolipasa A ₂	44
3.5.2. Actividad coagulante	45
3.5.3. Actividad anticoagulante.....	45
3.5.4. Actividad de proteasas	45
3.5.5. Inhibición de la agregación plaquetaria	46
3.6. Análisis estadístico	46
4. Resultados.....	46
5. Discusión	60
Capítulo 2.....	63
Perfil funcional divergente de una fosfolipasa A₂ ácida y una básica	
proveniente del veneno de serpiente <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i>	64
1. Resumen.....	64
2. Introducción	65
3. Materiales y métodos.....	66

3.1. Veneno de serpiente.....	66
3.2. Aislamiento de Pllans–I y Pllans–II	66
3.3. SDS–PAGE y espectrometría de masas (MS)	67
3.4. Secuenciación parcial de aminoácidos mediante espectrometría de masas en tándem.....	67
3.5. Alineación de secuencias de Pllans–I y Pllans–II	68
3.6. Screening inmunoquímico de reconocimiento cruzado	68
3.7. Perfil toxicológico.....	68
3.7.1. Actividad letal intracerebro–ventricular	69
3.7.2. Actividad miotóxica.....	69
3.7.3. Actividad edemática	69
3.8. Actividades in vitro.....	70
3.8.1. Actividad de fosfolipasa A ₂	70
3.8.2. Actividad anticoagulante.....	70
3.8.3. Citotoxicidad	71
3.9. Análisis estadístico	71
4. Resultados.....	71
4.1. Caracterización bioquímica de Pllans–I y Pllans–II	71
4.2. Ausencia de reconocimiento inmunoquímico de Pllans–I y Pllans–II por anticuerpos contra una PLA ₂ miotóxica de <i>Bothrops asper</i>	75
4.3. Perfiles funcionales de Pllans–I y Pllans–II	76
4.4. Incremento del efecto miotóxico de Pllans–I por Pllans–II.....	79
5. Discusión	80
Capítulo 3.....	84
Potencial antitumoral de <i>Pllans–II</i>, una Asp49–PLA₂ acídica proveniente del veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> sobre células de carcinoma cervical humano.....	85
1. Resumen.....	85
2. Introducción	86
3. Materiales y métodos.....	88
3.1. Veneno	88
3.2. Purificación de la proteína Pllans–II.....	88

3.3. Cultivo celular	89
3.4. Ensayo de citotoxicidad	89
3.5. Análisis del ciclo celular	89
3.6. Análisis de muerte celular	90
3.7. Cuantificación relativa de genes asociados a muerte celular apoptótica mediante PCR en tiempo real	90
3.8. Ensayo de Wound healing	91
3.9. Cuantificación de integrinas	91
3.10. Ensayo de angiogénesis in vitro	92
3.11. Cuantificación de VEGF	92
3.12. Análisis estadístico	92
4. Resultados	93
4.1. Pllans–II disminuyó la viabilidad celular en varias líneas celulares cancerígenas	93
4.2. Pllans–II induce tanto detención del ciclo celular como apoptosis sobre las células HeLa	94
4.3. Nivel de expresión relativa del ARNm de los genes asociados con apoptosis en células HeLa inducidas por Pllans–II.	96
4.4. Efecto de Pllans–II sobre la migración de las células HeLa	97
4.5. Medición de la expresión de integrinas en las células HeLa al ser expuestas a Pllans–II	98
4.6. Efecto de Pllans–II en la formación de nuevos vasos por medio del ensayo angiogénesis	98
5. Discusión	99
Conclusiones	105
Perspectivas	106
Bibliografía	107
Anexos (Artículos publicados en revistas Internacionales)	125
Paper 1: Proteomic and functional analyses of the venom of Porthidium lansbergii lansbergii (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia	126
Paper 2: Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A₂ in the venom of the snake Porthidium lansbergii lansbergii	140

Paper 3: Antitumor potential of Pllans-II, an acidic Asp49-PLA₂ from Porthidium lansbergii lansbergii snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells	151
--	------------

Lista de abreviaturas

5-FU	5-Fluorouracilo
5'-NU	5'-nucleotidasas
ACN	Acetonitrilo
ADP	Adenosina difosfato
APAF1	Factor de activación de la proteasa apoptótica 1
Asp49-PLA ₂	Fosfolipasa A ₂ tipo Aspartato 49
BAD	Promotor de muerte asociado a Bcl-2
BAK	Antagonista de BCL2/Killer
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
BCL2	Linfoma de células B 2
BCL2L1	Bcl-2 tipo 1
BH3	Dominio de homología BCL-2 3
BIRC5	Baculoviral inhibidor de la apoptosis que contienen repetición 5
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
BPP/CNP	Péptido potenciador de bradiquinina/péptido natriurético tipo C
CASP8	Caspasa 8
CBA	Arreglo de esferas citométricas
CCU	Cáncer de cuello uterino
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CHK	Quinasa de control
CICUA	Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical
CK	Creatina quinasa plasmática
CKI	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
CRISP	Proteínas secretoras ricas en cisteínas
CT	Ciclo umbral
CTL	Lectina de tipo C
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ESI-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray
FADD	Proteína del dominio de la muerte asociada a FAS
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

HB	concentración de hemoglobina
HCT	Hematocrito
HGCIN	Neoplasia intraepitelial cervical de alto grado
HUVEC	Células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano
LAO	L-aminoácido oxidasas
LD ₅₀	Dosis letal 50
LDH	Lactato deshidrogenasa
Lys49-PLA ₂	Fosfolipasa A ₂ tipo Lisina 49
MALDI-TOF-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo
MCH	Hemoglobina corpuscular media
MCHC	Concentración media de hemoglobina corpuscular
MCV	Volumen corpuscular medio
MEC	Matriz extracelular
MMP-9	Metaloproteinasa tipo 9
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
MUSCLE	Comparación de secuencias múltiples por expectativa Logarítmica
MTT	3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difenil-tetrazolio-bromuro
NOBA	Ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico
p53	Proteína supresora de tumores
p97	Proteína que contiene valosina
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina micelar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Farmacodinámicas
PDE	Fosfodiesterasas
PK	Farmacocinéticos
PLB	Fosfolipasas B
pRb	Proteína del retinoblastoma
PT	Recuento de plaquetas
RBC	Glóbulos rojos
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
RT	Radioterapia pélvica
RTCT	Quimioterapia de cisplatino semanal concurrente
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SMAC	Segundo activador mitocondrial de caspasas
SP	Serina proteinasas
SVMP	Metaloproteinasas de venenos de serpiente
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
TRAILR	Receptor ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
TSP-1	Trombospondina-1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPH	Virus del papiloma humano
WBC	Glóbulos blancos
XIAP	Caspasa inhibidora de la apoptosis ligado a X

Lista de figuras

	Página
Figura 1	Ilustración de las seis capacidades distintivas del Cáncer 22
Figura 2	Vías de señalización apoptótica tanto extrínseca como intrínseca 24
Figura 3	La cascada de invasión–metástasis 26
Figura 4	Integrinas involucradas en cada paso del desarrollo y progresión del tumor 27
Figura 5	Cronología estimada de la progresión y estadios pre–malignos del cáncer de cuello uterino 28
Figura 6	Progresión mediada por VPH para el cáncer cervical 30
Figura 7	Principios generales de la resistencia a los medicamentos 31
Figura 8	Esquema general de un fosfolípido y puntos de acción de las diferentes clases de fosfolipasas 32
Figura 9	Esquema analítico de la venómica de serpientes 35
Figura 10	Morfología y distribución de la serpiente <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> 41
Figura 11	Separación de las proteínas del veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> por RP–HPLC, seguido de SDS–PAGE 47
Figura 12	Comparación de los perfiles de SDS–PAGE y RP–HPLC de muestras de veneno individuales obtenidas de los tres especímenes de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> utilizados en este estudio. 53
Figura 13	Composición del veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> según las familias de proteínas identificadas y expresada como porcentajes del contenido total de proteína. 54
Figura 14	Actividad miotóxica de los venenos de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> y <i>Porthidium nasutum</i> (50 µg) después de la inyección intramuscular en ratones. 56
Figura 15	Comparación de la actividad hemorrágica de los venenos de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> y <i>Porthidium nasutum</i> (3 µg) después de inyección intradérmica en ratones. 56
Figura 16	Evaluación de parámetros hematológicos después de la inyección intramuscular de veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> (100 µg), o PBS, en ratones. 57
Figura 17	Inhibición de la agregación plaquetaria humana ocasionada por el veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> o por fracciones de desintegrinas 58

Figura 18	Comparación de las actividades enzimáticas de los venenos de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> y <i>Porthidium nasutum</i>	59
Figura 19	Evolución en el tiempo del edema inducido por la fracción de VEGF aislada a partir del veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i> .	59
Figura 20	Aislamiento de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> del veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i>	72
Figura 21	Análisis electroforético de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> mediante SDS-PAGE	72
Figura 22	Masa molecular promedio de isótopos de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> , determinada por espectrometría de masas de ionización por nano electrospray (ESI-MS).	73
Figura 23	Alineación múltiple de secuencias parciales de aminoácidos <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> con fosfolipasas A ₂ homólogas de venenos de serpiente	74
Figura 24	Actividad de fosfolipasa A ₂ de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> ensayada sobre el sustrato monodisperso ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico, o sobre sustrato de fosfatidilcolina micelar	75
Figura 25	Ausencia de reconocimiento cruzado mediante inmunodifusión en gel de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> por anticuerpos de conejo (α -Mt-II) producidos contra la miotoxina II a partir del veneno de <i>Bothrops asper</i>	76
Figura 26	Evaluación de la actividad miotóxica de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> después de una inyección intramuscular en ratones	77
Figura 27	Actividad edemática de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i>	78
Figura 28	Actividad citotóxica de <i>Pllans-I</i> y <i>Pllans-II</i> sobre miotubulos C2C12 de músculo esquelético murino	79
Figura 29	Sinergismo en la actividad miotóxica de <i>Pllans-I</i> cuando se combina con <i>Pllans-II</i> antes de la inyección intramuscular en ratones	80
Figura 30	Actividad citotóxica de <i>Pllans-II</i> y Cisplatino® sobre diferentes líneas celulares cancerígenas y no tumorales usando el ensayo de MTT	93
Figura 31	Efecto de <i>Pllans-II</i> sobre el ciclo celular de las células HeLa	94
Figura 32	Evaluación del tipo de muerte celular inducido por el tratamiento de <i>Pllans-II</i> sobre las células de cáncer de cérvix – HeLa y las células no tumorigénicas de mama – MCF10A	95
Figura 33	Cuantificación relativa de los genes asociados a apoptosis en las células HeLa por PCR en tiempo real, después del tratamiento con 50 µg/mL de <i>Pllans-II</i> por 24 h a 37 °C y 5% de CO ₂	96

Figura 34	Evaluación de la migración de las células HeLa por medio del ensayo de Wound healing	97
Figura 35	Expresión de integrinas ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ and $\alpha 5$) en las células HeLa después de un tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de <i>Pllans-II</i>	98
Figura 36	Análisis <i>in vitro</i> del efecto anti-angiogénico de <i>Pllans-II</i> sobre las células HUVEC	99

Lista de tablas

Tabla 1	Asignación a familias de proteínas por MALDI–TOF–TOF de iones peptídicos seleccionados a partir de bandas de proteínas digeridas con tripsina en gel o ESI–MS/MS de péptidos nativos, a partir de las fracciones aisladas por RP–HPLC del veneno de <i>Porthidium lansbergii lansbergii</i>	Página 47
Tabla 2	Composición proteica comparativa de los venenos de las especies de <i>Porthidium</i> encontradas en Colombia y Costa Rica.	55

Resumen

Introducción: En estados avanzados del cáncer de cérvix, los tratamientos usualmente combinan radio y quimioterapia. Desafortunadamente, este tipo de cáncer puede recidivar después del tratamiento, por lo cual los pacientes frecuentemente abandonan el tratamiento buscando preservar su calidad de vida, pero poniendo en riesgo su sobrevivencia. Por lo tanto, en la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos orientados a intervenir el microambiente del tumor sin afectar las células sanas, las proteínas provenientes de los venenos de serpiente han demostrado ser eficaces. **Objetivos:** El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar bioquímicamente el veneno de la serpiente *P. lansbergii lansbergii* y evaluar el efecto biológico de una de sus Asp49-PLA₂ sobre una línea de adenocarcinoma de cérvix. **Metodología:** Este proyecto se enmarcó en el desarrollo de nuevos medicamentos que pueden ser efectivos para el tratamiento contra el cáncer de cuello uterino en humanos. En la primera fase, se determinó el perfil proteico del veneno de *P. lansbergii lansbergii* mediante SDS-PAGE, MALDI-TOF-TOF y nESI-MS/MS; mientras que la letalidad y las actividades funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* fueron evaluadas, en orden de conocer las características bioquímicas y efectos fisiopatológicos del veneno. En la segunda fase, se purificaron dos de sus fosfolipasas A₂ más abundantes por HPLC y se realizó su identificación mediante MALDI-TOF-TOF. Las actividades funcionales *in vivo* se determinaron sobre ratones CD-1. En la tercera fase, se escogió a la PLA₂ inocua "*Pllans-II*" para ser evaluada como posible agente anticancerígeno y anti-angiogénico. **Resultados:** se caracterizó el veneno de *P. lansbergii lansbergii*, identificando 12 familias de proteínas conocidas: SVMPS, fosfolipasas A₂, desintegrinas, péptidos pequeños, lectina tipo C, serina proteinasas, L-amino ácido oxidasas, CRISP, 5' nucleotidasas, svVEGF, fosfolipasas B y fosfodiesterasas. Funcionalmente, el principal mecanismo de inmovilización de la presa por el veneno podría ser el sangrado, la generación de una permeabilidad vascular y extravasación; produciendo un estado hipovolémico que conlleva a un choque hipovolémico. Las Asp49-PLA₂s purificadas presentaron una masa de 14,136 ± 3 y 13,960 ± 3 Da. Los ensayos determinaron que *Pllans-I* en contraste con *Pllans-II*, fue letal y presentó actividad citotóxica, miotóxica, y anticoagulante. *Pllans-II*, una enzima monomérica mostró una citotoxicidad dosis dependiente y disminuyó la migración de las células de adenocarcinoma de cérvix – HeLa, por interferencia de las integrinas α5 y β1. Además, *Pllans-II* generó arresto del ciclo celular en G1 y estimuló la muerte celular apoptótica. Interesantemente, *Pllans-II* tuvo la capacidad de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos sobre las células HUVEC. **Conclusión:** Por sus características especiales, *Pllans-II* podría ser empleado como un agente anticancerígeno para el desarrollo de nuevos prototipos antitumorales. Sería interesante evaluar el efecto de *Pllans-II* sobre la tumorigénesis *in vivo*, sin menospreciar una mejor comprensión del mecanismo de muerte celular, el potencial de inhibición de la metástasis y estudios funcionales para conocer la interacción de *Pllans-II* con los receptores de integrinas en las células cancerígenas.

Abstract

Introduction: In cervical cancer advanced stages, the treatment usually combines radiotherapy and chemotherapy. Unfortunately, this type of cancer can re-emerge after this treatment and patients often give up treatment in order to avoid the decrease of life quality. Therefore, in the search for new therapeutic alternatives that focus on the tumor microenvironment without affecting healthy cells, proteins from snake venoms have been shown to be very effective. **Objective:** The main objective of this work was to characterize biochemically the snake venom of *P. lansbergii lansbergii* and to evaluate the biological effect of one of its Asp49-PLA₂ on a cervix adenocarcinoma line. **Methods:** This project was part of the development of new drugs that may be effective for the cervical cancer treatment in humans. In the first phase, the *P. lansbergii lansbergii* venom protein profile was determined by SDS-PAGE, MALDI-TOF-TOF and nESI-MS / MS; while the lethality and functional activities both *in vitro* and *in vivo* were evaluated, in order to know the biochemical characteristics and venom pathophysiological effects. In the second phase, two of its most abundant PLA₂ were purified by HPLC and identified by MALDI-TOF-TOF. *In vivo* functional activities were determined on CD-1 mice. In the third phase, the innocuous PLA₂ "*Pllans-II*" was chosen to be evaluated as a possible anticancer and anti-angiogenic agent. **Results:** *P. lansbergii lansbergii* snake venom was characterized, identifying 12 families of known proteins: metalloproteinases, phospholipases A₂, disintegrins, small peptides, C-type lectin, serine proteinases, L-amino acid oxidases, CRISP, 5' nucleotidases, svVEGF, phospholipases B and phosphodiesterases. Functionally, the main mechanism of the prey immobilization by snake venom could be the bleeding, the generation of a vascular permeability and extravasation; producing a hypovolemic state that leads to a hypovolemic cardiovascular shock. Purified Asp49-PLA₂s had a mass of 14,136 ± 3 Da and 13,960 ± 3 Da. *In vivo* and *in vitro* assays determined that *Pllans-I*, in contrast to *Pllans-II*, was lethal and showed cytotoxic, myotoxic, and anticoagulant activity. *Pllans-II*, a monomeric enzyme showed a dose-dependent cytotoxicity and decreased cell migration of cervical adenocarcinoma cells – HeLa, by interference of α5 and β1 integrins. In addition, *Pllans-II* generated cell cycle arrest in G1 and stimulated apoptotic cell death. Interestingly, *Pllans-II* had the ability to inhibit the formation of new blood vessels on HUVEC cells. **Conclusion:** Due to its special characteristics, *Pllans-II* could be used as an anticancer agent for the development of new antitumor prototypes. Therefore, it would be interesting to evaluate the *Pllans-II* effect on *in vivo* tumorigenesis, looking for a better understanding of the cell death mechanism, metastasis disruption potential, and functional studies to clarify how *Pllans-II* interacts with integrin receptors in cancer cells.

Palabras claves

Veneno de serpiente; *Porthidium lansbergii lansbergii*; venómica; toxicidad; fosfolipasa A₂; actividad antitumoral.

Planteamiento del problema

El cáncer de cuello uterino (CCU) es un problema de salud pública mundial. Para el año 2012 se presentaron 4.661 casos nuevos de CCU, y cerca de 1.986 muertes directamente atribuibles a este tipo de enfermedad tumorigénica (GLOBOCAN, 2012). Adicionalmente, un gran porcentaje de mujeres en edad productiva se ven afectadas por una alta morbilidad, lo que a su vez genera trastornos socioeconómicos significativos. En Colombia, entre los años 2007–2011 se produjeron un total de 4462 muertes por CCU, de las cuales el 11.6% se presentaron en el departamento del Valle del Cauca, ubicándolo en el segundo lugar en tasa de muerte por la enfermedad.

En el Registro Poblacional de Cáncer de Cali se registraron 8.963 casos de CCU durante el período comprendido entre 1962 y 2007. 91,2% de estos casos fueron diagnosticados histológicamente y 3,9% de los casos fueron diagnosticados según los certificados de defunción (Muñoz y Bravo, 2012). Adicionalmente, en los registros comprendidos entre los años 1984 y 2011, se encontró que un total de 2.595 mujeres murieron por CCU y la tasa de mortalidad estandarizada por edad entre 2009 y 2011 se estimó en 7 por cada 100.000 mujeres (Muñoz y Bravo, 2014). Por lo tanto, el CCU continúa siendo un problema de salud pública en el país y en la región, que impone un reto para los sistemas de salud de modo que se logren diseñar y poner en marcha intervenciones oportunas, eficaces y articuladas para disminuir la incidencia y mortalidad asociadas a este cáncer, cuyo control debe ser priorizado a través de nuevos y eficientes tratamientos.

En cuanto a los tratamientos para la enfermedad, la radioterapia pélvica (RT) y la quimioterapia de cisplatino semanal concurrente (RTCT) son el estándar actual de atención para pacientes, seguida de la braquiterapia (Vale et al., 2008). En general, del 50% al 60% de los pacientes logran la cura con este enfoque, pero la recurrencia local y la progresión del tumor hacia la metástasis después del tratamiento siguen siendo problemas importantes, especialmente en pacientes con un alto desarrollo tumoral. En ese sentido, existen pocos tratamientos efectivos para los pacientes con cáncer recurrente de cuello uterino después de la RTCT, y a menudo la muerte se presenta después de la disminución significativa de la calidad de vida del paciente por fuertes dolores, hemorragias y otros síntomas debilitantes. Actualmente se están aunando esfuerzos para mejorar el potencial curativo de la RT con una focalización tumoral y una intensificación de dosis más precisas (Sturdza et al., 2016). No obstante, es poco probable que este enfoque por sí solo resuelva por completo el problema (Chaudary et al., 2017).

Adicionalmente, la mayoría de quimioterapias actuales contra el cáncer no son específicas y pueden afectar tanto a las células tumorales como a las células sanas (Sarray et al., 2013). Se conocen hasta el momento más de 50 fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer, pero la eficacia promedio de estos corresponde al 20%, sumado al hecho de que estos producen efectos secundarios significativos (Reid, 2010). Los pacientes con cáncer a menudo renuncian al tratamiento con el fin de evitar la disminución de su calidad de vida, puesto que pueden presentar desde vómitos, náuseas, pérdida de peso, pérdida de apetito, hasta debilidad generalizada, pérdida del cabello, dolores intensos, entre otros.

Por lo tanto, con la necesidad de explorar en la búsqueda de nuevos fármacos y estrategias de tratamiento para el CCU más eficaces y menos tóxicas, se está investigando nuevas moléculas que contrarresten los efectos secundarios de las terapias y que, además se enfoquen en el microambiente del tumor y particularmente en la inhibición de la angiogénesis tumoral. Algunos de estos tratamientos están basados en diversas proteínas activas provenientes de los venenos de serpiente (Sarray et al., 2013). Para el caso de las proteínas de los venenos de la familia Viperidae se ha demostrado que tienen propiedades antitumorales y anti-angiogénicas (Calderón et al., 2014). Esta especificidad ha permitido postular tales proteínas como potenciales agentes farmacológicos.

En Colombia existe un amplio patrimonio biológico, donde las serpientes presentan una fuente de proteínas que podrían constituir una potencial solución para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, poco se conoce acerca de las proteínas que hacen parte del coctel del veneno y su potencial terapéutico que ayude a inhibir el crecimiento descontrolado de células malignas. Es por esta razón que, para la presente investigación, se propone a la fosfolipasa *Plans-II*, una proteína aislada del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii*, como una molécula para constituirse como un candidato potencial para realizar evaluaciones preclínicas en la búsqueda de un tratamiento alternativo contra el cáncer de cuello uterino.

Marco conceptual

Características del cáncer

Las características distintivas del cáncer comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de tumores. Estas características distintivas y complementarias permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica. Dentro de estas características distintivas se encuentran: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir a la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2011).

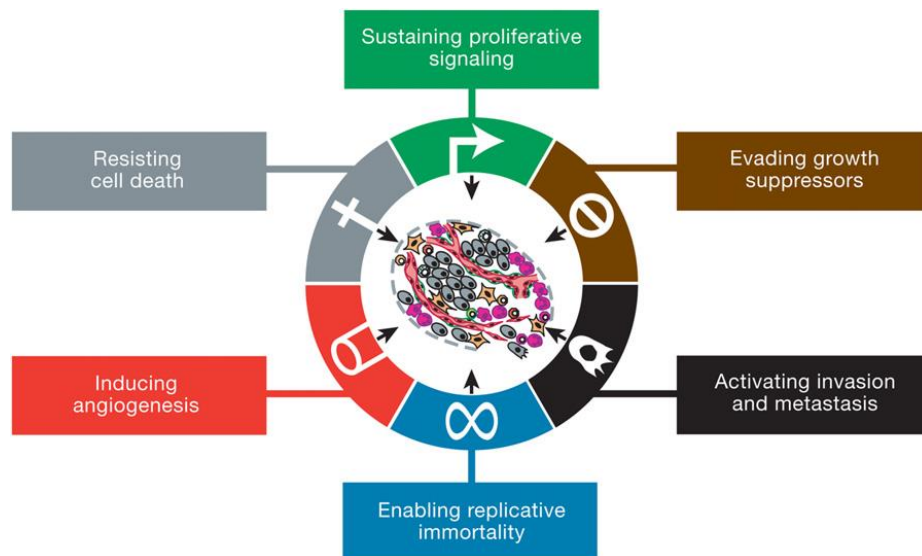


Figura 1. Ilustración de las seis capacidades distintivas del Cáncer. La última década ha sido testigo de un progreso notable hacia la comprensión de los fundamentos mecanicistas de cada sello distintivo.

Señalización proliferativa crónica

Las células normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales de promoción del crecimiento, que instruyen la entrada y la progresión a través del ciclo celular; asegurando una homeostasis del número de células y por lo tanto el mantenimiento de la arquitectura y la función del tejido normal.

Las células cancerosas, al desregular estas señales, se vuelven dueñas de sus propios destinos. Las señales de activación se transmiten en gran parte por factores

de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular, que típicamente contienen dominios de tirosina quinasa intracelulares. Estos receptores por lo general proceden a emitir señales a través de vías ramificadas que regulan la progresión a lo largo del ciclo celular, así como el crecimiento celular. A menudo estas señales influyen en otras propiedades biológicas de la célula, como la supervivencia celular y el metabolismo energético (Hanahan y Weinberg, 2011).

Evasión de los supresores del crecimiento

Las células cancerígenas presentan la capacidad de evadir los programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de la acción de los genes supresores de tumores. Los dos genes supresores más importantes, codifican para las proteínas p53 y retinoblastoma–RB. Estos operan como nodos centrales de control, que regulan los circuitos celulares que gobiernan las decisiones de las células hacia la proliferación o alternatively, activan los programas de senescencia o apoptosis (Burkhart y Sage, 2008; Orth et al., 2012; Kruiswijk et al., 2015).

Mientras que RB transduce señales inhibitoras del crecimiento que se originan fuera de la célula (Burkhart y Sage, 2008), p53 recibe señales de sensores de estrés y anomalías que funcionan dentro de los sistemas operativos intracelulares de la célula; por ejemplo, si el grado de daño al genoma es excesivo, p53 puede detener la progresión del ciclo celular hasta que estas condiciones se hayan normalizado. Alternativamente, frente a señales de alarma que indican un daño irreparable, p53 puede desencadenar apoptosis (Orth et al., 2012; Kruiswijk et al., 2015).

Resistencia a la muerte celular

La muerte celular por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer (Adams y Cory, 2007; Lowe et al., 2004). La elucidación de la red de señalización por muerte apoptótica, ha revelado como se desencadena este tipo de muerte celular en respuesta a diversas reacciones fisiológicas de estrés, que las células cancerosas experimentan durante el curso de la tumorigénesis o como resultado de una terapia anticancerígena (Hanahan y Weinberg, 2011). Entre las situaciones de estrés que inducen apoptosis, se destacan los desequilibrios de señalización, que resultan de los niveles elevados de los oncogenes y daño del ADN asociado con hiperproliferación. Sin embargo, investigaciones han revelado que la apoptosis se atenúa en tumores que logran progresar a estados de alto grado de malignidad y resistencia terapéutica (Adams y Cory, 2007; Lowe et al., 2004). Por

consiguiente, un buen agente anticancerígeno debería estimular una muerte celular apoptótica, de manera específica en el tumor.

La actividad de proteasa de las caspasas, es esencial para las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis. En términos generales, las caspasas pueden activarse a través de una de las dos vías: la vía extrínseca (también llamada receptor de muerte) y la vía intrínseca (también llamada mitocondrial) (Figura 2).

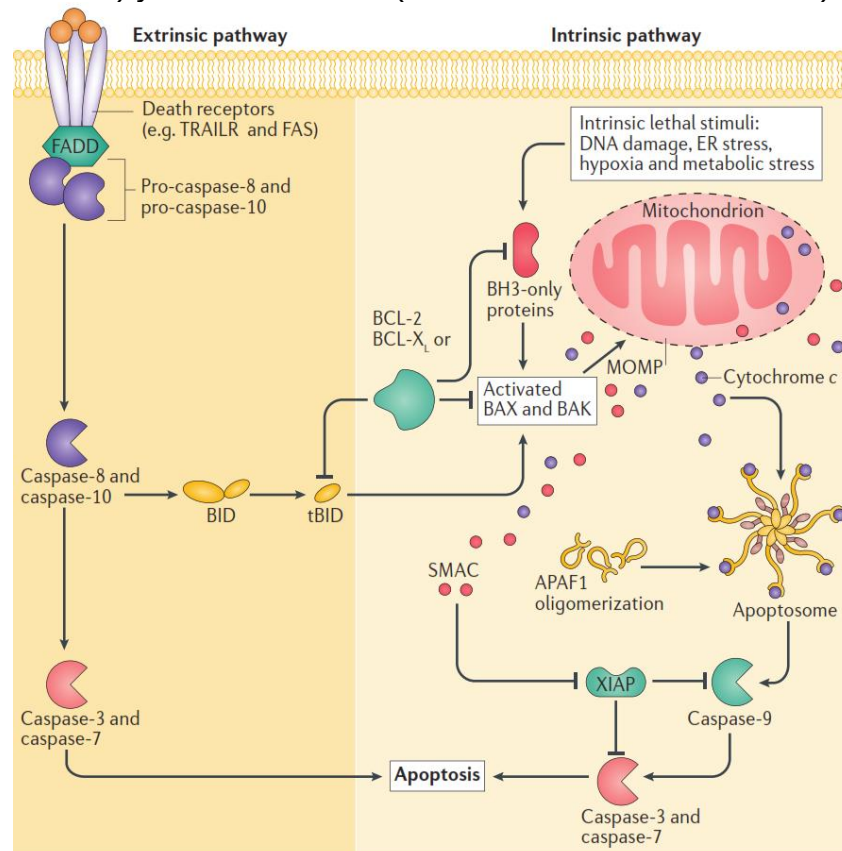


Figura 2. Vías de señalización apoptótica tanto extrínseca como intrínseca (Ichim y Tait, 2016).

La vía extrínseca es activada por la interacción de ligandos con receptores de muerte tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), el ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), el receptor ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAILR) y FAS; que pueden activar las caspasas iniciadoras (caspasa-8 y caspasa-10) a través de la dimerización mediada por proteínas adaptadoras, como la proteína del dominio de la muerte asociada a FAS (FADD).

Luego, de su activación, se escinden; activando las caspasas-3 y 7 efectoras, que conlleva a la apoptosis. La vía intrínseca (o mitocondrial) de la apoptosis requiere la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). Las células estresadas activan el dominio de homología BCL-2 3 (BH3), lo que conlleva a la

activación de BAX y BAK, desencadenando MOMP. Seguido de MOMP, las proteínas del espacio intermembrana mitocondrial tales como el segundo activador mitocondrial de caspasas (SMAC) y el citocromo c, son liberados en el citosol. El citocromo c interactúa con el factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (APAF1), lo que desencadena el ensamblaje del apoptosoma, que activa la caspasa-9. La caspasa-9 activa, a su vez, activa la caspasa-3 y 7, lo que conduce a la apoptosis. La liberación mitocondrial de SMAC facilita la apoptosis al bloquear el inhibidor de la caspasa inhibidora de la apoptosis ligado a X (XIAP) (Ichim y Tait, 2016).

Inmortalidad celular

Las células cancerosas requieren un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Esta capacidad tiene un marcado contraste con el comportamiento de las células en la mayoría de los linajes celulares normales en el cuerpo, que son capaces de atravesar solo un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular. Esta limitación se ha asociado con dos barreras distintas a la proliferación: la senescencia, una entrada típicamente irreversible a un estado no proliferativo pero viable, y una crisis, que implica la muerte celular. En consecuencia, cuando las células se propagan en el cultivo, los ciclos repetidos de división celular conducen primero a la inducción de senescencia y luego, para aquellas células que logran sortear esta barrera, a una fase de crisis, en la que la gran mayoría de las células de la población mueren. En raras ocasiones, las células emergen de una población en crisis y exhiben un potencial replicativo ilimitado. Esta transición se ha denominado inmortalización, un rasgo que la mayoría de las líneas celulares establecidas poseen en virtud de su capacidad para proliferar en los cultivos celulares sin evidencia de senescencia o crisis (Hanahan y Weinberg, 2011).

Inducción de angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren de sostenimiento energético por medio de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La neo-vasculatura asociada a tumores, generada por el proceso de angiogénesis, aborda estas necesidades (Hanahan y Weinberg, 2011). Durante la progresión del tumor, casi siempre se activa un "interruptor angiogénico", que estimula la generación de nuevos vasos a partir de una vasculatura normalmente inactiva, que ayudan a sostener los crecimientos neoplásicos en expansión (Hanahan y Folkman, 1996).

El cambio angiogénico está gobernado por factores compensatorios que inducen o se oponen a la angiogénesis (Baeriswyl y Christofori, 2009; Bergers y Benjamin, 2003). Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización, que se unen a los receptores estimulantes o inhibidores presentes en la superficie de las células endoteliales vasculares. Dentro de las moléculas pro-angiogénicas implicadas en el mantenimiento de la angiogénesis tumoral se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Baeriswyl y Christofori, 2009). En cambio, la trombospodina-1 (TSP-1) es una proteína que provoca señales supresivas que pueden contrarrestar los estímulos pro-angiogénicos (Kazerounian et al., 2008), ya que también se unen a los receptores transmembrana expresados por las células endoteliales.

Invasión y metástasis

La metástasis por carcinomas se forma después de completar una sucesión compleja de eventos biológicos celulares, denominados colectivamente la cascada invasión-metástasis (Valastyan y Weinberg, 2011). En esta cascada, las células epiteliales en los tumores primarios: invaden localmente la matriz extracelular (MEC) circundante y las capas de las células estromales, intravasan el lumen de los vasos sanguíneos, sobreviven a los impedimentos del transporte a través de la vasculatura, se detienen en órganos distantes, extravasan el parénquima de tejidos distantes, sobreviven en estos nuevos microambientes extraños para formar micrometástasis y reinician sus programas proliferativos en sitios metastásicos; generando así crecimientos neoplásicos macroscópicos, clínicamente detectables (denominado a menudo "colonización metastásica") (Valastyan y Weinberg, 2011) (Figura 3).

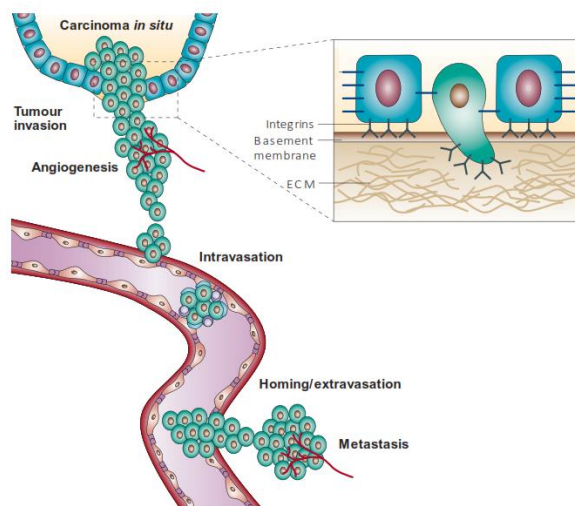


Figura 3. La cascada de invasión-metástasis. Durante la progresión metastásica, las células tumorales salen de sus sitios primarios de crecimiento (invasión local, intravasación), se translocan

sistémicamente (supervivencia en la circulación, detención en un sitio de órgano distante, extravasación) y se adaptan para sobrevivir y prosperar en los microentornos extraños de tejidos distantes (formación de micrometástasis, colonización metastásica). Las células de carcinoma están representadas en verde (Guo y Giancotti, 2004).

En las adhesiones células-MEC, la migración celular, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células, observadas en muchos procesos biológicos; están reguladas por receptores de adhesión celular conocidos como integrinas (Guo y Giancotti, 2004; Takada et al., 2007) (Figura 4).

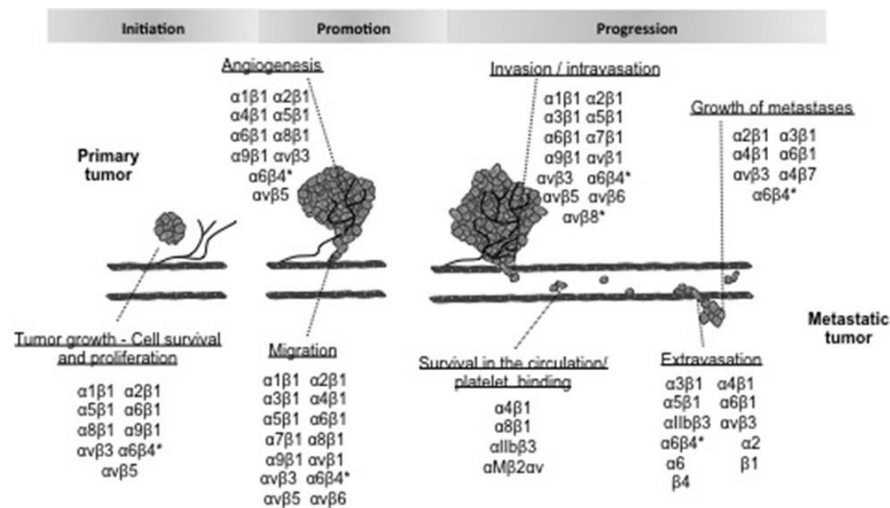


Figura 4. Integrinas involucradas en cada paso del desarrollo y progresión del tumor. Las integrinas expresadas en las células tumorales contribuyen a la progresión tumoral y a la metástasis por el incremento de la migración, invasión proliferación y supervivencia de las células tumorales. La adhesión de la integrina a la MEC proporciona la tracción requerido para la invasión de células tumorales. Las integrinas también contribuyen a la invasión de las células tumorales al regular la localización y la actividad de las proteasas que degradan la matriz, como la metaloproteasa de matriz tipo 2 (Macedo et al., 2015).

Por lo tanto, las integrinas contribuyen a la progresión del cáncer (Desgrosellier y Cheresh, 2010) y desempeñan un papel importante en la proliferación, la supervivencia, la angiogénesis del tumor y la metástasis (Rathinam y Alahari, 2010). La expresión de las integrinas puede variar significativamente entre el tejido normal y el cáncer y, por consiguiente, se pueden usar como dianas en la terapia del cáncer.

Cáncer de cuello uterino

El cáncer es una de las primeras causas de muerte no violenta, tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados (OMS, 2005). En el año 2008, se registraron 12.7 millones de casos nuevos de cáncer y 7,6 millones de personas

murieron de cáncer a nivel mundial (Ferlay et al., 2008). Se estima que alrededor de 11,5 millones de personas morirán de cáncer en el año 2030 (Mathers y Loncar, 2006).

El CCU es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero (unión pavimentoso–cilíndrica; puede incluir las células escamosas externas, las células glandulares internas o ambas). La lesión precursora es una displasia: neoplasia intraepitelial cervical (CIN, por sus siglas en inglés) o adenocarcinoma in situ, que posteriormente se puede tornar en cáncer invasivo (NIH, 2016). Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, habitualmente de lenta y progresiva evolución en el tiempo, que se suceden generalmente en etapas. En grado variable evolucionan a cáncer in situ cuando compromete sólo a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal e invade el estroma del cuello uterino (Figura 5). Los cánceres de cuello uterino y los pre-cánceres se clasifican de acuerdo con el aspecto que presentan bajo el microscopio. Los dos tipos más comunes de cánceres de cuello uterino son el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma (Umar et al., 2012).

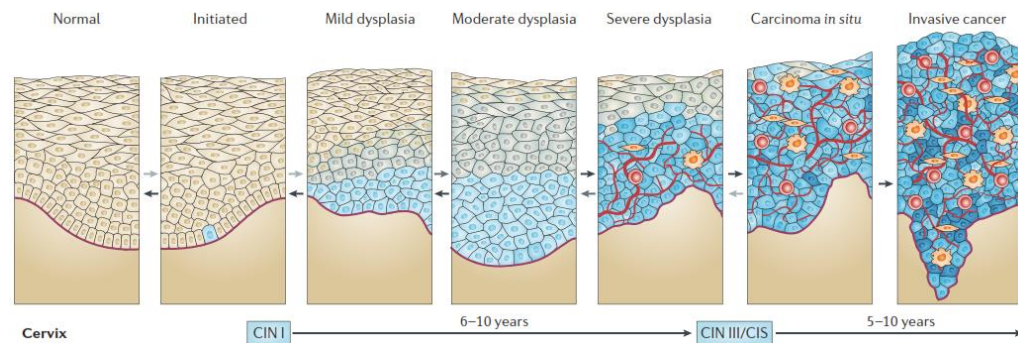


Figura 5. Cronología estimada de la progresión y estadios pre-malignos del cáncer de cuello uterino. La progresión del tejido normal a cáncer invasivo se caracteriza por cambios genéticos y epigenéticos que se producen en diferentes puntos a lo largo del continuum carcinogénico. Debido al largo tiempo transcurrido entre la iniciación y el cáncer manifiesto (es decir, invasivo), en la mayoría de los tipos de cáncer las estrategias de intervención temprana y prevención pueden potencialmente interrumpir el proceso de progresión del cáncer. Las células anaranjadas representan cambios en el microambiente tumoral, incluyendo el reclutamiento de células inmunes, la inducción de la angiogénesis y las alteraciones en las células circundantes, tales como fibroblastos. CIN: adenocarcinoma in situ; CIS: carcinoma *in situ* (Modificado de Umar et al., 2012).

El cáncer de cuello uterino, como todos los tipos de tumores sólidos, requiere de la activación del proceso de angiogénesis para que las células que van a conformar el tumor reciban el oxígeno y los nutrientes necesarios para suplir sus requerimientos metabólicos. La angiogénesis se ha asociado clínicamente con la progresión de las lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales hacia carcinomas invasivos, lo cual se ve evidenciado por una neovascularización y un incremento en la densidad y tamaño de los vasos en la zona de contacto estroma–epitelio del cuello uterino. Tal

proceso angiogénico se relaciona con las condiciones de hipoxia, las cuales promueven la sobreexpresión de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y con la expresión de proteasas extracelulares que incluyen metaloproteinasa tipo 9 (MMP-9) (Giraudo et al., 2004; De palma et al., 2017). Smith-McCune y Weidner (1994) demostraron que la neovascularización que acompaña a las displasias cervicales se da en una serie de pasos que facilitan la difusión de compuestos pro-angiogénicos hacia el tejido displásico, lo cual hace posible la neovascularización. Es por esta razón que se hace necesario encontrar moléculas que afecten el potencial pro-angiogénico de las células cancerosas para afectar su proliferación.

Infección por el virus del papiloma humano

El principal factor de riesgo del carcinoma pre-invasivo o invasivo de cuello uterino es la infección por el VPH, la cual sobrepasa en gran medida otros factores de riesgo conocidos (NIH, 2016). La infección transitoria por el VPH es frecuente en las mujeres jóvenes (Dunne et al., 2007), mientras que el cáncer de cuello uterino es poco frecuente en ellas. La persistencia de una infección por VPH conduce a un riesgo mayor de lesiones precancerosas y cancerosas (Rodríguez et al., 2008; Jaisamrarn et al., 2013). En la actualidad se conocen más de 70 tipos de virus del VPH, mostrando cada tipo un tropismo característico por diversos sitios anatómicos específicos; entre ellos las infecciones en piel y mucosas del tracto oral, respiratorio y ano-genital (Woodman et al., 2007; Wiesner et al., 2009). Ciertos tipos de VPH pueden causar verrugas en o alrededor de los órganos genitales femeninos y masculinos, así como en el área del ano. A estos tipos se les llama VPH de bajo riesgo porque rara vez están asociados con el cáncer. A otros tipos de VPH se les llama tipos de alto riesgo porque están fuertemente vinculados con cánceres, incluyendo cáncer de cuello uterino, vulva y vagina en mujeres, cáncer de pene en los hombres, y cáncer de ano, boca y garganta tanto en hombres como en mujeres (ACS, 2016).

La evidencia epidemiológica existente, relaciona más de 50 tipos de VPH que infectan el aparato genital; de estos, los tipos 16 y 18 son los que se han relacionado más estrechamente con la presentación de displasia de alto grado y cáncer. El VPH 18 es el más asociado con el adenocarcinoma del cuello uterino; el VPH 16, seguido por el VPH 18, son los tipos más frecuentemente detectados cuando se diagnostica el carcinoma de células escamosas (Clifford et al., 2003; Muñoz et al., 2003).

La frecuencia con que se encuentra el VPH 16 en formas integradas aumenta con la gravedad de la neoplasia cervical, aunque en algunas mujeres con enfermedad invasiva sólo se detectan formas episomales. Por el contrario, el VPH 18 se encuentra casi siempre sólo en formas integradas en mujeres con neoplasia

intraepitelial cervical de alto grado (HGCIN) y enfermedad invasiva (Figura 6) (Woodman et al., 2007).

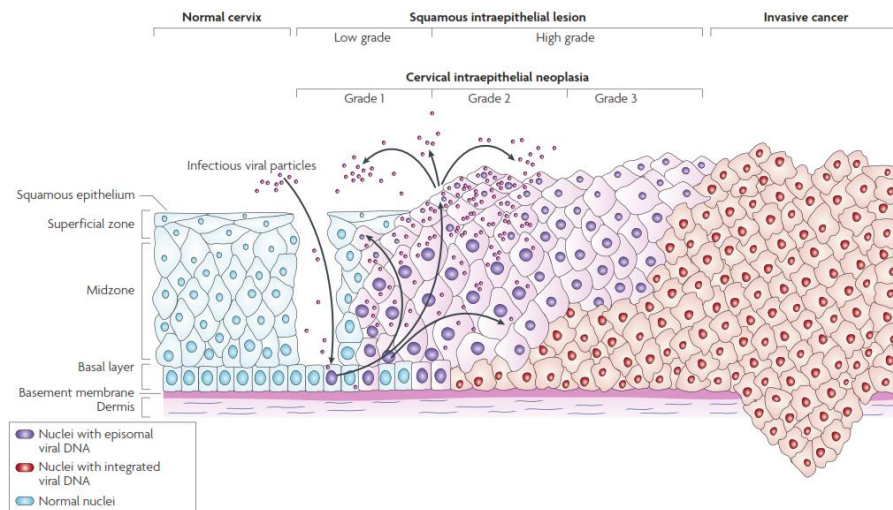


Figura 6. Progresión mediada por VPH para el cáncer cervical. Las células basales en el epitelio cervical reposan sobre la membrana basal, que es apoyada por la dermis. Se cree que el virus del papiloma humano tiene acceso a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio cervical. En las capas superiores del epitelio (zona media y zona superficial) se replica el nuevo genoma viral para formar viriones de progenie en el núcleo, e iniciar una nueva infección. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado soportan la replicación viral productiva. Un número desconocido de infecciones por VPH de alto riesgo avanzan a HGCIN. La progresión de las lesiones no tratadas a cáncer micro-invasivo e invasivo están asociado con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped (núcleos rojos) (Modificado de Woodman et al., 2007).

La interrupción de rutas intracelulares y extracelulares generadas por la presencia de VPH, y la expresión de oncoproteínas para el mantenimiento del fenotipo maligno, se han identificado como condiciones para la conversión hacia tumores malignos (Aguayo et al., 2010).

Una vez el virus se integra, se da una disrupción en la síntesis de la proteína E2, la cual es una represora del promotor p97; esto causa una sobreexpresión de las proteínas E6 y E7, que a su vez induce la pérdida de las proteínas p53 y pRb. En carcinogénesis de cuello uterino, la desregulación en la expresión de estos dos oncogenes virales en las células basales debido a la integración del VPH es considerada un evento crítico para el avance hacia la enfermedad (Aguayo et al., 2010).

Tratamiento para el cáncer de cuello uterino

Dentro de las posibles terapias empleadas en la actualidad para tratar el CCU, se encuentran: terapia del dolor y rehabilitación, cuidados paliativos, radioterapia y

quimioterapia. Todos necesarios para la atención integral de las mujeres afectadas por el CCU (Ramírez et al., 2000).

El método no quirúrgico que actualmente predomina para el tratamiento de cáncer de cuello uterino y otros tipos de cáncer se basa en la administración de quimioterapia y radioterapia. La radioterapia pélvica, que suele ser un tratamiento concomitante a la quimioterapia para tratar el cáncer de cuello uterino, genera unos efectos secundarios debido a la irradiación de los órganos que rodean al cuello uterino y el útero (ESMO, 2012, ACS, 2016). Estos efectos adversos son los causantes de que muchas de las mujeres que se someten al tratamiento renuncien al mismo en pro de que no se vea disminuida su calidad de vida.

Las drogas tradicionalmente usadas en quimioterapia son Cisplatino y 5-Fluorouracilo (5-FU), las cuales inducen la apoptosis, pero de una manera no específica y por ende no actúan directamente sobre el microambiente del tumor, siendo por ello medicamentos que destruyen también células sanas (Sarray et al., 2013). Adicionalmente, los efectos citotóxicos generados en los tejidos sanos limitan la cantidad de fármacos que pueden ser administrados en un tratamiento, y los efectos farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) limitan la cantidad de fármaco que llega al tumor (Figura 7) (Holohan et al., 2013).

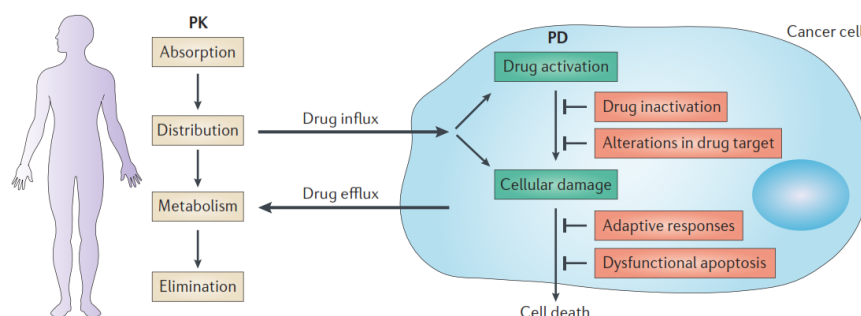


Figura 7. Principios generales de la resistencia a los medicamentos. Factores farmacocinéticos (PK) tales como la absorción del fármaco, distribución, metabolismo y eliminación; limitan la cantidad de fármaco administrado sistémicamente para alcanzar el tumor. En el tumor, la limitada actividad anticancerígena del fármaco está determinada por las propiedades farmacodinámicas (PD), tales como la pobre entrada o la salida excesiva del fármaco, la inactivación o poca activación de la molécula, los cambios en los niveles de expresión de la diana del fármaco; la activación de la respuesta adaptativa de supervivencia, y la pérdida de inducción de muerte celular, debido a una apoptosis disfuncional.

Los venenos de serpientes como fuente terapéutica

Con el fin de reducir los efectos secundarios asociados a la quimioterapia y radioterapia en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, desde la esfera académica se vienen realizando investigaciones con nuevos tratamientos

potenciales, siendo ejemplo de ello el veneno de abeja (Kim et al. 2015), el veneno de anuros y escorpiones (Gomes et al., 2010) y el veneno de serpiente (Bernardes–oliveira et al. 2016). Todos estos estudios tienen en común la búsqueda de agentes que induzcan apoptosis de una manera específica en las células cancerígenas, como es el caso de las fosfolipasas tipo A₂ (PLA₂), las cuales han presentado efectos citotóxicos sobre varias líneas celulares cancerígenas sin afectar aparentemente las células normales (Calderón et al., 2014).

Fosfolipasas de venenos de serpiente

Las PLA₂s pertenecen a una familia grande de enzimas que hidrolizan glicerofosfolípidos en la posición sn–2 del esqueleto de glicerol, liberando lisofosfolípidos, ácido araquidónico y ácidos grasos (Figura 8). La mayoría de estas PLA₂s existen como homodímeros y tienen una estructura similar, caracterizada por varias regiones de hélice alfa, una pequeña región de hojas beta, y siete puentes disulfuro (Arni et al., 1995).

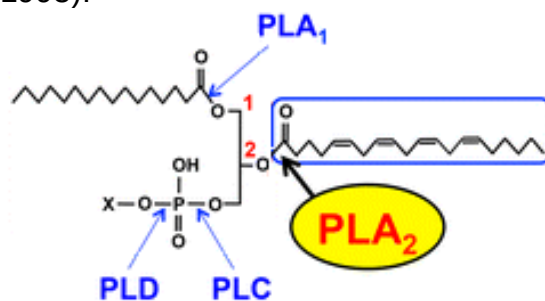


Figura 8. Esquema general de un fosfolípido y puntos de acción de las diferentes clases de fosfolipasas.

Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en diferentes secreciones y fluidos biológicos, como los generados por procesos inflamatorios, las secreciones pancreáticas, las lágrimas, así como venenos de artrópodos, moluscos y serpientes; cumpliendo roles esenciales para las actividades biológicas (Mora et al., 2005). Para el caso de las PLA₂s presentes en los venenos de serpiente, además de su rol en la digestión de la presa, presentan una amplia variedad de efectos farmacológicos que interfieren con los procesos fisiológicos normales (Kini, 2003), lo cual crea el potencial para su uso en tratamientos contra el cáncer.

Las PLA₂s tipo II son la subdivisión a la cual pertenecen las fosfolipasas encontradas en el veneno de las serpientes Viperidae. Estas a su vez se subdividen en dos tipos: Asp49–PLA₂, la cual presenta un residuo de ácido aspártico en la posición 49 de la región catalítica, y Lys49–PLA₂, que en lugar de ácido aspártico presenta lisina en la posición 49 de la región catalítica; esta última se considera catalíticamente

inactiva debido a que no presenta la capacidad de unirse al cofactor Ca^{2+} (Rodrigues et al., 2009). Para los dos tipos de fosfolipasas, se ha reportado un rol importante en la citotoxicidad, lo cual sugiere un potencial pro-apoptótico en tratamientos anticancerígenos (Osipov y Utkin, 2017). Se ha dilucidado que la citotoxicidad no está asociada con la actividad enzimática de las fosfolipasas, sino que hay receptores de superficie celular implicados y rutas de transducción de señales intracelulares (Osipov & Utkin, 2017).

Fosfolipasas como posibles agentes anticancerígenos

Recientemente, una Lys49-PLA₂ aislada del veneno de *Bothrops pauloensis*, BnSP-6, generó citotoxicidad dependiente de la dosis e inhibió la adhesión en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231; junto con una baja actividad citotóxica contra MCF 10A, una línea de células no tumorigénicas de mama (Azevedo et al., 2016). Por otra parte, Una PLA₂ acídica proveniente del veneno de *Bothrops jararacussu* (BthA-I-PLA₂), y una Lys49-PLA₂ (MjTX-II) de *Bothrops moojeni* presentaron efectos antitumorales sobre leucemia T humana, adenocarcinoma de mama y tumor de ascitis de Ehrlich (Roberto et al., 2004; Stábeli et al., 2006). Además, se ha demostrado el efecto antitumoral de la crotoxina, una PLA₂ derivada del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cura et al., 2002). Adicionalmente, dos PLA₂ purificadas del veneno de *Cerastes cerastes*, CC-PLA₂-1 y CC-PLA₂-2, fueron capaces de inhibir la adhesión y migración en líneas celulares de melanoma y fibrosarcoma, junto con la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Zouari-Kessentini et al., 2009; Kessentini-Zouari et al., 2010).

A pesar de estos hallazgos, hay pocos estudios que hayan evaluado la actividad de PLA₂ en células de cáncer de cuello uterino. Recientemente, Erzurumlu y colaboradores (2017) observaron que una fracción de fosfolipasa del veneno de *Montivipera bulgardaghica* alteró el ciclo celular de una línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano-HeLa, sin inducir apoptosis.

Modelos tumorales in vitro

En la búsqueda de nuevos tratamientos anticancerígenos y antimetastásicos, los modelos *in vitro* e *in vivo* son herramientas importantes para su investigación. Si bien los modelos *in vivo* tales como xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos y ratones genéticamente modificados, capturan la complejidad del proceso cancerígeno y metastásico en un sistema vivo; la visualización de los pasos individuales es un desafío y la extracción de datos mecanicistas cuantitativos suele ser muy difícil (Katt et al., 2016). En cambio, los

modelos *in vitro* reducen la relevancia fisiológica, capturando solo aspectos limitados del microambiente tumoral, pero permiten el control de la mayoría de las variables experimentales y el análisis cuantitativo. Así, son el primer paso para determinar el efecto biológico de una molécula sobre diversas líneas cancerígenas y su efecto sobre líneas no tumorigénicas.

Los modelos *in vitro* de tumores sólidos varían en complejidad y varían desde líneas celulares derivadas de tumores, hasta modelos 3D del microambiente tumoral (Hulkower y Herber, 2011; Vidi et al., 2013). Se han desarrollado modelos para proporcionar una visión más clara de la proliferación tumoral, la migración, la invasión, la extravasación, la angiogénesis y la administración de fármacos.

La complejidad del modelo depende en gran medida de los objetivos de la investigación. Por ejemplo, el cribado preliminar de fármacos anticancerígenos se puede realizar en un cultivo celular. Los estudios de invasión de las células tumorales se pueden realizar con células integradas en una MEC. Los estudios de extravasación requieren un microambiente que incorpore uno o más micro vasos perfundibles.

Además, un componente clave de cualquier modelo tumoral *in vitro* es una fuente de células cancerosas. Las líneas celulares cancerígenas son fáciles de cultivar, permiten la comparación directa de los resultados experimentales y se usan ampliamente para estudiar los mecanismos moleculares de las células tumorales (Greshock et al., 2007; Holliday y Speirs, 2011), al ser afectados por nuevos agentes anticancerígenos.

Venómica de serpientes

A pesar de que los venenos de la familia Viperidae pueden contener más de 100 componentes proteicos (Serrano et al., 2005), la mayoría pertenecen a unas pocas familias de proteínas sin actividad enzimática (péptidos natriuréticos, desintegrinas, lectinas tipo C, VEGF y proteínas secretoras ricas en cisteínas–CRISP) y una pocas presentan actividad enzimática (metaloproteasas, serina proteinasas, L–amino ácido oxidasa y PLA₂ tipo II) (Calvete et al., 2007).

Existen diferentes estrategias proteómicas para el análisis e identificación de los componentes de un veneno (Kamiguti et al., 2000; Fox et al., 2006; Calvete, 2011). Los componentes novedosos de un veneno algunas veces no pueden ser reconocidos basándose únicamente en la búsqueda automatizada de los espectros MS/MS de péptidos tripticos contra las bases de datos existentes; especialmente teniendo en cuenta la falta de datos genómicos sobre este grupo de reptiles. Sin

embargo, utilizando la secuenciación de novo de aminoácidos o la secuenciación N-terminal para muestras previamente purificadas por HPLC en fase reversa, y su caracterización mediante SDS-PAGE, la venómica permite encontrar componentes del veneno no reconocidos previamente (Figura 9) (Calvete et al., 2007; Lomonte et al., 2014).

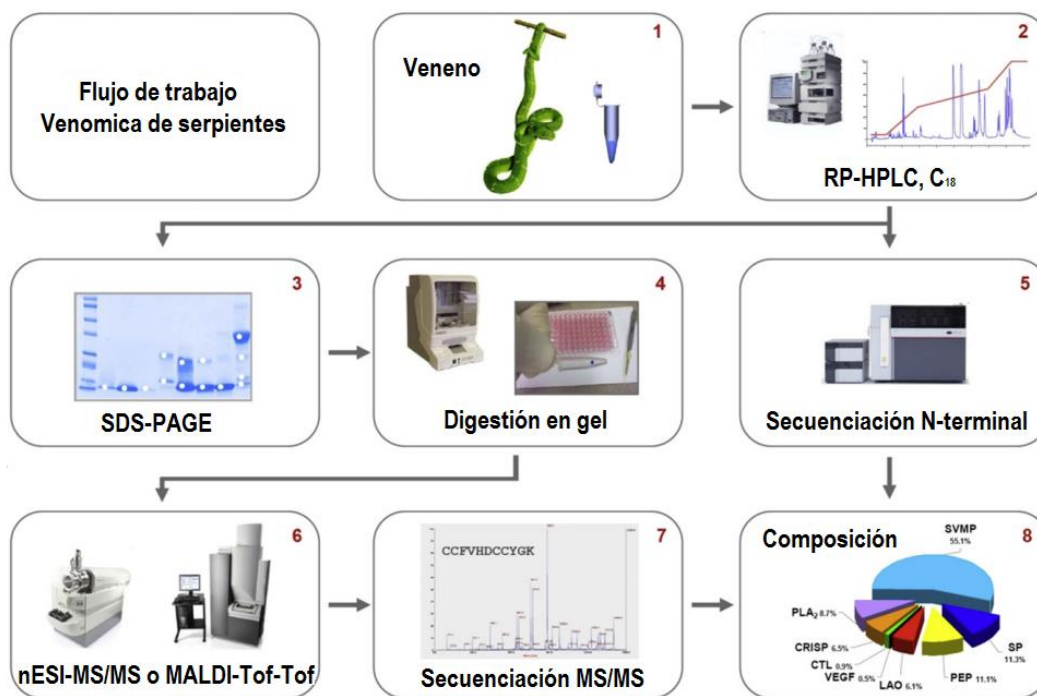


Figura 9. Esquema analítico de la venómica de serpientes. (Calvete et al., 2007; Lomonte et al., 2014).

Puesto que los venenos contienen componentes de valor médico y biotecnológico, el estudio venómico de las serpientes facilitará el aprovechamiento de este recurso a través de estudios en investigación básica aplicada, para el desarrollo de herramientas de diagnóstico clínico y de drogas con potencial uso clínico con actividad anticancerígena.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar bioquímicamente el veneno de la serpiente *P. lansbergii lansbergii* y evaluar el efecto biológico de una de sus fosfolipasas A₂ tipo Asp49 sobre una línea de adenocarcinoma de cérvix humano

Objetivos Específicos

- Determinar el perfil proteómico y funcional del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii* proveniente del Departamento del Atlántico.
- Analizar el perfil funcional divergente de las fosfolipasas A₂ ácida y básica provenientes del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii*.
- Evaluar el potencial antitumoral de la fosfolipasa A₂ ácida “*Plans-II*” proveniente del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii* sobre células de adenocarcinoma cervical humano.

Capítulo 1

Análisis proteómico y funcional del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* proveniente del Departamento del Atlántico

1. Resumen

El veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii*, una especie que se encuentra en la Región Norte de Colombia, es poco conocido. Por ende, con el objetivo de contribuir al conocimiento sobre los venenos de las especies de *Porthidium*, se llevó a cabo su análisis proteómico y la evaluación funcional de las actividades relacionadas con su toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. De los 51 componentes proteicos obtenidos mediante una combinación de RP-HPLC y SDS-PAGE, 47 fueron asignados a 12 familias de proteínas conocidas. De manera similar a dos venenos previamente caracterizados de especies dentro de este género, *Porthidium nasutum* y *Porthidium ophryomegas*; el veneno de *P. lansbergii lansbergii* también está dominado por metaloproteinasas, aunque en una menor proporción. Una característica común de los tres venenos de *Porthidium*, parece ser su alto contenido de desintegrinas. En el veneno de *P. lansbergii lansbergii* se encontraron proteínas pertenecientes a familias que no se habían reportado previamente en los venenos de *Porthidium*, tales como fosfodiesterasas, factor de crecimiento endotelial vascular – VEGF, y fosfolipasa B. El veneno de *P. lansbergii lansbergii* mostró una actividad letal relativamente débil en ratones e indujo una miotoxicidad local moderada, pero con hemorragia considerable. La molécula VEGF aislada, mostró una potente actividad edemática mediante el ensayo de la almohadilla plantar en ratón. Se observó trombocitopenia significativa, sin otros cambios hematológicos importantes en los ratones que fueron inoculados con el veneno. *In vitro*, este veneno no presentó efecto coagulante en plasma humano, e indujo una potente inhibición de la agregación plaquetaria, la cual fue reproducida por desintegrinas purificadas del veneno. Además, se demostró que el veneno presenta actividad proteolítica y de fosfolipasa A₂. En general, la información reportada en esta investigación sobre la composición y función del veneno de *P. lansbergii lansbergii*, puede contribuir a una mejor comprensión de los envenenamientos por esta especie de serpiente, de las que no se dispone información clínica específica.

2. Introducción

El género de serpientes neotropicales *Porthidium* incluye nueve especies y son comúnmente conocidas como “hognose pitvipers”. Se encuentran en las tierras bajas de bosques tropicales desde el sur de México continuando a través de América Central hasta el noroeste de América del Sur, en países como Ecuador, Venezuela y Colombia (Campbell y Lamar, 2004). Dos de estas especies se encuentran en Colombia: *Porthidium nasutum* en la Región del Pacífico, y *Porthidium lansbergii lansbergii* en la Región Caribe (Otero, 2014). Esta última, conocida localmente como “patoco” o “patoquilla”, es una especie terrestre que alcanza hasta 90 cm de longitud. Tiene hábitos nocturnos y pasa la mayor parte del tiempo entre la hojarasca o bajo troncos caídos. Se alimenta de lagartijas, ranas y pequeños roedores. Habita en tierras áridas y semiáridas y en las zonas húmedas de la Región Caribe hasta el valle del río Magdalena, desde elevaciones bajas hasta los 1400 m sobre el nivel del mar (Campbell y Lamar, 2004; Otero, 2004).

La información de los venenos de las subespecies de *P. lansbergii* es escasa. Se reportó que el veneno de *Porthidium lansbergii rozei* de Venezuela posee actividad hemorrágica, miotóxica, de fosfolipasa A₂ (PLA₂) y proteolítica (Ramos et al., 2010). El veneno de *Porthidium lansbergii hutmanni* mostró inhibición de la agregación plaquetaria, formación de edema, actividades fibrinolítica y hemorrágica; y de este veneno se aisló una metaloproteinasa de 23 kDa (Porthidin-1) (Girón et al., 2011; Lopez-Johnston et al., 2007a, b).

En cambio, para el caso del veneno de *P. lansbergii lansbergii* no se ha caracterizado a pesar de la relevancia epidemiológica de esta especie en el Departamento del Atlántico, donde es responsable de aproximadamente el 20% de los casos de envenenamiento por mordedura de serpiente (Paredes 2012). Además, las características clínicas de los envenenamientos por esta especie no se han discutido específicamente en la literatura médica (Otero et al., 2002; Escobar y Fuentes, 2004).

Un número creciente de análisis a profundidad sobre la composición proteica de los venenos de serpiente, está conduciendo a una mejor comprensión de sus diversos perfiles y efectos toxicológicos. Además, dicha información proporcionará nuevos conocimientos sobre las relaciones evolutivas de las especies de serpientes y la diversificación de sus arsenales tóxicos (Fry y Wüster, 2004; Fox y Serrano, 2008; Calvete, 2013). Sin embargo, poco se conoce sobre los venenos de las diversas especies y subespecies que constituyen el género *Porthidium*. Un estudio previo analizó los proteomas de los venenos de *P. nasutum*, *P. ophryomegas* y *Cerrophidion godmani* (actualmente *Cerrophidion sasai*); esta última especie se clasificaba previamente dentro del género *Porthidium* (Lomonte et al., 2012). La composición observada de sus venenos estaba de acuerdo con la hipótesis actual

sobre la relación filogenética entre estas especies, al revelar el perfil divergente de *C. godmani* en comparación con la similitud entre las otras dos especies de *Porthidium* (Lomonte et al., 2012). Por lo tanto, los análisis de "venómica" pueden proporcionar información potencialmente útil sobre las relaciones entre los taxones de serpientes estrechamente relacionadas; así como se ilustró también en un reporte reciente sobre el veneno de *Bothrops ayerbei*, una especie recién descrita en Colombia, que solía considerarse una forma variante de *Bothrops asper* (Mora–Obando et al., 2014). En un esfuerzo por ampliar el conocimiento sobre los venenos del género *Porthidium*, el presente estudio describe el primer análisis del veneno de *P. lansbergii lansbergii* de Colombia, reportando su perfil proteico y funcional.

3. Materiales y métodos

3.1. Venenos de serpiente

El veneno se obtuvo de tres especímenes adultos de *P. lansbergii lansbergii*. Se encontraron dos serpientes cerca de la finca Villa LEJO, en el municipio de Juan de Acosta (~10°49'05.31"N, 75°00'09.59"W; 97 m.s.n.m), y la otra en el corregimiento de Campeche, cerca del municipio de Baranoa (~10°43'29.22"N, 74°54'48.95"W; 106 m.s.n.m), pertenecientes al Departamento del Atlántico, Colombia (Figura 10). Las serpientes fueron liberadas después de la colección de sus venenos.

Las muestras fueron centrifugadas para eliminar residuos no proteicos y los sobrenadantes se secaron en una centrífuga de vacío y almacenados a –20°C. En algunos ensayos, se incluyó un pool de veneno obtenido de adultos de *P. nasutum* de Costa Rica (proporcionado por el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica) con fines comparativos.

El presente proyecto contó con la certificación N° 844 de Mayo 16 de 2014 del ministerio del Interior en la cual indicó que no hay presencia de comunidades étnicas en los 4 municipios del departamento del Atlántico (Juan de Acosta, Baranoa, Piojó, Usicaurí) donde se realizó el muestreo y el permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial de La Corporación Autónoma Regional del Atlántico – C.R.A., mediante Resolución N° 000187 de 2015.



Figura 10. Morfología y distribución de la serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii*. **(A)** Morfología de un espécimen de *Porthidium lansbergii lansbergii* colectado en Juan de Acosta, Departamento del Atlántico, a 97 m sobre el nivel del mar (punto rojo en el mapa), y **(B)** distribución geográfica de la especie en Colombia, indicada en verde oscuro. Fotografía: Luis Manuel Solano.

3.2. HPLC en fase reversa y SDS–PAGE

La composición del veneno se analizó siguiendo la estrategia conocida como "snake venomics" (Calvete, 2011), con algunas modificaciones (Lomonte et al., 2014). Se preparó un pool de veneno, mezclando cantidades iguales (peso seco) de muestras de tres especímenes de *P. lansbergii lansbergii*. Se tomaron 2 mg de veneno, se disolvieron en 200 μ L de agua que contenía 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA; solución A) y se sometió a cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP–HPLC), usando un cromatógrafo Agilent 1200 y una columna C₁₈ (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m de partícula; Teknokroma). La elución se realizó a 1 mL/min aplicando un gradiente sobre la solución B (acetonitrilo, que contenía TFA al 0.1%), de la siguiente manera: 0% B durante 5 min, 0–15% B durante 10 min, 15–45% B por 60 min, 45–70% B durante 10 min, y 70% B por 9 min (Lomonte et al., 2014).

Las fracciones obtenidas se recolectaron manualmente, se secaron en una centrífuga al vacío y se separaron adicionalmente mediante SDS-PAGE en condiciones reducidas (2-mercaptoetanol al 5%, a una temperatura de 100°C y durante 5 min), usando geles de poliacrilamida al 12%. Las abundancias relativas de las proteínas fueron estimadas mediante la integración de las señales de los picos a 215 nm, usando el software ChemStation® (Agilent). Cuando un pico de HPLC contenía dos o más bandas en el gel de SDS-PAGE, su distribución relativa se estimó mediante densitometría usando el software ImageLab® (Bio-Rad).

3.3. Caracterización de las fracciones del veneno obtenidas por RP-HPLC

Las bandas de proteínas se cortaron de los geles teñidos con azul de Coomassie R-250 y se sometieron a reducción (10 mM de ditioneitol) y alquilación (50 mM de yodoacetamida). Posteriormente, las bandas fueron sometidas a digestión toda la noche con solución de tripsina bovina (en 50 mM de bicarbonato de amonio) a 37°C. Los péptidos tripsinizados se extrajeron con acetonitrilo al 50% que contenía TFA al 1%, y fueron analizados por MALDI-TOF-TOF en un AB4800 – Plus Proteomics Analyzer (Applied Biosystems).

Los péptidos se mezclaron con un volumen igual de *ácido α -ciano-hidroxicinámico* saturado (en acetonitrilo al 50%, TFA al 0.1%), y se adicionó 1 μ L de la muestra en una placa Opti-TOF de 384 pozos. Posteriormente, se secaron y se analizaron en el modo reflector positivo. Los espectros TOF se adquirieron utilizando 1500 disparos y una intensidad de láser de 3000. Los 10 iones precursores más intensos fueron automáticamente seleccionados y el espectro de fragmentación TOF/TOF se obtuvieron usando 500 disparos a una intensidad de láser de 3900. La calibración de cada ejecución se realizó con los estándares CalMix® (ABSciex).

Para la identificación de las proteínas, los espectros resultantes se buscaron en la base de datos UniProt/SwissProt usando ProteinPilot® v.4 y el algoritmo Paragon® (ABSciex) con una confiabilidad $\geq 95\%$. Unas pocas secuencias peptídicas con puntajes de confianza más bajos, se buscaron manualmente usando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por medio de la similitud de secuencias para la asignación de las familias de proteínas. Las muestras que no pudieron ser identificadas, se limpiaron adicionalmente con Micro-C₁₈ ZipTips® (Millipore) y se volvieron a analizar tal como se describió previamente. Las fracciones de RP-HPLC correspondientes a péptidos pequeños (que eluyeron en los picos iniciales del cromatograma) se analizaron mediante ESI-MS/MS en un instrumento Q-Trap® 3200 (Applied Biosystems).

Las muestras fueron cargadas (10 μ L) en puntas capilares recubiertas de metal (Proxeon®) y se inyectaron directamente en una fuente de nano-ESI operada a

1300 V. Los iones peptídicos fueron fragmentados por disociación de colisión inducida, utilizando la herramienta de producto iónico mejorado con atrapamiento en Q_0 . Las configuraciones para los análisis de MS/MS fueron: Q_1 , unidad de resolución con energía de colisión de 25–45 eV; tiempo de llenado de la trampa de iones lineal Q_2 , 250 ms; y rango de escaneo Q_3 , 1000 uma/s. Los espectros CID (Disociación Inducida por Colisión) resultantes fueron interpretados manualmente.

3.4. Perfil toxicológico

3.4.1. Animales

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en ratones CD–1, suministrados por el Instituto Clodomiro Picado; y siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica. Los animales se alojaron en jaulas por grupos de 4 a 6 ratones, y se les proporcionó comida y agua *ad libitum*.

3.4.2. Letalidad del veneno

La potencia letal del veneno fue evaluada mediante inyección intraperitoneal, usando grupos de cuatro ratones de 16–18 g de peso corporal. Las muertes inducidas por la inyección de diferentes dosis de veneno (48–200 μ g), disuelto en solución de buffer fosfato salino (PBS, NaCl 0.12 M, buffer fosfato de sodio 0.04 M, pH 7.2), se registraron después de 48 h. La dosis letal media (LD_{50}) fue calculada por Probits (Finney, 1978), utilizando el software BioStat® (AnalySoft).

3.4.3. Actividad miotóxica

El veneno (50 μ g en 50 μ L de PBS) fue inoculado en el músculo gastrocnemio de cada ratón, usando grupos de cuatro individuos con peso entre 18 y 20 g. Un grupo control recibió una inyección de PBS. Después de 3 horas, se colectó sangre de la punta de la cola en capilares heparinizados y se determinó la actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) usando un ensayo cinético (CK–Nac, Analyticon). Seis horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO_2 y se obtuvieron muestras de tejido muscular inoculado con el veneno y PBS para su evaluación microscópica, después de ser fijados con formalina y teñidos con hematoxilina–eosina (Gutiérrez et al., 1986).

3.4.4. Actividad hemorrágica

Grupos de cinco ratones (18–20 g) recibieron una inyección intradérmica de veneno (3 µg en 100 µL de PBS) en la región abdominal. Después de 2 h, los animales fueron sacrificados y la piel removida para medir las áreas hemorrágicas.

3.4.5. Actividad edemática inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular–VEGF purificado del veneno de *P. lansbergii lansbergii*

Un grupo de cuatro ratones (18–20 g) recibió una inyección subcutánea de VEGF (3 µg en 30 µL de PBS) en la almohadilla plantar izquierda. La almohadilla de la pata derecha se usó como control, recibiendo 30 µL de PBS. El edema fue estimado en diferentes tiempos (0.5, 1, 3, 6 y 24 h), midiendo el grosor de la almohadilla plantar con un pie de rey (Oditest®, Kroeplin) (Lomonte et al., 1993).

3.4.6. Parámetros hematológicos

Grupos de cinco ratones (18–20 g) recibieron una inyección intramuscular de veneno (100 µg en 50 µL de PBS), en el musculo gastrocnemio de la pata derecha. El grupo control recibió solo PBS. Después de 3 h, se colectaron 200 µL de sangre de la punta de la cola en capilares heparinizados, y se analizaron en un analizador de hematología pochH–100i® (Sysmex). Los parámetros analizados incluyeron recuento total de glóbulos blancos (WBC) y glóbulos rojos (RBC), concentración de hemoglobina (HB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC) y recuento de plaquetas (PT).

3.5. Actividades enzimáticas in vitro

3.5.1. Actividad de fosfolipasa A₂

La actividad de PLA₂ se evaluó sobre el sustrato cromogénico sintético monodisperso ácido 4–nitro–3–octanoiloxibenzoico (NOBA) (Holzer y Mackessy, 1996), y sobre fosfatidilcolina micelar (PC) mediante el método colorimétrico rojo fenol (de Araújo y Radvanyi, 1987). En el primer caso, en una placa de 96 pozos,

se mezclaron 25 μL que contenían diversas cantidades de veneno con 200 μL de Tris 10 mM, CaCl_2 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 8.0; y 25 μL de NOBA para alcanzar una concentración de sustrato final de 0.32 mM. Las placas se incubaron a 37 °C durante 60 min, y las absorbancias se registraron a 405 nm en un lector de microplacas.

La actividad de PLA_2 se expresó como el cambio en la absorbancia $\times 1000$. En el segundo método, 20 μL que contenían de 0.6 a 5 μg de veneno fueron adicionados a 1 mL de sustrato (0.25% de sn-3-fosfatidilcolina, 0.4% Tritón X-100, 0.004% de rojo de fenol) en una cubeta termorregulada a 30 °C. La disminución de la absorbancia a 558 nm fue monitoreada continuamente durante 1 minuto. Una unidad de actividad de PLA_2 se definió como el cambio de 0.001 en la absorbancia por minuto. Ambos ensayos se realizaron por triplicado.

3.5.2. Actividad coagulante

El efecto coagulante se probó añadiendo 20 μg de veneno (en 50 μL de PBS) a 200 μL de plasma humano citratado, previamente incubado a 37 °C. Como control negativo se adicionó PBS a las alícuotas de plasma (Theakston y Reid, 1983). El veneno de *B. asper* de Costa Rica se incluyó como un control positivo. Se registraron los tiempos de coagulación y se consideró que el veneno carecía de actividad coagulante si no se observaba coagulación después de 30 minutos de incubación. Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.5.3. Actividad anticoagulante

Se incubaron alícuotas de 0.2 mL de plasma humano citratado (3.8% v/v) con veneno (40 μg en 50 μL de PBS) o PBS solo, durante 10 minutos a 37°C. Luego, se añadieron 50 μL de CaCl_2 0.25 M y se determinó el tiempo de coagulación (Fernández et al., 2010). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.5.4. Actividad de proteasas

Cantidades variables de veneno (1.3 – 40 μg) fueron adicionadas a 100 μL de azocaseína (10 mg/mL en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, CaCl_2 5 mM, pH 8.0) y se incubaron durante 90 min a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 200 μL de ácido tricloroacético al 5%. Luego, las muestras fueron centrifugadas y 150 μL del sobrenadante fueron mezclados con 150 μL de NaOH 0.5 M. Las absorbancias fueron registradas a una longitud de onda de 450 nm. La absorbancia

de la azocaseína incubada con solo PBS se usó como blanco, la cual fue sustraída a todas las lecturas (Wang et al., 2004). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.5.5. Inhibición de la agregación plaquetaria

Se preparó plasma humano rico en plaquetas, mediante centrifugación de sangre citratada obtenida de voluntarios sanos, a 135 g durante 10 minutos. Se incubaron alícuotas de 225 μ L de esta preparación con 25 μ L de veneno (4–8 μ g) o con las fracciones del veneno 10 u 11 (300 nmol) (Figura 2, Tabla 1) durante 5 minutos a 37 °C. Luego, la agregación plaquetaria se indujo mediante la adición de 25 μ L de ADP (concentración final 20 μ M), y se monitoreó a través del incremento del porcentaje de transmitancia de la luz, usando un analizador AggRAM® (Helena Laboratories), a una velocidad de 600 rpm durante 5 minutos.

La agregación plaquetaria inducida por 25 μ L de solo ADP se consideró como 100% de respuesta. El plasma pobre en plaquetas (225 μ L), obtenido después de la centrifugación a 800 g durante 20 min, se utilizó como blanco (Camacho et al., 2014). Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ desviación estándar. La significancia de las diferencias entre las medias de dos grupos experimentales se determinó mediante la prueba t de Student utilizando el software Prism® (GraphPad), donde $p < 0.05$ fue considerado significativo.

4. Resultados

En este estudio, se analizó la composición del veneno y el perfil toxicológico del veneno de la serpiente *P. lansbergii lansbergii*. Mediante RP–HPLC se resolvieron 39 picos de este veneno, que generaron un total de 51 bandas de proteína después de la separación por SDS–PAGE (Figura 11). De estas bandas, 47 componentes fueron asignados a familias de proteínas conocidas después de la digestión en gel y análisis por MALDI–TOF–TOF (Tabla 1). Los picos 1–7, que correspondieron a péptidos pequeños y que no fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, se analizaron por infusión directa utilizando ESI–MS/MS (Tabla 1).

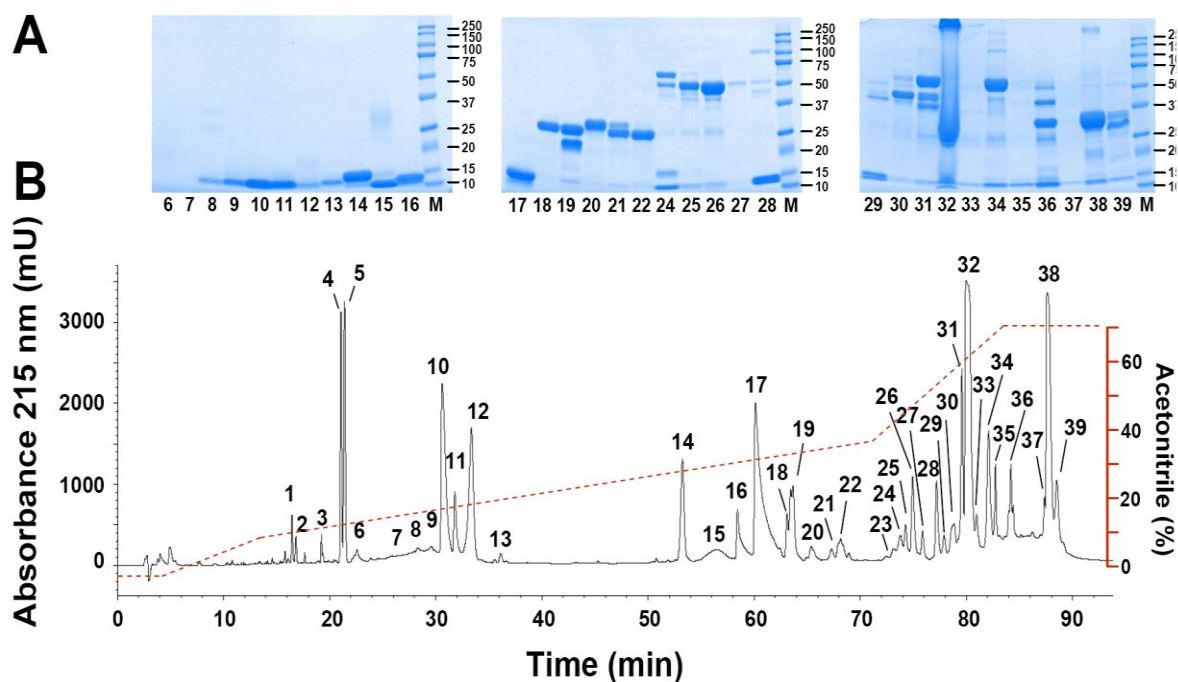


Figura 11. Separación de las proteínas del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* por RP-HPLC, seguido de SDS-PAGE. Se fraccionaron 2 mg de veneno en una columna C₁₈ (**B**) y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo (línea discontinua), como se describió en Materiales y métodos. Las fracciones fueron separadas adicionalmente mediante SDS-PAGE en condiciones reducidas (**A**). Los marcadores de peso molecular (M) están indicados en kDa. Las bandas teñidas con Coomassie fueron cortadas, puestas en digestión en gel con tripsina y se sometieron a análisis por MALDI-TOF/TOF y ESI-MS/MS para su asignación a familias de proteínas, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Asignación a familias de proteínas por MALDI-TOF-TOF de iones peptídicos seleccionados a partir de bandas de proteínas digeridas con tripsina en gel o ESI-MS/MS de péptidos nativos, a partir de las fracciones aisladas por RP-HPLC del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii*

Pico	%	Masa (kDa)	Ion peptídico		Secuencia derivada por MS/MS	Conf (%)	Pu	Familia de proteína; ~ proteína relacionada*
			m/z	z				
1	0.4	—	928.5	1	DXRPDGBB	99	9	BPP/CNP; ~ Q9PW56
		—	2094.2	1	KBBHNDHPBVNHPGSBDB	99	18	Nucleobindin-2-like protein; ~ T1DJX5
2	0.3	—	1277.6	1	SETHSPDGRE	99	11	Metalloproteinase fragment; ~ U3TAC5
3	0.2	—	969.5	1	B ^{py} BWPPGHH	99	9	BPP/CNP; ~ J3S3U4
		—	1102.6	1	DGBBARBNW	99	10	BPP/CNP ~ Q2PE51
		—	1449.7	1	NVEBEDEAPBMC	99	13	Metalloproteinase fragment; ~ B7U492
		—	2207.3	1	KBBHNDHPBVNHPGSBDBX	99	11	Nucleobindin-2-like protein; ~ T1DJX5

Tabla 1. Continuación

Pico	%	Masa (kDa)	Ion peptídico		Secuencia derivada por MS/MS	Conf (%)	Pu	Familia de proteína; ~ proteína relacionada*
			m/z	z				
		–	1912.8	1	PM ^{ox} BPBBPESPN ^{da} BPRYV	99	9	Amelogenin fragment; ~ D4N4N1
4	2.8	–	430.6	1	ZNW	man	man	Peptide SVMP inhibitor; ~ P01021
5	3.8	–	444.4	1	ZBW	man	man	Peptide SVMP inhibitor; ~ P01021
6	0.7	–	1583.9	1	DXRPDGBBARBNW	99	13	BPP/CNP; ~ Q9PW56
			1292.7	1	B ^{py} BW ^{ox} PPGHHXPP	99	11	
7	0.4	–	1148.6	1	B ^{py} WPPGHHXPP	99	12	BPP/CNP; ~ J3S3U4
			1276.6	1	B ^{py} BPPGHHXPP	99	13	
			1168.6	1	NDYEVXYPR	99	10	Metalloproteinase fragment; ~ Q2QA03
8	0.8	10	1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	12	Disintegrin; ~ Q9PVK9
			2129.8	1	ARGDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	20	
		–	1148.5	1	B ^{py} WPPGHHXPP	99.0	10	BPP/CNP; ~ J3S3U4
			1276.6	1	B ^{py} BWPPGHHXPP	99.0	13	
9	1.1	10	2129.9	1	ARGDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	16	Disintegrin; ~ Q9PVK9
			1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	16	
		–	1148.6	1	B ^{py} WPPGHHXPP	99.0	12	BPP/CNP; ~ J3S3U4
			1276.6	1	B ^{py} BWPPGHHXPP	97.4	9	
10	7.0	10	2131.2	1	ARGDDMDDYCN ^{da} GXSAGCPR	99.0	12	Disintegrin; ~ Q9PVK9
11	1.8	10	2131.0	1	ARGDDMDDYCN ^{da} GXSAGCPR	99.0	13	Disintegrin; ~ Q9PVK9
			1903.9	1	GDDMDDYCN ^{da} GXSAGCPR	99.0	12	
12	5.7	10	1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	11	Disintegrin; ~ Q7SZD9
		–	1276.6	1	B ^{py} BWPPGHHXPP	90.4	8	
13	0.3	10	1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	16	Disintegrin; ~ Q9PVK9
			2129.9	1	ARGDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	19	
14	3.0	11	1577.7	1	CCFVHDCCYEK	99.0	14	Phospholipase A ₂ , D49; ~ U3TDC9
			2585.2	1	NAXP ^{ox} FYAFYGCYCGWGGBGRPK	99.0	14	
			1727.8	1	BVCECDBAAAXCFR	99.0	15	
15	2.2	10	3151.1	1	E ^{py} T ^{dh} XVSXXEEHPHEXSHXFKPSC VTVXR	94.8	12	Vascular endothelium growth factor; ~ C0K3N2
			1369.8	1	B ^{dh} VMPFMEVYSR	man	man	

Tabla 1. Continuación

Pico	%	Masa (kDa)	Ion peptídico		Secuencia derivada por MS/MS	Conf (%)	Pu	Familia de proteína; ~ proteína relacionada*
			m/z	z				
16	2.4	11	2542.3	1	TATYSYTEENGAXVCGDDPCBK	99.0	13	Phospholipase A ₂ , D49; ~ P86456
			1471.7	1	CCXVHDCCYGK	99.0	16	
17	10.8	12	1471.7	1	CCXVHDCCYGK	99.0	12	Phospholipase A ₂ , D49; ~ P0CAS3
			1739.9	1	DNXDTYDN ^{da} KYW ^{de} FX	97.1	11	
			1710.7	1	B ^{dh} VCECDBAAAXCFR	99.0	12	
18	0.9	29	1471.8	1	BEWVXSAAHCDR	99.0	12	Serine proteinase; ~ U3TAG7
			2996.7	1	XNRP ^{ox} VBNS ^{dh} AHXEPXSPSSPPS VGSVCR	99.0	15	
			1379.8	1	AAYPEFGXPATSR	99.0	14	
19a	1.6	27	1471.8	1	BEWVXSAAHCDR	99.0	16	Serine proteinase; ~ U3TAG7
			922.6	1	XHXGMHKS	99.0	12	
			1379.8	1	AAYPEFGXPATSR	99.0	16	
			2996.8	1	XNRP ^{ox} VBNS ^{dh} AHXEPXSPSSPPS VGSVCR	99.0	13	
19b	1.4	21	1537.8	1	MEWYPEAANAER	99.0	21	Cysteine-rich secretory protein; ~ T1E6W3
			985.5	1	CXESHSPR	99.0	13	
			1138.6	1	SVDFDSESPR	99.0	15	
			1981.2	1	KPEXBN ^{da} BXVDX ^{ox} NFXR	99.0	23	
20	0.7	29	1037.6	1	GAHAGXPATSR	99.0	14	Serine proteinase; ~ Q9W7S1
			2172.3	1	SAHXAPXSXPSNPPXVGSVCR	99.0	23	
			1442.8	1	V ^{ca} GGDECNXNEHR	96.5	9	
21	1.1	25	3362.8	1	SSCDGDSGGPXXCNGEXBGXVSW GGDXCABPR	99.0	11	Serine proteinase; ~ B0VXT7
			1512.8	1	VXGGDECNXNEHR	99.0	11	
			1747.1	1	KBDDEBDBDXMXXR	99.0	23	
22	0.2	24	1189.7	1	WDBDXMXIR	99.0	11	Serine proteinase; ~ T1E6T7
			1573.0	1	NNEVXDBDXMXXR	99.0	10	
23	0.5	—	—	—	—	—	—	Unknown
24a	0.4	74	1971.2	1	YXGYXNVXFDDBGNVXK	99.0	20	5'-Nucleotidase; ~ T2HRS9
			1889.1	1	XXXPSFXAGGGDGYHMXK	99.0	21	
			1110.6	1	BAFEHSVHR	99.0	13	
			1449.8	1	VVSXNVXCTECR	99.0	14	
			2408.2	1	HPDDNEWNHVSMCXVN ^{da} GGGX	99.0	23	
			1753.0	1	SFEXTXXHTNDVHAR	99.0	19	
			3125.7	1	ETPVXSNPGPYXEFRDEVEEXBNH ANK	99.0	15	

Tabla 1. Continuación

Pico	%	Masa (kDa)	Ion peptídico		Secuencia derivada por MS/MS	Conf (%)	Pu	Familia de proteína; ~ proteína relacionada*
			m/z	z				
			1555.9	1	XXAXGHSGFXEDBR	99.0	22	
			1578.0	1	HANFPXXSANXRPK	99.0	19	
			2421.3	1	FHECNXGNXXCDAVXYNNVR	99.0	25	
24b	0.2	62	1379.7	1	KFWEDDGXBGGK	99.0	12	L-amino-acid oxidase; ~ Q6WP39
			1651.8	1	NDEEGWYANXGPMR	99.0	18	
			1514.8	1	ETDYEEFXEXAR	99.0	19	
24c	0.3	9	2136.0	1	GFCCPXGWSSYEGHCYR	99.0	18	C-type lectin/lectin-like; ~ F8S0Z1
			1592.8	1	TTDNBWXSRSRCSR	99.0	14	
25	1.0	60	2457.3	1	RFDEXVDGMDXPTSMYBAXK	99.0	15	L-amino-acid oxidase; ~ J7H670
			1651.8	1	NDEEGWYANXGPMR	99.0	20	
			1514.8	1	ETDYEEFXEXAR	99.0	18	
26	2.1	57	2457.4	1	RFDEXVDGMDXPTSMYBAXK	99.0	8	L-amino-acid oxidase; ~ J7H670
			1651.9	1	NDEEGWYANXGPMR	99.0	16	
			1514.8	1	ETDYEEFXEXAR	99.0	15	
			2072.1	1	TYRNDEEGWYANXGPMR	98.1	7	
27	0.6	—	—	1		—	—	Unknown
28a	0.3	115	1747.0	1	SMBAXFXAHGPGFNEK	99.0	14	Phosphodiesterase; ~ T2HRT4
			1420.8	1	DFYTFDSEGXVK	99.0	14	
			1532.9	1	XWNYFHHTXXPK	99.0	10	
			1355.8	1	AATYFWPGSEVK	99.0	9	
			2405.4	1	TESEAHNXPYGRPBVBXBNHNSK	99.0	9	
			1924.2	1	VRDVEXTGXNFYSGXK	94.7	7	
28b	1.5	11	1928.9	1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	17	C-type lectin/lectin-like; ~ Q9PS06
			2541.5	1	GGHXVSXESAGERDFVABXVSENK _{am}	99.0	13	
			2603.3	1	DCPSDWSSYEGHCYBPFNEPK	99.0	17	
29a	0.2	51	1404.9	1	YNNYBEDPYAK	99.0	11	Phospholipase B; ~ T2HP68
			1461.0	1	KVVPESXFAWER	99.0	12	
			1705.2	1	SXEDGTXYXXEBVPK	99.0	14	
			1011.7	1	TWAETFEK	99.0	11	
29b	0.3	12	1928.9	1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	19	C-type lectin/lectin-like; ~ Q9PS06
			2541.5	1	GGHXVSVESAGEADFVAB ^{dia} XVAENXK	99.0	15	

Tabla 1. Continuación

Pico	%	Masa (kDa)	Ion peptídico		Secuencia derivada por MS/MS	Conf (%)	Pu	Familia de proteína; ~ proteína relacionada*
			m/z	z				
29c	0.2	11	1928.9	1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	11	C-type lectin/lectin-like; ~ Q9PS06
			2603.3	1	DCPSDWSSYEGHCYBPFNEPK	99.0	22	
			920.5	1	WSNAAM ^{py} XK	98.9	13	
			1345.8	1	EBXMXASVXGXR	96.7	11	
30	1.7	53	1456.9	1	N ^{da} MPBCXXNBPXK	99.0	17	Metalloproteinase; ~ C5H5D6
			2512.3	1	NPCNXYYSPNDEDBGMVXPGTK	99.0	24	
			1270.7	1	XYCFPSSPATK	99.0	16	
			3275.6	1	TDVVSPP ^{py} VCGNYFVEVGEECDG SPATCR	99.0	15	
			1712.8	1	AABDECDMADXCTGR	99.0	22	
			1183.7	1	B ^{py} SNXTPEBBR	99.0	12	
31a	2.3	67	2959.6	1	AABDDCDXPESCTGBSABCPTDSF BR	99.0	15	Metalloproteinase; ~ R4FIM1
31b	0.8	52	2136.0	1	YFVEVGEECDGSPATCR	99.0	16	Metalloproteinase; ~ C5H5D6
			2512.3	1	NPCNXYYSPNDEDBGMVXPGTK	99.0	23	
			1456.9	1	N ^{da} MPBCXXNBPXK	99.0	17	
			3275.6	1	TDVVSPP ^{py} VCGNYFVEVGEECDG SPATCR	99.0	12	
			1270.7	1	XYCFPSSPATK	99.0	15	
			1712.8	1	AABDECDMADXCTGR	99.0	21	
			1183.6	1	B ^{py} SNXTPEBBR	99.0	12	
31c	0.5	43	1011.5	1	TWAETFEK	99.0	13	Phospholipase B; ~ T2HP68
			1705.0	1	SXEDGTXYXXEBVPK	99.0	16	
			2222.2	1	HBGXPESYNFDFVTMBPVX	99.0	17	
			1460.9	1	KVPESXFAWER	99.0	13	
			1332.8	1	VVPESXFAWER	99.0	15	
32a	6.8	207	1135.7	1	TXDXFGBWR	99.0	14	Metalloproteinase; ~ Q2UXQ9
			938.6	1	ERDXXHR	99.0	10	
			1093.6	1	YNGDXDBXR	97.8	9	
32b	5.9	25	1135.7	1	TXDXFGBWR	99.0	11	Metalloproteinase; ~ E3UJL0
			938.6	1	ERDXXHR	99.0	11	
			1094.6	1	YN ^{da} GDxDBXR	98.8	10	
32c	0.4	10	1918.8	1	DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	13	C-type lectin/lectin-like; ~ T1E3Z4
			938.6	1	ERDXXHR	99.0	10	
			1135.7	1	TXDXFGBWR	99.0	11	
32d	0.1	10	1380.9	1	KPBCXXBBPXR	99.0	9	Metalloproteinase; ~ Q92032
			1679.9	1	GPTXGXAYVGTMCDPK	99.0	14	

Tabla 1. Continuación

Pico	%	Masa (kDa)	Ion peptídico		Secuencia derivada por MS/MS	Conf (%)	Pu	Familia de proteína; ~ proteína relacionada*
			m/z	z				
33	1.2	—	—	—	—	—	—	Unknown
34a	0.2	124	2211.9	1	XHSWVECESGECCBCR	99.0	10	Metalloproteinase; ~ Q2UXQ4
			1304.8	1	YXEXVXVADR ⁰ R	95.2	9	
34b	3.2	63	2225.9	1	XHSWVECESGECCBCR	99.0	10	Metalloproteinase; ~ T2HPB1
			1155.6	1	KXPCAPBDVK	99.0	9	
			1304.8	1	YXEXVXVADR ⁰ R	99.0	16	
			2211.9	1	XHSWVECESGECCBCR	99.0	26	
34c	0.7	10	1928.9	1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	10	C-type lectin/lectin-like; ~ T1E3Z4
			1918.9	1	DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	14	
35	2.1	10	1918.8	1	DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	16	C-type lectin/lectin-like; ~ T1E3Z4
36a	0.3	62	1651.8	1	NDEEGWYANXGPMR	99.0	10	L-amino-acid oxidase; ~ Q6WP39
			1514.8	1	ETDYEEFXEXAR	99.0	16	
36b	0.7	47	1228.8	1	KYTHNXXAXK ¹⁰	99.0	14	Metalloproteinase; ~ G1UJB2
			1040.5	1	FVTAGTECR	99.0	10	
			1115.6	1	DGBGXFYCR	99.0	14	
36c	1.5	31	1137.5	1	CTGBSGDCPR	99.0	12	Metalloproteinase; ~ J3SDW3
			1987.9	1	XTTGSBCAEGXCCDBCK	99.0	21	
			1010.6	1	SVGXVBDHR	99.0	12	
			1327.8	1	YXEXVXVADHR	99.0	15	
			906.5	1	YHFVANR	99.0	11	
36d	0.8	10	1928.9	1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	15	C-type lectin/lectin-like; ~ T1E3Z4
			1918.8	1	DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	20	
37	0.9	—		1	—	—	—	Unknown
38a	0.9	183	1769.7	1	SGSBCGHGDCCEBCK	99.0	15	Metalloproteinase; ~ T1E6U1
38b	7.5	31	1151.5	1	CTGBSADCPR	99.0	12	Metalloproteinase; ~ U3T788
			1769.7	1	SGSBCGHGDCCEBCK	99.0	20	
38c	1.2	11	2603.2	1	DCPSDWSSYEGHCYBPFNEPK	99.0	8	C-type lectin/lectin-like; ~ I2GAE4
			1918.8	1	DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	16	
			1611.0	1	XYEXVNTXN ¹⁰ VXYR	99.0	10	Metalloproteinase; ~ E9JGA2

Tabla 1. Continuación

Pico	%	Masa (kDa)	Ion peptídico		Secuencia derivada por MS/MS	Conf (%)	Pu	Familia de proteína; ~ proteína relacionada*
			m/z	z				
39a	1.4	36	1151.5	1	CTGBSADCPR	99.0	11	Metalloproteínase; ~ A2CJE5
			1769.7	1	SGSBCGHGDCCEBCK	99.0	20	
			1611.0	1	XYEXVNTXN ^{da} VXYR	99.0	15	
39b	1.7	31	1702.0	1	VAXXGXEXWSSGEXSK	99.0	17	Metalloproteínase; ~ J3SBP6
			2001.9	1	VTTGSBCAEGXCDCBCR	99.0	19	
			1871.8	1	GDDVN ^{da} DYCN ^{da} GXSAGCPR	99.0	16	

X: Leu/Ile; **B:** Lys/Gln. Los valores de Confianza (**Conf**) y Puntuación (**Pu**) se calcularon mediante el algoritmo Paragon® de ProteinPilot®. Posibles modificaciones de aminoácidos ambiguos o no confirmados por el software de identificación automatizada se muestran en paréntesis, con las siguientes abreviaciones: ^{ox}: oxidado; ^{do}: dioxidizado; ^{da}: deamidado; ^{dh}: deshidratado; ^{py}: piroglutámico; ^{ca}: carbamilo; ^{fo}: formilo; ^{or}: ornitina R; ^{na}: catión Na⁺; ^{kc}: catión K⁺. **Man**: secuenciación de aminoácidos de *nov*o por interpretación manual de espectros. *Los residuos de cisteína están carbamidometilados. Masa: las estimaciones de las masas proteicas por SDS–PAGE, se llevó a cabo en condiciones reducidas y expresadas en kDa.

Una comparación de los perfiles electroforéticos (Figura 12A) y cromatográficos (Figura 12B) de los venenos obtenidos de cada uno de los tres especímenes de *P. lansbergii lansbergii*, evidenció una conservación general entre los individuos, aunque se observaron algunas pocas variaciones en la expresión de los picos correspondientes a PLA₂s (Figura 12C).

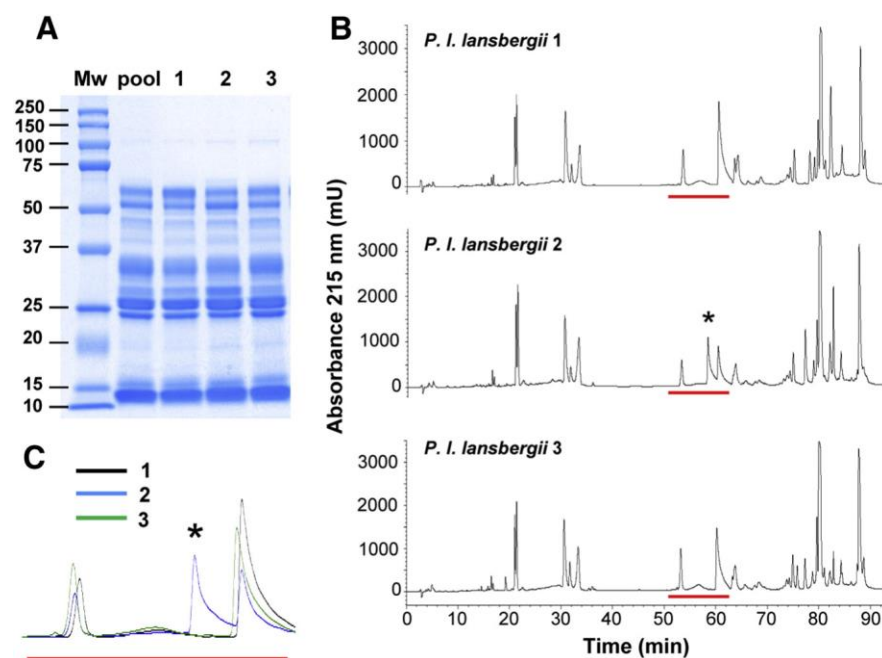


Figura 12. Comparación de los perfiles de SDS–PAGE y RP–HPLC de muestras de veneno individuales obtenidas de los tres especímenes de *Porthidium lansbergii lansbergii* utilizados en este

estudio. **(A)** SDS–PAGE (12%) en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie coloidal. Los marcadores de peso molecular (Mw) están indicados en kDa. **(B)** Perfiles de elución de proteínas en RP–HPLC como se describe en Materiales y métodos (se omite la línea de gradiente por claridad). La región del cromatograma indicada por una línea roja horizontal en **(B)**, se amplía en **(C)** para mostrar la diferencia entre los picos de las tres muestras de veneno. El pico azul, marcado con un asterisco se identificó como una fosfolipasa A₂ de tipo D49 en el veneno de la muestra 2, pero se encontró ausente en los venenos de las muestras 1 y 3.

Las abundancias de las familias de proteínas en el veneno de *P. lansbergii lansbergii*, fueron expresadas como porcentaje del contenido total de proteína, como se observa en la Figura 13. Las proteínas más abundantes corresponden a metaloproteinasas (SVMPs: 35.5%), seguidas por fosfolipasas A₂ (PLA₂: 16.2%) y desintegrinas (DIS: 12.9%). Otros tipos de proteínas presentes en el veneno de *P. lansbergii lansbergii*, incluyen miembros de las familias tipo lectina de tipo C (CTL), serina proteinasas (SP), L–aminoácido oxidasas (LAO), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), fosfolipasas B (PLB), 5'–nucleotidasas (5'–NU) y fosfodiesterasas (PDE), así como pequeños péptidos que pertenecen al péptido potenciador de bradiquinina/péptido natriurético tipo C (BPP/CNP) e inhibidores tripeptídicos de SVMP (Figura 13). Pocas proteínas del veneno quedaron sin identificar, las cuales representaron solo el 3,2% del contenido total de proteínas (Tabla 1).

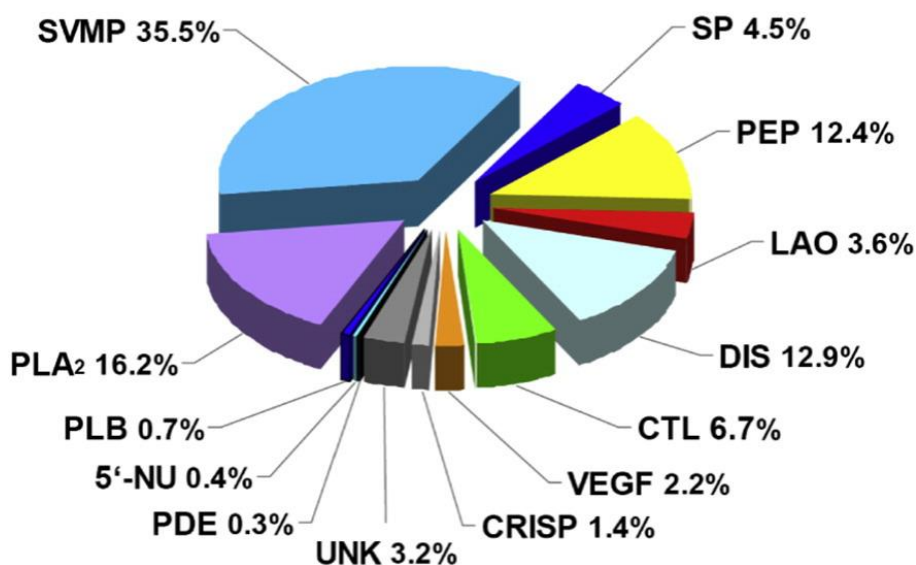


Figura 13. Composición del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* según las familias de proteínas identificadas y expresada como porcentajes del contenido total de proteína. PLA₂: fosfolipasa A₂; SP: serina proteasas; LAO: L–aminoácido oxidasa; SVMP: metaloproteinasas; DIS: desintegrina; CTL: lectina tipo C; 5'–NU: 5' nucleotidasa; PLB: fosfolipasa B; PDE: fosfodiesterasa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; CRISP: proteína secretora rica en cisteína; PEP: péptidos, UNK: desconocido/no identificado.

La composición del veneno de *P. lansbergii lansbergii* se comparó con las otras dos especies de *Porthidium* previamente estudiadas (Tabla 2). Como se muestra, el veneno de *P. lansbergii lansbergii* conserva una tendencia similar a la observada en los venenos de *P. nasutum* y *P. ophryomegas*, que comparten un predominio de las SVMPS, un alto contenido de DIS y abundancias relativamente uniformes de proteínas PLA₂, CTL y LAO. Sin embargo, algunas diferencias son evidentes, como una proporción algo menor de SP y SVMP; así como un contenido considerablemente más alto de péptidos pequeños (Tabla 2). Además, al menos tres tipos de componentes en el veneno de *P. lansbergii lansbergii*, VEGF (2.2%), PLB (0.7%) y PDE (0.3%), no se habían encontrado en ninguna de las otras dos especies de *Porthidium* estudiadas; lo que subraya una alta diversidad de familias de proteínas en este veneno.

Tabla 2. Composición proteica comparativa de los venenos de las especies de *Porthidium* encontradas en Colombia y Costa Rica.

Familia de proteínas	% del total de proteínas del veneno		
	<i>P. lansbergii lansbergii</i> ^a	<i>P. nasutum</i> ^b	<i>P. ophryomegas</i>
Metaloproteinasas	35.5	52.1	45.0
Fosfolipasas A ₂	16.2	11.6	13.5
Desintegrinas	12.9	9.9	16.7
Péptidos pequeños	12.4	1.9	4.2
Lectina tipo C	6.7	10.4	8.0
Serina proteinasas	4.5	9.6	7.3
L-amino ácido oxidasas	3.6	3.0	3.3
svVEGF	2.2	–	–
CRISP	1.4	1.3	0.6
Fosfolipasas B	0.7	–	–
5' nucleotidasas	0.4	0.2	–
Fosfodiesterasas	0.3	–	–
Desconocida	3.2	–	1.4
Número de familias	12	9	8

^a estudio actual; ^b Aunque *P. nasutum* se encuentra en Colombia, los datos corresponden a especímenes de Costa Rica (Lomonte et al., 2012).

Se analizaron las correlaciones entre la proteómica del veneno y las actividades tóxicas o enzimáticas mediante varios análisis funcionales. En cuanto a su letalidad en ratones, la LD₅₀ del veneno de *P. lansbergii lansbergii* fue de 140 ± 8 µg/ratón (8,2 µg/g peso corporal) cuando se administró por la ruta *i.p.* El veneno de *P. lansbergii lansbergii* generó lesiones locales, comprobado por una miotoxicidad moderada (Figura 14) y un potente efecto hemorrágico (Figura 15).

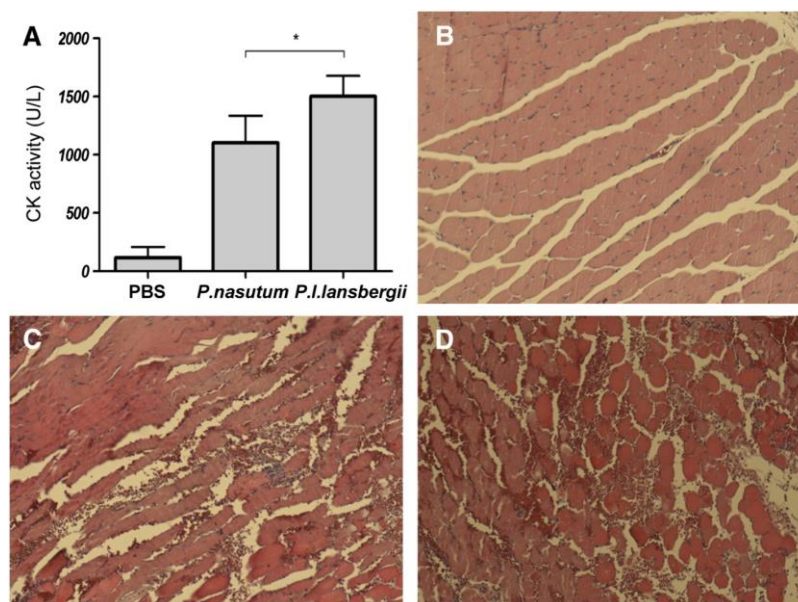


Figura 14. (A) Actividad miotóxica de los venenos de *Porthidium lansbergii lansbergii* y *Porthidium nasutum* (50 µg) después de la inyección intramuscular en ratones. (A) La actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) se determinó después de 3 h de la inyección. Las barras representan la media $\pm$ DE (n = 4). La diferencia entre los venenos de *P. lansbergii lansbergii* y *P. nasutum* fue estadísticamente significativa (*p < 0.05) según la prueba t de Student. Se realizó la evaluación histológica de las secciones del músculo esquelético teñidas con hematoxilina–eosina, 6 h después de la inyección local de PBS (B), veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* (C), y *Porthidium nasutum* (D). Magnificación de 200x. Se observó extravasación masiva de glóbulos rojos entre las áreas de fibras musculares necróticas en (C) y (D).

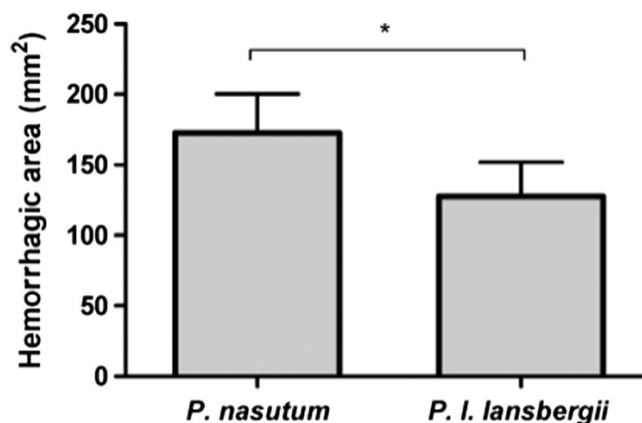


Figura 15. Comparación de la actividad hemorrágica de los venenos de *Porthidium lansbergii lansbergii* y *Porthidium nasutum* (3 µg) después de inyección intradérmica en ratones. El área hemorrágica se dibujó sobre una película transparente y se midió en mm². Las barras representan la media $\pm$ DE (n = 5). La diferencia entre ambos venenos es estadísticamente significativa (*p < 0.05) según la prueba t de Student.

En cuanto a las alteraciones hematológicas inducidas por la inyección *i.m.* del veneno de *P. lansbergii lansbergii* (100 µg), después de 3 h, no se registraron diferencias significativas con respecto a los ratones del grupo control en los parámetros: glóbulos blancos–WBC, glóbulos rojos–RBC, hemoglobina–HGB, volumen corpuscular medio–MCV, hemoglobina corpuscular media–MCH y concentración media de hemoglobina corpuscular–MCHC; aunque sí hubo una ligera disminución en los recuentos de hematocritos (HCT; Figura 16A) y una disminución considerable en el recuento de plaquetas (Figura 16B).

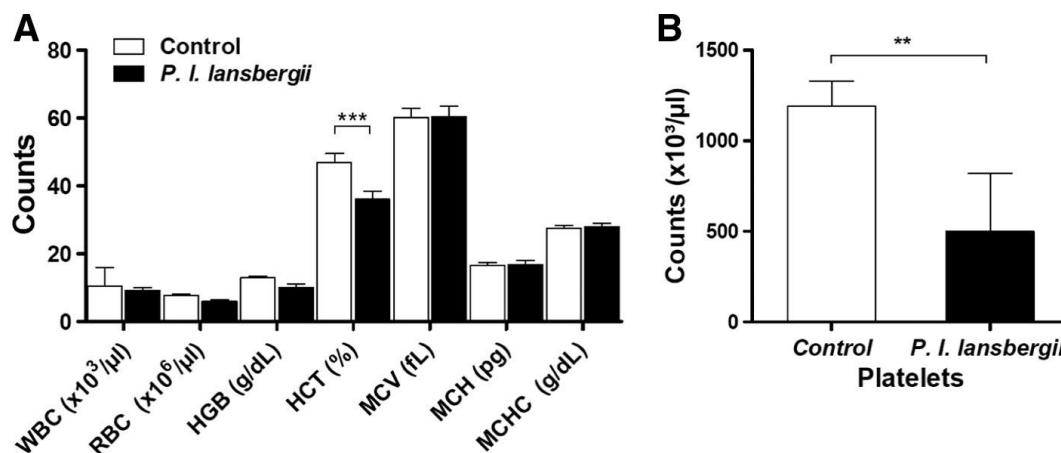


Figura 16. Evaluación de parámetros hematológicos después de la inyección intramuscular de veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* (100 µg), o PBS, en ratones. Se recolectó sangre heparinizada de la cola 1 h después de la inyección, y se analizó en un instrumento automatizado Sysmex pocH–100i™ como se describió en Materiales y métodos. Las barras representan la media $\pm$ DE (n = 5). **(A)** WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; HCT: hematocrito; MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; y MCHC: concentración media de hemoglobina corpuscular. **(B)** Recuento de plaquetas. Las diferencias estadísticamente significativas entre el veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* y el control con PBS están indicadas por asteriscos (p < 0.05).

Por otro lado, el veneno de *P. lansbergii lansbergii* mostró actividad anticoagulante *in vitro* sobre plasma humano, a diferencia del veneno de *P. nasutum*. El tiempo de coagulación del plasma incubado con el veneno de *P. nasutum* fue 106 ± 8 segundos, mientras que el veneno de *P. lansbergii lansbergii* se prolongó a más de 2400 segundos. En las mismas condiciones, el plasma incubado con PBS se coaguló después de 188 ± 2 s.

El alto contenido de desintegrinas en el veneno (12.9%) explicaría su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria humana inducida por ADP (Figura 17A). De hecho, dos fracciones de desintegrinas aisladas mostraron tal actividad inhibidora (Figura 17B).

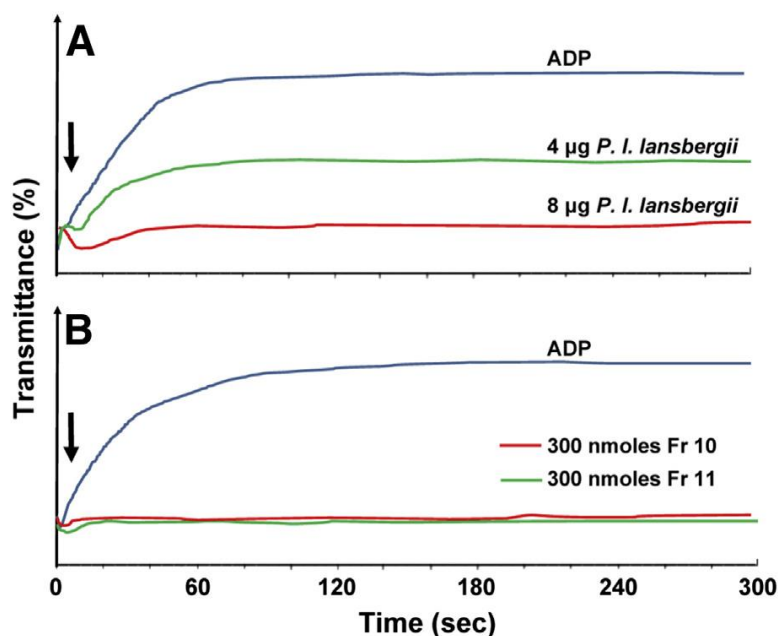


Figura 17. (A) Inhibición de la agregación plaquetaria humana ocasionada por el veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* o **(B)** por fracciones de desintegrinas (Fr 10, Fr 11) como se identificaron en la Tabla 1. Se agregaron 4 u 8 µg del veneno o de las fracciones (300 nmol) durante 5 min a plasma rico en plaquetas, que se había pre-incubado a 37 °C a velocidad constante en un instrumento de agregación, como se describe en Materiales y métodos. Luego, se añadió ADP (flechas) y la agregación fue monitoreada mediante los cambios en la transmitancia a través del tiempo. Las muestras control de plasma se incubaron con PBS antes de la adición del agonista.

De acuerdo con su mayor contenido de proteínas PLA₂ (Tabla 2), el veneno de *P. lansbergii lansbergii* mostró una actividad de fosfolipasa significativamente mayor que el veneno de *P. nasutum*, tanto en sustratos micelares (Figura 18A), como monodispersos (Figura 18B). La comparación de la actividad proteolítica de estos venenos con azocaseína no mostró diferencias significativas (Figura 18C), a pesar del mayor contenido de SVMP y enzimas SP en *P. nasutum* (Tabla 2).

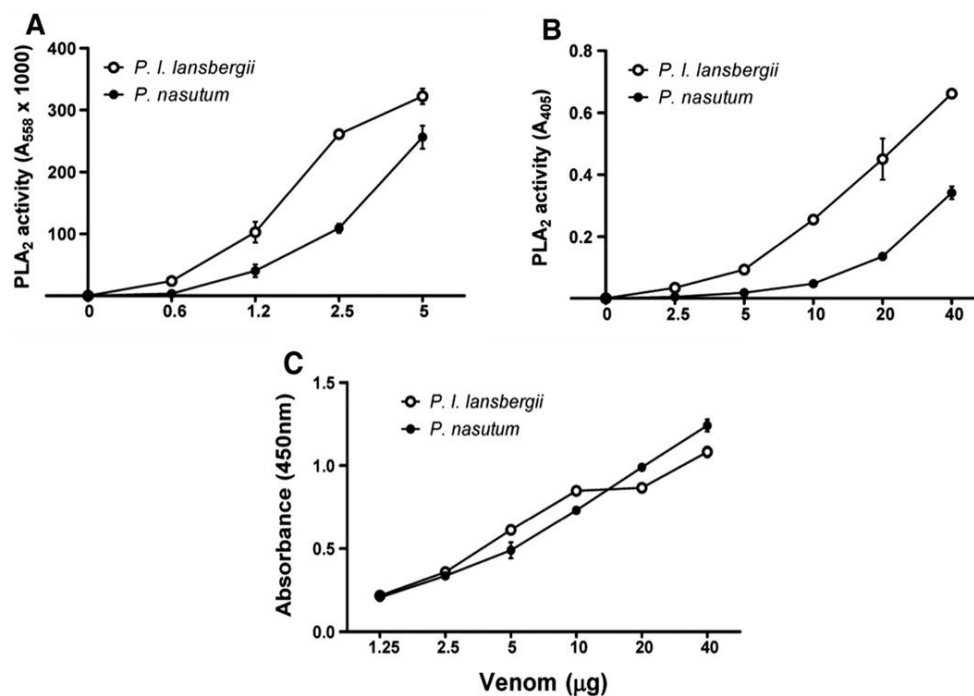


Figura 18. Comparación de las actividades enzimáticas de los venenos de *Porthidium lansbergii* (*P. l. lansbergii*) (○) y *Porthidium nasutum* (●). La actividad de fosfolipasa A₂ fue evaluada en fosfatidilcolina micelar (A) y en el sustrato monodisperso sintético ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico (B). La actividad proteolítica se evaluó sobre azocaseína (C). Cada punto representa la media ± DE (n = 3). Las diferencias entre los venenos de *P. lansbergii* y *P. nasutum* son estadísticamente significativas (p < 0.05) en (A) y (B), mientras que en (C) no se registraron diferencias estadísticamente significativas (p > 0.05).

Por otra parte, se confirmó que el pico de VEGF purificado del veneno de *P. lansbergii* indujo un edema rápido y transitorio en la almohadilla plantar del ratón, después de la inyección de 3 μg de la proteína (Figura 19).

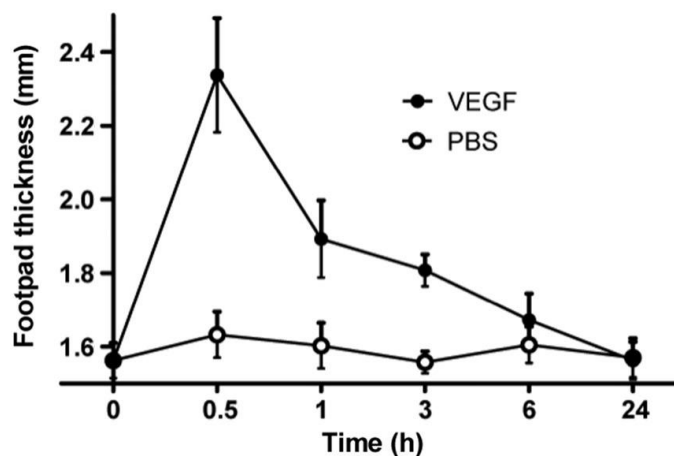


Figura 19. Evolución en el tiempo del edema inducido por la fracción de VEGF (Fr.15; Tabla 1) aislada a partir del veneno de *Porthidium lansbergii*. Los ratones recibieron una inyección

subplantar que contenía 3 µg de VEGF en 30 µL de PBS, en la almohadilla plantar de la pata izquierda. La almohadilla derecha recibió el mismo volumen, pero de PBS. El grosor de la almohadilla plantar se midió en diferentes momentos, como se describió en Materiales y métodos. Cada punto representa la media ± DE (n = 4). Las diferencias entre VEGF y PBS fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a 0.5, 1 y 3 horas.

5. Discusión

El estudio de los venenos de las especies dentro del género *Porthidium*, ha recibido menos atención en comparación con los de otras serpientes venenosas distribuidas en América Latina. Hasta la fecha, los venenos de solo dos de sus especies, *P. nasutum* y *P. ophryomegas*, han sido estudiados usando un enfoque proteómico (Lomonte et al., 2012). El perfil cromatográfico del veneno de *P. lansbergii lansbergii* (Figura 11, 12) muestra similitudes generales con los descritos previamente para *P. ophryomegas* y *P. nasutum*, analizados por el mismo método (Lomonte et al., 2012; Vargas et al., 2012).

El alto contenido de desintegrinas es notable (Figura 13), y podría representar una característica común en los venenos de este género, ya que los venenos de *P. nasutum* y *P. ophryomegas* también presentan proporciones de desintegrinas tan altas como 9.9% y 16.7%, respectivamente (Lomonte et al., 2012) (Tabla 2). Por el contrario, los venenos de la mayoría de las serpientes estudiados por los mismos métodos, contienen menos del 3% de desintegrinas, o incluso carecen de este tipo de proteínas pequeñas (Lomonte et al., 2014; Calvete et al., 2009; Salazar-Valenzuela et al., 2014).

Además del VEGF identificado, en el veneno de *P. lansbergii lansbergii* se identificaron las proteínas PLB y PDE, dos tipos de proteínas no observadas previamente en las especies de *Porthidium* (Tabla 2). La primera familia de proteínas ha sido identificada en pocos venenos de viperidos y elapidos (Margres et al., 2013; Rokyta et al., 2011; Aird et al., 2013), y pueden actuar como toxinas putativas con actividad hemolítica y citotóxica como se muestra para el veneno de *Pseudechis colletti* (Bernheimer et al., 1987). Por otro lado, las PDEs pueden actuar indirectamente como toxinas, catalizando la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster y liberando nucleósidos bioactivos como la adenosina (Aird 2002).

Entre los péptidos pequeños más abundantes del veneno de *P. lansbergii lansbergii*, se identificaron los tripéptidos ZNW/ZBW, obtenidos de los picos 4 y 5 de la RP-HPLC (Figura 11B y Tabla 1). Estos péptidos se han relacionado con la inhibición de las SVMPs durante su almacenamiento glandular (Menin et al., 2008; Wagstaff

et al., 2008). Otros péptidos identificados son los pertenecientes a los BPP/CNP, que son conocidos por sus potenciales propiedades vasoactivas (Ferreira et al., 1970). Algunos pocos péptidos identificados en los picos cromatográficos iniciales (Figura 11), correspondieron a fragmentos de proteínas más grandes del veneno como SVMP; aunque algunos podrían corresponder a fragmentos de otras proteínas, tales como amelogeninas y nucleobindina tipo 2 (Tabla 1), un hallazgo que merece mayor investigación.

Con relación a las actividades funcionales, el veneno de *P. lansbergii lansbergii* presentó una potencia letal (8.2 µg/g de ratón) más débil que la reportada para *P. nasutum* de Antioquia y Chocó (Colombia) con una LD₅₀ de 5.7 µg/g (Otero–Patiño et al., 2002), y para *P. lansbergii hutmanni* de la isla de Margarita (Venezuela) con una LD₅₀ de 2.5 µg/g (Vargas et al., 2011); pero ligeramente más potente que la del veneno de *P. nasutum* de Costa Rica (10.8 µg/g) (Bogarín et al., 2000).

En comparación con el veneno de *P. nasutum*, el aumento en la actividad de la CK plasmática inducida por el veneno de *P. lansbergii lansbergii* fue significativamente mayor (Figura 14), el cual se relaciona con su ligera diferencia en el contenido relativo de PLA₂s (Tabla 2); siendo estos, los principales componentes miotóxicos en la mayoría de los venenos de viperidos. Sin embargo, la magnitud de los valores plasmáticos de CK observados después de 3 horas de la inyección del veneno (50 µg) indican que este efecto miotóxico, comprobado histológicamente (Figura 14), fue moderado. Al comparar la actividad hemorrágica de los venenos de *P. lansbergii lansbergii* y *P. nasutum*, este estuvo de acuerdo con sus diferencias en el contenido de SVMPs, los cuales hacen parte de los principales componentes hemorrágicos. En dosis idénticas (3 µg), el veneno de *P. nasutum* (con 52.1% SVMP) causó un área hemorrágica intradérmica significativamente mayor que la de *P. lansbergii lansbergii* (con un 35.5% de SVMP) (Figura 15).

Al analizar los parámetros hematológicos, la disminución en el recuento de plaquetas, al menos en el ratón, se podría deber a la presencia de componentes del veneno tales como proteínas CTL (6.7%), desintegrinas (12.9%) u otros tipos de componentes (Figura 16). Esta disminución en el recuento, está acompañada de la inhibición de la agregación plaquetaria; corroborada por dos de sus desintegrinas aisladas (Figura 17), que cuentan con la presencia de un motivo RGD (Calvete et al., 2005) en sus secuencias de aminoácidos parciales (Tabla 1). La inhibición de la agregación plaquetaria humana también se ha descrito para el veneno de *P. lansbergii hutmanni* de Venezuela (López–Johnston et al., 2007a, b). Además, el veneno de *P. lansbergii lansbergii* carece de actividad coagulante sobre plasma humano, en similitud con los de otras especies de *Porthidium* (Lomonte et al., 2012; Gené et al., 1989), a pesar de contener abundantes SVMPs y SPs. Los

componentes responsables de la actividad anticoagulante del veneno de *P. lansbergii lansbergii* aún no han sido identificados.

A su vez, se ha reportado que los VEGFs encontrados en diversos venenos de serpientes de la familia Viperidae, incrementan la permeabilidad microvascular en el sitio de la inyección (Takahashi et al., 2004); una actividad que podría mejorar la absorción y distribución de las toxinas en la presa. Esto sugiere que el VEGF, que representa el ~ 2.2% de las proteínas en el veneno, junto con otros componentes inflamatorios conocidos como las PLA₂s (Teixeira et. al, 2003), contribuyan significativamente al edema inducido por este veneno (Figura 19).

Sobre la base de los datos composicionales y funcionales obtenidos del veneno de *P. lansbergii lansbergii*, se puede sugerir que los envenenamientos por esta especie no estarían asociados con una alta tasa de mortalidad, aunque se podría predecir que implicarían al menos una hemorragia local considerable y una mionecrosis moderada, y posiblemente la ausencia de alteraciones importantes de la coagulación. Se registró un efecto trombocitopénico en ratones, pero debido a las diferencias entre especies, esta actividad debería confirmarse mediante observaciones clínicas en pacientes. Desafortunadamente, las características clínicas de los envenenamientos por *P. lansbergii lansbergii* no han sido reportadas específicamente en la literatura médica, posiblemente debido al hecho de que las especies de *Porthidium* fueron clasificadas anteriormente dentro del género *Bothrops* (Campbell y Lamar, 2004), y por lo tanto sus mordeduras de serpientes han sido discutidas esencialmente como "accidentes bothrópicos" en Colombia (Otero et al., 2002; Escobar y Fuentes, 2004; Otero et al., 1992; Ayerbe y Latorre, 2009). La presente información puede ser útil para futuros estudios que analicen las correlaciones clínicas de la composición del veneno de *P. lansbergii lansbergii*, y también para posteriores aislamientos y caracterizaciones de los componentes de su veneno.

Capítulo 2

Perfil funcional divergente de una fosfolipasa A₂ ácida y una básica proveniente del veneno de serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii*

1. Resumen

La serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii* habita en el norte de Colombia. Una reciente caracterización proteómica de su veneno (J. Proteomics [2015] 114, 287–299) reveló la presencia de fosfolipasas A₂ (PLA₂), las cuales representaron el 16.2% de sus proteínas. Las dos PLA₂s más abundantes se caracterizaron bioquímica y funcionalmente. *Pllans-I* es una enzima básica, dimérica con una masa monomérica de 14,136 Da, mientras que *Pllans-II* es una enzima ácida, monomérica de 13,901 Da. Ambas tienen Asp49 según sus secuencias parciales de aminoácidos y, en consecuencia, son catalíticamente activas sobre sustratos naturales o sintéticos. Sin embargo, estas dos enzimas difieren notablemente en sus bioactividades. *Pllans-I* induce mionecrosis, edema y es letal mediante inyección intracerebro-ventricular en ratones, así como citolítica y anticoagulante *in vitro*. Por el contrario, *Pllans-II* carece de estos efectos, a excepción de la inducción de un edema moderado. A pesar de no poseer miotoxicidad, *Pllans-II* incrementa el daño del tejido muscular provocado por la *Pllans-I* *in vivo*. En conjunto, los resultados demuestran aún más los perfiles funcionales divergentes de las PLA₂s tanto ácidas y básicas en los venenos de los viperidos, y sugieren que *Pllans-I* juega un papel miotóxico en los envenenamientos por *P. lansbergii lansbergii*, mientras que *Pllans-II*, aparentemente carente de toxicidad, aumenta el daño muscular causado por *Pllans-I*.

2. Introducción

La serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii*, conocida localmente como 'patoco' o 'patoquilla', se encuentra en la Región Caribe Colombiana, habitando tierras áridas, semiáridas y zonas húmedas del valle del río Magdalena, desde bajas elevaciones hasta los 1400 m. Su dieta incluye presas como ranas, lagartos y pequeños roedores (Campbell y Lamar, 2004; Otero, 2014). A pesar que se han reportado accidentes de mordeduras con esta especie (Paredes, 2012), no existen descripciones de las características clínicas específicas de estos envenenamientos en la literatura médica. Solo unos pocos estudios sobre su veneno están disponibles, y hasta donde se sabe, ninguna de sus proteínas ha sido aislada y caracterizada.

En un estudio previo, se analizó el veneno entero de *P. lansbergii lansbergii* mediante un enfoque proteómico y toxicológico combinado (Jiménez–Charris et al., 2015). En similitud con otras dos especies de *Porthidium* (*P. nasutum* y *P. ophryomegas*) de Costa Rica (Lomonte et al., 2012), el proteoma del veneno de *P. l. lansbergii* contiene predominantemente metaloproteinasas, y fosfolipasas A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) como el segundo tipo de proteína más abundante (Jiménez–Charris et al., 2015). Sin embargo, el veneno de *P. lansbergii lansbergii* presentó bajas proporciones de proteínas adicionales que no se encontraron en las otras dos especies de *Porthidium*, tales como fosfodiesterasas, fosfolipasas B y componentes del factor de crecimiento del endotelio vascular. Además, su contenido relativo de PLA₂s fue ligeramente mayor que el observado en *P. nasutum* y *P. ophryomegas*; y en consecuencia, el veneno de *P. lansbergii lansbergii* mostró una mayor actividad de PLA₂s en comparación con el veneno de *P. nasutum* (Jiménez–Charris et al., 2015). Por ende, en la búsqueda de obtener un mayor conocimiento sobre los componentes tóxicos del veneno de *P. lansbergii lansbergii*, el objetivo de este estudio fue aislar dos de sus PLA₂s más abundantes con el fin de caracterizar sus propiedades bioquímicas y funcionales.

Las PLA₂s de los venenos de serpiente son enzimas termoestables que, a pesar de su arquitectura conservada, muestran una notable diversidad funcional (Arni y Ward, 1996; Kini, 2003). Catalizan la hidrólisis del enlace 2–acilo de los fosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos en una reacción dependiente de calcio (Scott et al., 1990).

Con base en sus patrones de formación de puentes disulfuro y otras características estructurales distintivas, las PLA₂s de los venenos de serpiente se han clasificado dentro del grupo I (presentes en élapidos) o II (en viperidos) (Doley et al., 2010). A su vez, las PLA₂s del grupo II se han dividido en dos subtipos: Asp49–PLA₂s, que son catalíticamente activas, y “PLA₂ homólogos” o “proteínas similares a PLA₂”, que

son catalíticamente inactivas y comúnmente poseen una sustitución Lys49 (Lomonte et al., 2003; Lomonte y Rangel, 2012).

Entre sus diversos efectos, las PLA₂ de los venenos de serpiente pueden ejercer actividades neurotóxicas, miotóxicas, hemolíticas, inflamatorias, anticoagulantes, bactericidas e inhibidoras de la agregación plaquetaria (Páramo et al., 1998; Kini, 2003, 2005; Gutiérrez y Lomonte, 1995; Lomonte et al., 2009; Huancahuire–Vega et al., 2011). Las sutiles características estructurales y propiedades bioquímicas que definen las bioactividades específicas en las diferentes PLA₂s del veneno, han sido difíciles de precisar; y aún se desconocen muchos aspectos moleculares clave de sus mecanismos de acción (Gutiérrez y Lomonte, 2013).

Por lo tanto, es de interés explorar la vasta biodiversidad de las serpientes venenosas, en la búsqueda y caracterización de nuevas variantes de PLA₂s; que podrían dar una luz sobre la comprensión de su diversificación, roles biológicos y sus complejas relaciones de estructura–función.

3. Materiales y métodos

3.1. Veneno de serpiente

El veneno de *P. lansbergii lansbergii* se obtuvo de tres especímenes adultos encontrados en el Departamento del Atlántico. Las serpientes fueron liberadas después de la recolección de sus venenos, los cuales se agruparon en un pool, se centrifugaron para eliminar los restos, se secaron al vacío y se almacenaron a –20°C.

3.2. Aislamiento de Pllans–I y Pllans–II

Con el fin de aislar las dos PLA₂ más abundantes del veneno de *P. lansbergii lansbergii*, llamadas *Pllans–I* y *Pllans–II*, se siguieron las condiciones del RP–HPLC anteriormente descritas para la caracterización proteómica del veneno *P. lansbergii lansbergii* (Jiménez–Charris et al., 2015). En resumen, alícuotas de veneno (2 mg) se separaron en una columna C₁₈ (250 × 4.6 mm, diámetro de partícula 5 µm; Teknokroma) eluyendo a 1 mL/min con un gradiente de H₂O/TFA al 0.1% y ACN/TFA al 0.1%, como se describe a continuación: 0% de B durante 5 min, 0–15% de B durante 10 min, 15–45% de B durante 60 min, 45–70% de B durante 10 min, y 70% de B durante 9 min. Las eluciones fueron monitoreadas a 215 nm en un cromatógrafo Agilent 1200 usando el software ChemStation®, y las fracciones de

PLA₂ se recogieron manualmente, se secaron con centrifugación al vacío y se almacenaron a -20°C.

3.3. SDS-PAGE y espectrometría de masas (MS)

La concentración proteica de *Pllans-I* y *Pllans-II* se estimó midiendo su absorbancia a 280 nm en un NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific). Su homogeneidad fue evaluada mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras (5% de 2-mercaptoetanol a 100 °C durante 5 min), usando geles al 12% y teñidos con azul de Coomassie R-250. Además, la homogeneidad y la masa molecular promedio de isótopos fue determinada mediante ESI-MS/MS en un espectrómetro de masas QTrap3200® (Applied Biosystems). Las proteínas se diluyeron en ACN al 50% que contenía ácido fórmico al 0.1%, se cargaron en capilares de vidrio desechables recubiertos con metal y se introdujeron directamente en una fuente de nano-pulverización para ionización a 1200 V. El análisis de MS se realizó en modo positivo de carga múltiple, en un rango de 600 – 1700 m/z; con la ayuda del software Analyst® v.1.5 (ABSciex) por deconvolución.

3.4. Secuenciación parcial de aminoácidos mediante espectrometría de masas en tándem

Las proteínas *Pllans-I* y *Pllans-II* se digirieron con tripsina (Sigma) o quimotripsina (G-biosciences) grado secuenciación, después de su reducción con ditiotretitol (10 mM) y alquilación con yodacetamida (50 mM) como lo describe Van der Laat et al., (2013). Los productos peptídicos fueron desalinizados usando una columna C₁₈ ZipTips® (Millipore), diluidos con un volumen igual de una solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en ACN al 50%/TFA al 0.1%, y puestos en una placa OptiTOF384 para análisis por MALDI-TOF-TOF en un Proteomics Analyzer 4800-Plus (Applied Biosystems) como se describió en Lomonte et al. (2014).

Los espectros se adquirieron en modo reflector positivo a 2 kV, en el rango de 900–4000 m/z, usando 1500 disparos y una intensidad de láser de 3000. La calibración externa se realizó usando patrones CalMix® (ABSciex) puestos en la misma placa. Adicionalmente, algunos péptidos se analizaron mediante ESI-MS/MS en un equipo QTrap3200 mediante infusión directa. Los iones con carga doble o triple seleccionados a partir de los escaneos en el modo de resolución positiva mejorada (250 amu/s), se sometieron a fragmentación usando la herramienta de producto iónico mejorado con atrapamiento en Q₀.

Los ajustes fueron: Q₁, unidad de resolución con energía de colisión de 25–40 eV; tiempo de llenado de la trampa de iones lineal Q₂, 250 ms; y rango de escaneo Q₃, 1000 amu/s (Calvete et al., 2007). Todos los espectros de fragmentación obtenidos por espectrometría de masas MALDI o ESI, se interpretaron manualmente para derivar secuencias de aminoácidos *de novo*.

3.5. Alineación de secuencias de Pllans-I y Pllans-II

Cuatro secuencias de aminoácidos correspondientes a Asp49–PLA₂s ácidas y básicas provenientes de la familia Viperidae, con valores de identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 59% y 45% en comparación con *Pllans-I* y *Pllans-II*, fueron obtenidas después de una búsqueda con BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.gov>). Estas proteínas, junto con la secuencia adicionada manualmente de PhTX-II del veneno de *Porthidium hyoprora* (Huancahuire–Vega et al., 2014), se alinearon con el programa MUSCLE (Edgar, 2004) utilizando el software MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) y el método de máxima verosimilitud basado en el modelo basado en la matriz JTT (Jones et al., 1992).

3.6. Screening inmunoquímico de reconocimiento cruzado

Las enzimas purificadas *Pllans-I* y *Pllans-II* se analizaron mediante inmunodifusión en gel (Ouchterlony y Nilsson, 1978), para determinar su posible reconocimiento cruzado por anticuerpos policlonales contra la miotoxina II (tipo Lys49–PLA₂, producida en conejo), una PLA₂ del grupo II presente en el veneno de *Bothrops asper* (Lomonte y Gutiérrez, 1989). El pozo central de un gel de agarosa al 1% (disuelto en NaCl al 0.12 M y fosfato de sodio 0.04 M, PBS pH 7.2), se llenó con 30 µL de antisuero de conejo contra la miotoxina II; mientras que 30 µL de dos diluciones de *Pllans-I* y *Pllans-II* (0.25 y 0.5 µg/µL) se dispensaron en los pozos periféricos. La miotoxina II purificada, se utilizó como control positivo para la inmunoprecipitación. Después de 24 h de difusión a temperatura ambiente, las líneas de precipitación se registraron utilizando el generador de imágenes ChemiDoc®, con la ayuda del software ImageLab® (Bio–Rad).

3.7. Perfil toxicológico

Los experimentos en animales se realizaron con ratones CD–1 de ambos sexos, siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de la Universidad de Costa Rica (CICUA).

3.7.1. Actividad letal intracerebro–ventricular

Se inyectaron grupos de tres ratones (16–18 g de peso corporal) con 5 µg de *Pllans–I* o *Pllans–II* disueltos en 5 µL de PBS, por vía intracerebro–ventricular usando una micro–jeringa Hamilton. Esta dosis se seleccionó, sobre la base de estudios previos con enzimas de PLA₂ provenientes de venenos de serpiente (Gutiérrez et al., 1986a). Los animales se observaron hasta 24 horas después de la inyección, para registrar las posibles muertes.

3.7.2. Actividad miotóxica

La capacidad de *Pllans–I* y *Pllans–II* para inducir necrosis en el músculo esquelético se evaluó en grupos de cuatro ratones (18–20 g), respectivamente. Se inyectaron diferentes cantidades de las enzimas, solas o en combinación, disueltas en 50 µL de PBS en el músculo gastrocnemio. Las dosis se seleccionaron sobre la base de estudios previos que evaluaron actividad miotóxica con PLA₂s de venenos de serpiente (Gutiérrez y Lomonte, 1995). Como control negativo, un grupo de ratones recibió una inyección solo de 50 µL de PBS. Después de 3 h, se colectó la sangre de las venas de la cola en capilares heparinizados, se determinó la creatina quinasa (CK) del plasma usando un ensayo cinético UV (CK–Nac®, Analyticon), y se expresó en unidades/L (Gutiérrez et al., 1986b). Además, 6 h después de la inyección, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ y se obtuvieron muestras del tejido muscular inyectado, se fijaron en formalina al 10% y se procesaron para la evaluación histológica de secciones teñidas con hematoxilina–eosina.

3.7.3. Actividad edemática

Dos grupos de cuatro ratones (18–20 g) recibieron una inyección subcutánea en la almohadilla plantar, que contenía 5 µg de *Pllans–I* o *Pllans–II* (en 30 µL de PBS), respectivamente. Como control negativo, un grupo recibió una inyección idéntica de solo PBS. Se midió el grosor de las almohadillas a varios intervalos de tiempo (0.5, 1, 3, 6 y 24 h), usando un pie de rey (Oditest®, Kroeplin) como se describe en Lomonte et al. (1993).

3.8. Actividades in vitro

3.8.1. Actividad de fosfolipasa A₂

La actividad PLA₂ de *Pllans-I* y *Pllans-II* se ensayó en dos tipos de sustratos: fosfatidilcolina micelar (PC) y en el sustrato sintético monodisperso ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico (NOBA). Para el primero, se siguió el método colorimétrico rojo fenol descrito por de Araújo y Radvanyi (1987). Se añadieron diversas cantidades de las enzimas (0.3–5 µg) disueltas en 20 µL de agua a 1 mL de sustrato (PC al 0.25%, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 al 0.4%, rojo de fenol al 0.004%, disuelto en NaCl 0.15 M) en una cubeta termorregulada a 30 °C. Estas cantidades de enzimas utilizadas, corresponden a un rango de concentración de 0.006–3 µM. Después de un período de estabilización de 20 s, se monitoreó continuamente la disminución de la absorbancia a 558 nm durante 1 minuto.

Una unidad de actividad de PLA₂ se definió como el cambio de 0.001 en absorbancia por minuto. Para el sustrato sintético, se mezclaron diversas cantidades de las enzimas, disueltas en 225 µL de Tris 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 0.1 M, tampón pH 8.0, con 25 µL de NOBA (1 mg/mL en acetonitrilo; Holzer y Mackessy, 1996) y se incubaron a 37 °C durante 60 min. Las concentraciones finales correspondieron a 0.008–4 µM. El producto de reacción se cuantificó colorimétricamente a 405 nm en un lector de micro placas, y la actividad se expresó como el cambio final en la absorbancia × 1000. Las dos enzimas se compararon con base en su peso, considerando este resultado en un número comparable de subunidades activas para las formas monoméricas o diméricas. Ambos ensayos se realizaron por triplicado.

3.8.2. Actividad anticoagulante

Alícuotas de 0.2 mL de plasma humano citratado (3.8% v/v) se pusieron en tubos de vidrio y se incubaron en un baño de agua durante 5 minutos a 37 °C. Luego, se añadieron 50 µL de las soluciones de *Pllans-I* y *Pllans-II* en PBS que contenían de 5 a 40 µg de cada enzima (concentraciones finales: 4–32 µM), respectivamente; y se incubaron adicionalmente durante 10 min a 37 °C. Finalmente, se añadieron 50 µL de CaCl₂ 0.25 M y se determinó el tiempo de coagulación. Los tubos del control negativo contenían plasma incubado solo con PBS. Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.8.3. Citotoxicidad

La línea celular de mioblastos murinos C2C12 (ATCC CRL–1772) se cultivó en placas de 96 pozos, usando medio DMEM (Sigma) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), glutamina 2 mM, ácido pirúvico 1 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (0.1 mg/mL), y anfotericina B (0.25 mg/mL), en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, a 37 °C. Cuando se alcanzó una confluencia cercana al 100%, se indujo la diferenciación al disminuir el FBS al 1%. Después de la fusión de mioblastos que generan miotubulos largos y multinucleados, generalmente en 3–5 días, se eliminó el medio de crecimiento y se agregaron a pozos de cultivo por triplicado 20 µg de *Pllans–I* o *Pllans–II* disueltas en 150 µL de medio de ensayo (DMEM, 1% FBS). Esta concentración correspondió a 8 µM, y se seleccionó sobre la base del mismo ensayo en estudios previos con PLA₂ de veneno de serpiente relacionadas (Lomonte et al., 1999; Mora–Obando et al., 2014b).

Después de 3 h de incubación a 37 °C, se recogió una alícuota del sobrenadante (60 µL) de cada pozo y se cuantificó la actividad del lactato deshidrogenasa–LDH liberada de las células dañadas mediante un ensayo cinético UV (LDH–BR Chromatest). Los pozos de control para puntos de referencia al 0% y 100% consistieron en medio de cultivo solo o Triton X–100 al 0.1% en medio de ensayo, respectivamente (Lomonte et al., 1999). Adicionalmente, el daño celular se evaluó mediante observación microscópica y se registró con el lector de imágenes de células Cytation3® (BioTek).

3.9. Análisis estadístico

Las diferencias entre los promedios de dos grupos, se determinó mediante la prueba *t* de Student. Se utilizó el análisis de varianza ANOVA para la comparación de los valores promedios de más de dos grupos, seguida del post–test de Tukey. Este análisis se llevó a cabo con el uso del software Prism® (GraphPad), donde *p* < 0.05 se consideró como significativo.

4. Resultados

4.1. Caracterización bioquímica de *Pllans–I* y *Pllans–II*

El fraccionamiento del veneno de *P. lansbergii lansbergii* por medio de RP–HPLC se muestra en la Figura 20. Los picos que eluyeron a ~53 y ~60 min se identificaron

como PLA₂s en un estudio proteómico previo sobre este veneno (Jiménez-Charris et al., 2015). Estas proteínas se llamaron *Pllans-I* y *Pllans-II*, respectivamente.

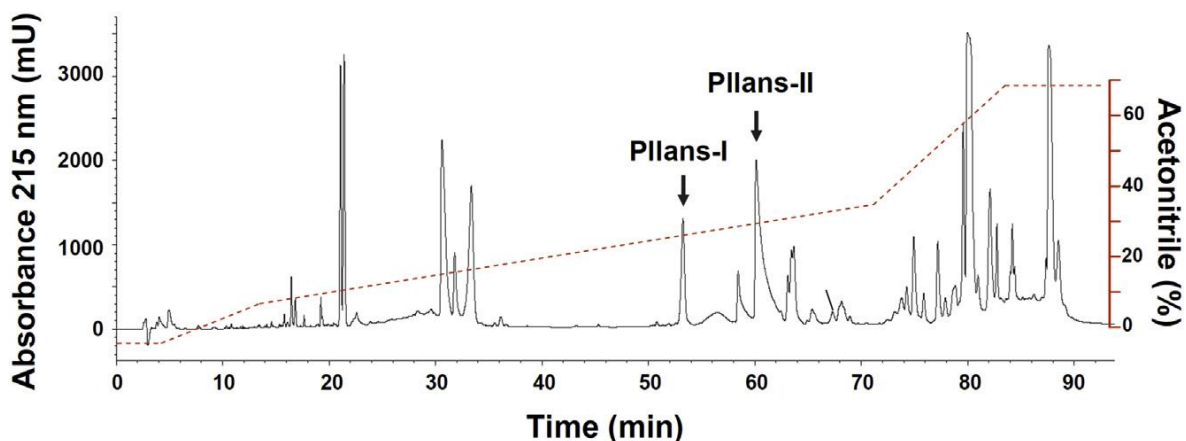


Figura 20. Aislamiento de *Pllans-I* y *Pllans-II* del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii*. El veneno (2 mg) se separó por RP-HPLC en una columna C₁₈ (4,6 x 250 mm), eluido con un gradiente de agua hacia acetonitrilo que contenía 0.1% de TFA (línea discontinua) y se monitoreó a 215 nm, como se describió en Materiales y métodos. Los tiempos de elución de *Pllans-I* y *Pllans-II* (flechas) corresponden a 53 min y 60 min, respectivamente.

Cuando se analizaron mediante SDS-PAGE, ambas proteínas migraron como bandas únicas de ~14 kDa en condiciones reductoras (Figura 21).

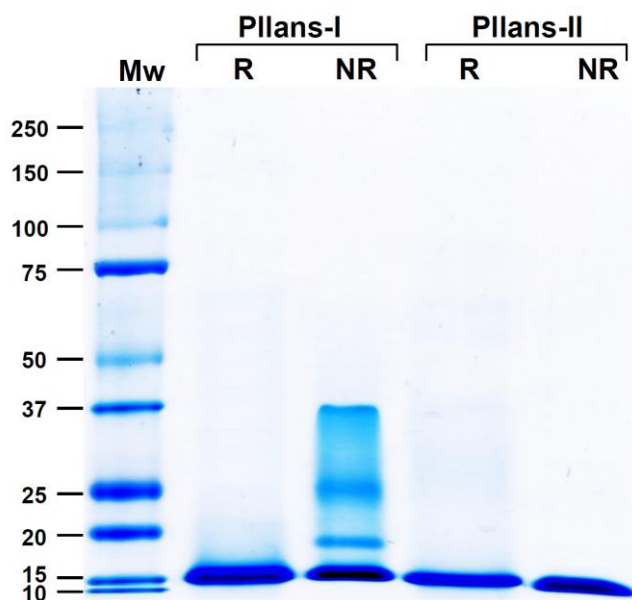


Figura 21. Análisis electroforético de *Pllans-I* y *Pllans-II* mediante SDS-PAGE. Las muestras se corrieron en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R) con 2-mercaptoetanol en un gel al 12%, y se tiñeron con azul de Coomassie R-250. El marcador de peso molecular (Mw), en kDa, están etiquetados en el carril izquierdo.

En el estado no reducido, *Pllans-I* mostró una mancha de agregados de orden superior, además de la banda de 14 kDa, mientras que *Pllans-II* migró como una banda de 14 kDa, lo que indica su naturaleza monomérica (Figura 21). Las movibilidades electroforéticas de *Pllans-I* y *Pllans-II* son consistentes con sus masas moleculares promedio de isótopos de $14,136 \pm 3$ Da y $13,901 \pm 1$ Da, respectivamente; según lo determinado por ESI-MS (Figura 22). El espectro de masas de *Pllans-II* reveló la presencia de un pico de ion adicional y ligeramente menos intenso de 13.959 Da (Figura 22D), que se interpretó que corresponde a una isoforma estrechamente relacionada, o a un aducto de +58 Da.

Se obtuvieron secuencias parciales de aminoácidos de las dos enzimas mediante secuenciación *de novo* por MS/MS de péptidos proteolíticos, que determinaron 75 y 49 residuos de *Pllans-I* y *Pllans-II*, respectivamente (Figura 23). Teniendo en cuenta que las PLA₂s del veneno de los viperidos, generalmente consisten en 121–123 residuos de aminoácidos; la cobertura de secuencia obtenida para *Pllans-I* y *Pllans-II* representaría ~62% y ~40%, respectivamente. La presencia del aminoácido ácido aspártico en la posición 49 (en el sistema de numeración común) se confirmó en ambas proteínas (Figura 23), de acuerdo con los datos proteómicos informados anteriormente (Jiménez-Charris et al., 2015).

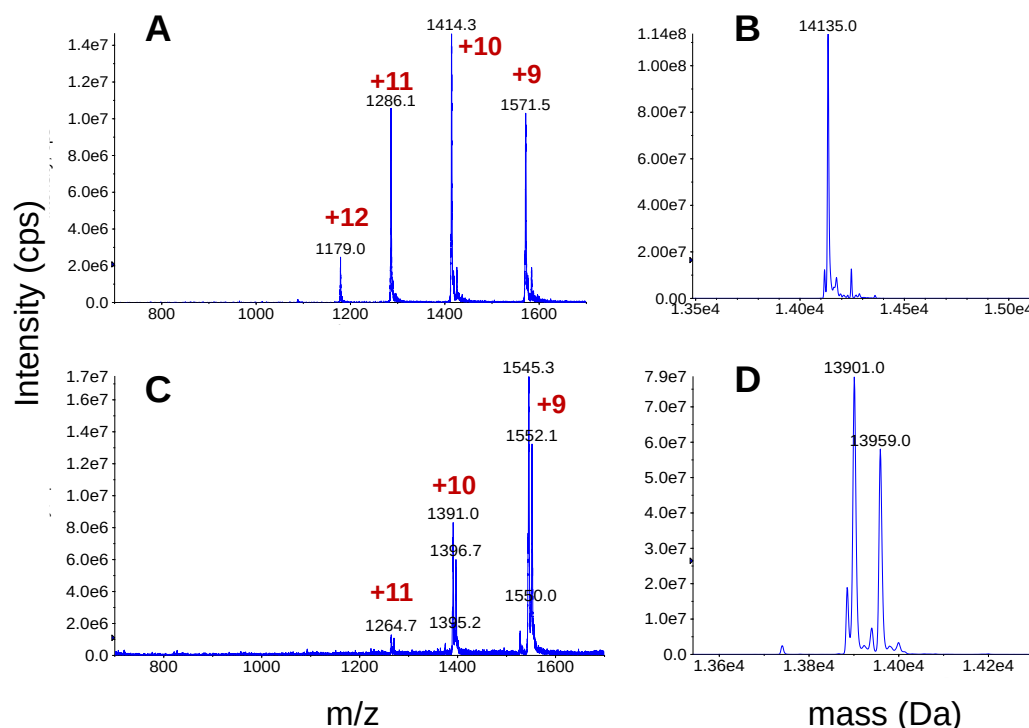


Figura 22. Masa molecular promedio de isótopos de *Pllans-I* y *Pllans-II*, determinada por espectrometría de masas de ionización por nano electrospray (ESI-MS). Las proteínas se analizaron por infusión directa en un espectrómetro de masas QTrap3200 a 1200 V, en modo positivo de carga

múltiple, como se describió en Materiales y métodos. Las series de iones de carga múltiple para (A) *Pllans-I* y (C) *Pllans-II* están deconvolucionadas en los paneles (B) y (D), respectivamente.

La alineación de las secuencias parciales de aminoácidos de *Pllans-I* y *Pllans-II* con PLA₂s relacionadas de la familia de los viperidos, reveló su homología con dos grupos diferentes. *Pllans-I* es más similar a las PLA₂s básicas, mientras que *Pllans-II* se agrupa junto con las PLA₂s ácidas (Figura 23). Ambas enzimas muestran varias diferencias en su alineamiento de secuencias parciales con respecto a homólogos relacionados, como se muestra por los valores de identidad intermedios obtenidos, 59–62% para *Pllans-I* y 45–48% para *Pllans-II* (Figura 23).

A

Pllans-I	<i>P. l. lansbergii</i>	-----NAIPYYAFYGCYCGKGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYE-----			
Q02517	<i>P. flavoviridis</i>	HLLQFRKMIKMTGKEPIVSYAFYGCYCGKGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYEKTGCDP			
-----	<i>P. hyoprora</i>	NLLQFNKMILKETGKNAIPFYAFYGCYCGWGGRGKPKDKTDRCCFVHDCCYGKLTGC-P			
O42187	<i>A. h. pallas</i>	HLLQFRKMIKMTGKEPVVSYAFYGCYCGSGGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYEKTGCDP			
P62022	<i>C. d. terrificus</i>	HLLQFNKMIKFETRKNAPFYAFYGCYCGWGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYGKLAKCNT			
			Id	n	pI
Pllans-I	KWDYYTYGT-----WCEEQVCECDKAAAIICFR-----YMAYPDIFCTD-----		100	75	
Q02517	KWDYYTYSENGDIVCGGDNPTKEVCECDKAAAIICFRDNLKTYK-KRYMTFPDIFCTDPTKEC		62	122	8.18
-----	KWDIYPYSLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRAAAIICFRNLDTYNKYGYMFYPSRCKGPSEQC		61	123	8.18
O42187	KWDDYTYSWKNGTIVCGGDDPKKEVCECDKAAAIICFRDNLKTYK-KRYMAYPDILCSSKSEKC		60	122	8.61
P62022	KWDIYPYSLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAAECLRRSLSTY-KYGYMFYPSRCKGPSETC		59	122	8.74

B

Pllans-II	<i>P. l. lansbergii</i>	-----SYSAYGCYCGW-----CCIVHDCCYGK-----			
AID56660	<i>G. intermedius</i>	HLMQFETLIMKVAKSGMFWISAYGCYCGWGGQGRPDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPK			
Q2PG83	<i>P. elegans</i>	GLWQFENMIMKVAKSGILSYAYGCYCGWGGRGTPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCNPK			
P06859	<i>P. flavoviridis</i>	GLWQFENMIKVVKKSGILSYAYGCYCGWGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCNPK			
P00623	<i>C. adamanteus</i>	SLVQFETLIMKVAKSGLLWISAYGCYCGWGGHGRPDATDRCCFVHDCCYGKATDCNPK			
			Id	n	pI
Pllans-II	-----QVCECDKAAAIICFRDNLDTYDYDTYWR-----		100	49	
AID56660	WDDYTYSENGDIVCGGDDPKKEVCECDKAAAIICFRDNLNTYDGTYWRFTKNCPEESEP		48	124	4.62
Q2PG83	LGKYTYISENGDIICGGDGPK-EVCECDRAAAIICFRDNLDTYDRKTYWKYPASNCQE-DSEPC		47	122	5.81
P06859	LGKYTYSWNNGDIVCEGDGPK-EVCECDRAAAIICFRDNLDTYDRNKYWRYPASNCQE-DSEPC		47	122	6.70
P00623	TVSYTYSENGEIVCGGDDPGTQICECDKAAAIICFRDNLPSYDN-KYWLFPKNCRE-EPEPC		45	122	4.91

Figura 23. Alineación múltiple de secuencias parciales de aminoácidos (A) *Pllans-I* y (B) *Pllans-II* con fosfolipasas A₂ homólogas de venenos de serpiente. Los códigos de acceso UniProtKB para las secuencias de las enzimas básicas y ácidas se muestran en azul y rojo, respectivamente. La secuencia de *Porthidium hyoprora* PhTx-II se tomó de Huancahuire-Vega et al. (2014). Las secuencias se alinearon usando MUSCLE (Edgar, 2004) con el software MEGA v6.06. Las posiciones idénticas de los aminoácidos están sombreadas en gris, con residuos de cisteína en negrita. El par His/Asp conservado en las posiciones 48/49, característico de las PLA₂s enzimáticamente activas, se resalta en amarillo. Los puntos isoelectricos (pI) se calcularon con la herramienta "Compute pI /MW" (https://web.expasy.org/compute_pi/), y los valores de identidad (Id, %) se calcularon sobre la base de los números de aminoácidos (n) determinados para las secuencias parciales de *Pllans-I* (n = 75) y *Pllans-II* (n = 49), respectivamente.

La pareja de His48/Asp49 es una característica conservada de las PLA₂s enzimáticamente activas provenientes de los venenos de serpiente y en consecuencia, *Pllans-I* y *Pllans-II* presentaron actividad de PLA₂ cuando se ensayaron en sustratos de forma micelar o monodispersa, sin diferencias significativas entre ellos para cada caso (Figura 24).

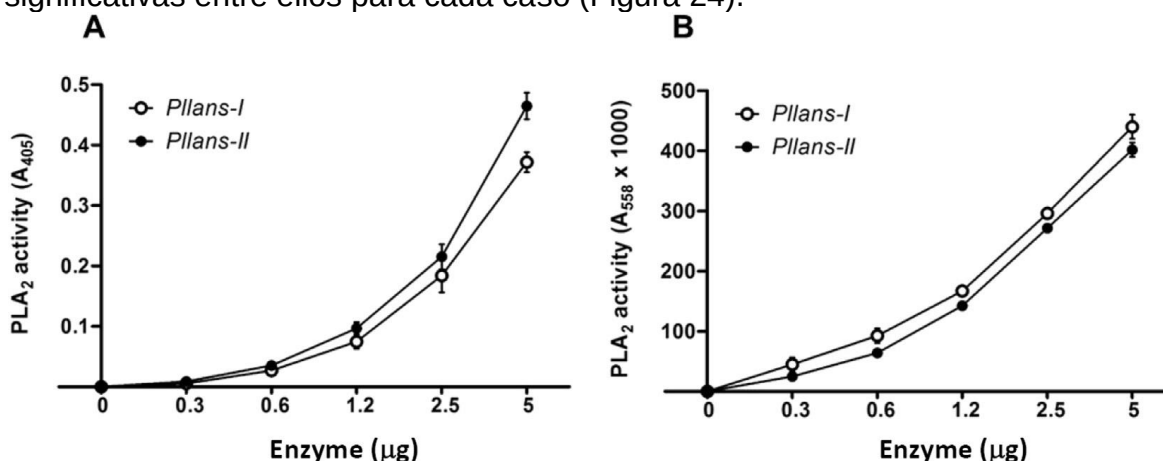


Figura 24. Actividad de fosfolipasa A₂ de *Pllans-I* (○) y *Pllans-II* (●) ensayada sobre el sustrato monodisperso ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico (A), o sobre sustrato de fosfatidilcolina micelar (B). Cada punto representa la media ± DE (n = 3). En algunos puntos, las barras de DE son más pequeñas que el tamaño del símbolo. Las diferencias entre *Pllans-I* y *Pllans-II* no son estadísticamente significativas (p > 0.05). Las cantidades absolutas de enzima adicionadas al sistema de ensayo corresponden a concentraciones en el rango de (A) 0.006–3 μM, y (B) 0.008–4 μM como se describió en Materiales y métodos.

4.2. Ausencia de reconocimiento inmunquímico de *Pllans-I* y *Pllans-II* por anticuerpos contra una PLA₂ miotóxica de *Bothrops asper*

La inmunodifusión en gel, evidenció que ninguna de las dos PLA₂s aisladas del veneno de *P. lansbergii lansbergii* se inmunoprecipitó por anticuerpos producidos en conejo contra la miotoxina II proveniente del veneno de *B. asper* (Figura 25). Los pozos de control positivo confirmaron la capacidad de estos anticuerpos para generar, como se esperaba, una línea clara de precipitado contra el antígeno homólogo.

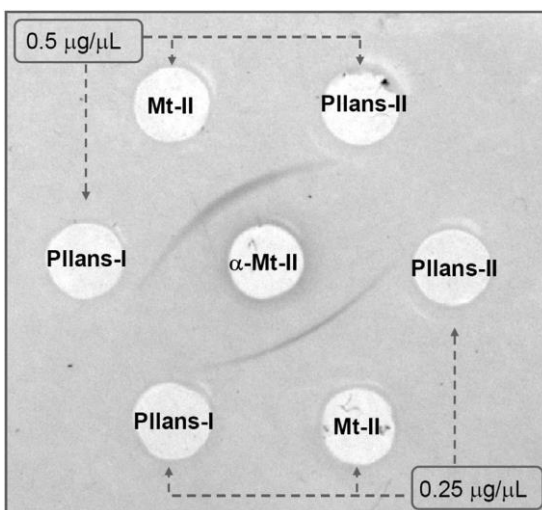


Figura 25. Ausencia de reconocimiento cruzado mediante inmunodifusión en gel de *PIIans-I* y *PIIans-II* por anticuerpos de conejo (α -Mt-II) producidos contra la miotoxina II a partir del veneno de *Bothrops asper*. Los anticuerpos producen una línea de precipitación clara contra su antígeno homólogo (Mt-II), pero no en contra de las fosfolipasas A_2 básica (*PIIans-I*) o ácida (*PIIans-II*) de *P. lansbergii lansbergii*.

4.3. Perfiles funcionales de *PIIans-I* y *PIIans-II*

Se observaron diferencias notables en la comparación de los perfiles funcionales tóxicos de las dos enzimas recién aisladas. *PIIans-I* indujo 100% de letalidad en ratones cuando se administraron 5 μ g por inyección intracerebro-ventricular, mientras que *PIIans-II*, probada en condiciones idénticas, no fue letal ni causó ninguna alteración evidente en los animales. Cuando se inyectó intramuscularmente, *PIIans-I* presentó un claro efecto miotóxico, induciendo un incremento significativo de los niveles de CK en plasma en ratones, en comparación con los animales que recibieron solo PBS como control negativo (Figura 26A). El daño muscular local inducido por *PIIans-I* se confirmó mediante evaluación histológica, que mostró una necrosis generalizada de las fibras musculares alrededor del sitio de inyección (Figura 26C). En contraste, una inyección idéntica de *PIIans-II* no aumentó los niveles plasmáticos de CK por encima de los valores de control (Figura 26A), y no indujo alteraciones morfológicas en el tejido muscular (Figura 26D); lo que indica su falta de actividad miotóxica.

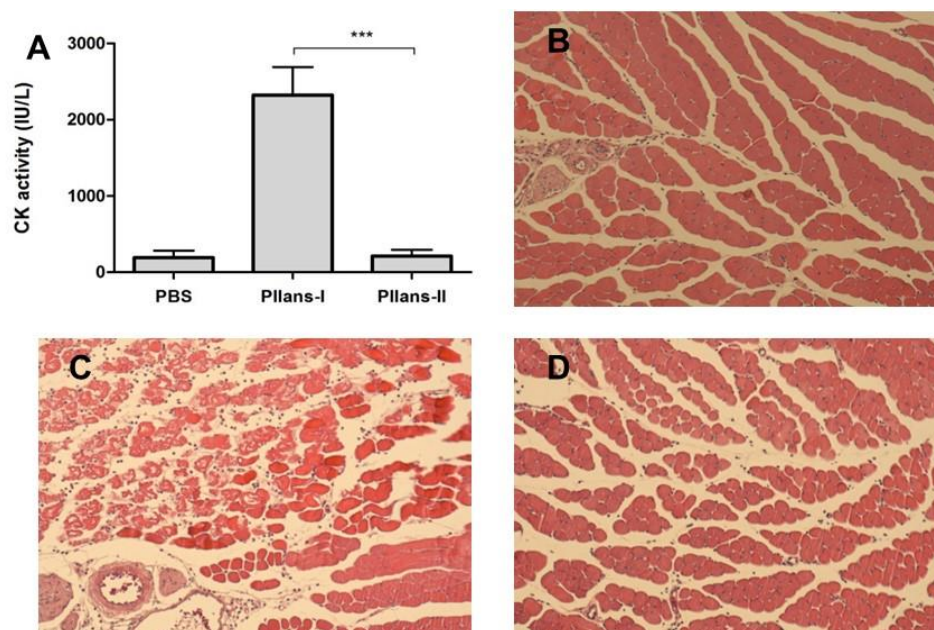


Figura 26. Evaluación de la actividad miotóxica de *Pllans-I* y *Pllans-II* después de una inyección intramuscular en ratones. **(A)** La actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) se determinó 3 h después de la inyección de 50 µg de cada proteína en 50 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El grupo control se inyectó solo con PBS. Las barras representan la media ± DE (n = 4). La diferencia entre las enzimas *Pllans-I* y *Pllans-II* (***) fue estadísticamente significativa (p < 0.05) mediante la prueba t de Student. Secciones de músculo esquelético de las áreas inyectadas se obtuvieron 6 h después de la inyección *i.m.* de PBS **(B)**, *Pllans-I* **(C)** o *Pllans-II* **(D)** y teñidas con hematoxilina-eosina para evaluación histológica. De acuerdo con los datos de actividad CK mostrados en **(A)**, se observa una necrosis generalizada de las fibras musculares para *Pllans-I* **(C)**, mientras que la inyección de PBS **(B)** o *Pllans-II* **(D)** no indujeron alteraciones histológicas en el tejido.

El único efecto *in vivo* compartido entre *Pllans-I* y *Pllans-II* fue la inducción de un edema leve y transitorio en el ensayo de la almohadilla plantar del ratón, el cual desapareció a las 6 h después de la inyección (Figura 27).

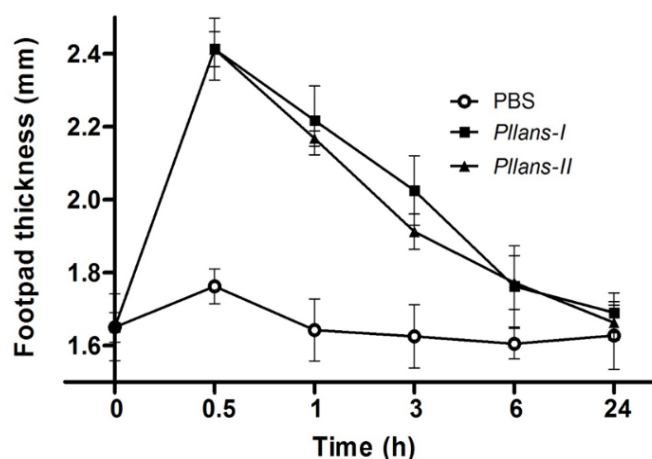


Figura 27. Actividad edemática de *Pllans-I* y *Pllans-II*. Los ratones recibieron una inyección subcutánea en la almohadilla plantar que contenía 5 μ g de cada enzima en 30 μ l de PBS. Un grupo de control recibió el mismo volumen de PBS solo. El grosor de la almohadilla plantar se midió en diferentes momentos, como se describió en materiales y métodos. Cada punto representa el promedio $\pm$ DE ($n = 4$). Las diferencias entre las PLA₂s y PBS a 0.5, 1 y 3 h son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

In vitro, *Pllans-II* no mostró actividad anticoagulante en el plasma humano, a diferencia de *Pllans-I*. El promedio del tiempo de coagulación por recalcificación del plasma, incubado con 40 μ g de *Pllans-II* fue de 300 ± 14 s, mientras que el plasma incubado con PBS coaguló después de 188 ± 2 s ($p > 0.05$). Bajo las mismas condiciones, *Pllans-I* prolongó el tiempo de coagulación a más de 2400 ± 4 s ($p < 0.05$). Además, se observó una diferencia funcional adicional para estas dos PLA₂s en el experimento de citotoxicidad. *Pllans-I* produjo una citólisis de los miotubulos C2C12, luego de 3 h de exposición de las células con 20 μ g de la proteína, según lo determinado por la liberación de LDH (Figura 28A), y confirmado por las alteraciones morfológicas drásticas observadas microscópicamente (Figura 28B). *Pllans-II*, por el contrario, no indujo daño celular; ya que los miotubulos C2C12 mantuvieron su morfología normal y sus sobrenadantes mostraron los mismos niveles basales de actividad de LDH, en comparación con las células expuestas solo al medio de ensayo (figura 28C).

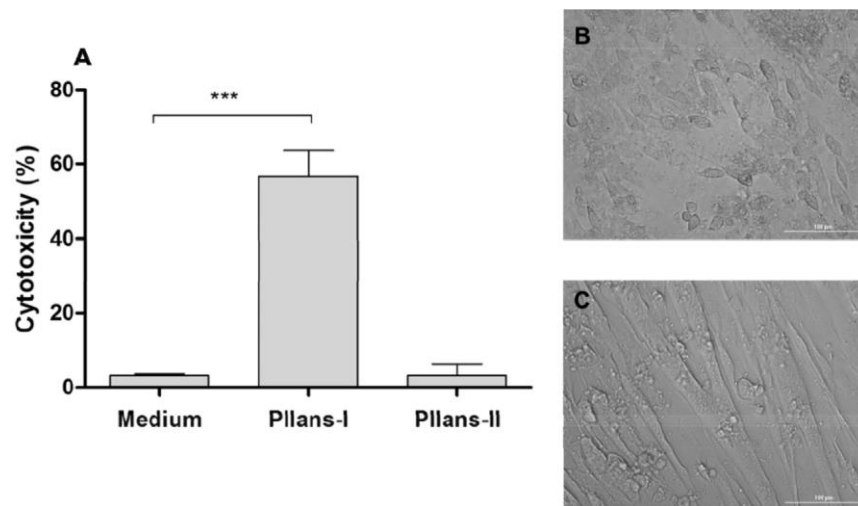


Figura 28. Actividad citotóxica de *Pllans-I* y *Pllans-II* sobre miotubulos C2C12 de músculo esquelético murino. **(A)** Las células se pusieron en contacto con 20 μg de cada enzima en 150 μL de medio de ensayo (concentración final 8 μM), o medio solo. Después de 3 h de incubación, se determinó la cantidad de enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en los sobrenadantes, como se describió en Materiales y métodos. La citotoxicidad se expresó como porcentaje, considerando que la LDH liberada por las células expuestas al 0.1% de Triton X-100 es del 100%. Las barras representan la media $\pm$ DE ($n = 3$). La diferencia entre *Pllans-I* y el medio (***) es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Evaluación microscópica de cambios morfológicos en los miotúbulos expuestos a *Pllans-I* **(B)** o *Pllans-II* **(C)**. De acuerdo con los datos de citotoxicidad mostrados en **(A)**, se observan alteraciones drásticas y pérdida de la estructura alargada de los miotúbulos en **(B)**, mientras que no se evidencian alteraciones morfológicas en los miotúbulos en **(C)**.

4.4. Incremento del efecto miotóxico de *Pllans-I* por *Pllans-II*

La posibilidad de una acción sinérgica de *Pllans-II* sobre el efecto miotóxico de *Pllans-I*, se exploró mediante la combinación de estas dos enzimas, antes de inocular la mezcla en ratones por vía intramuscular. Cuando se inyectaron 25 μg de *Pllans-II* junto con 25 μg de *Pllans-I*, el daño del músculo esquelético aumentó significativamente en comparación con la inyección de 25 μg de solo *Pllans-I*; y alcanzó un valor similar al inducido por 50 μg de *Pllans-I* (Figura 29). Por lo tanto, aunque *Pllans-II* carece de una miotoxidad intrínseca, es capaz de mejorar el efecto miotóxico causado por *Pllans-I*.

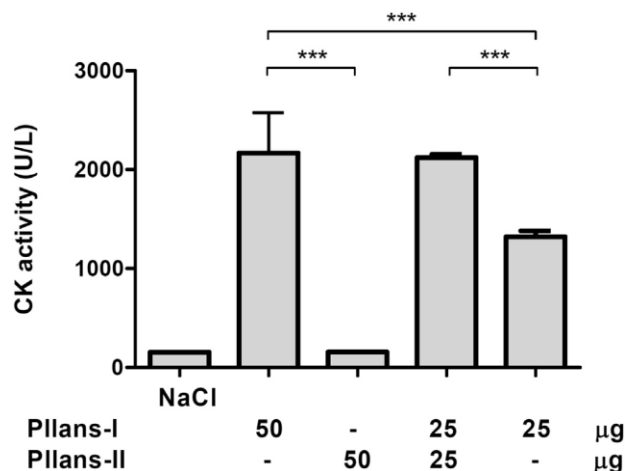


Figura 29. Sinergismo en la actividad miotóxica de *Pllans-I* cuando se combina con *Pllans-II* antes de la inyección intramuscular en ratones. La adición de 25 µg de *Pllans-II* a 25 µg de *Pllans-I*, condujo a un nivel significativamente más alto de la actividad de CK en el plasma de los ratones 3 h después de la inyección, en comparación con la inyección de solo 25 µg de *Pllans-I*. Alcanzó un valor similar al inducido por 50 µg de *Pllans-I*. Los asteriscos (***) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las barras. Cada barra representa el promedio $\pm$ DE de cuatro animales.

5. Discusión

Las PLA₂s representan uno de los componentes más abundantes de los venenos de serpiente, mostrando una variedad notable de actividades tóxicas a pesar de las restricciones estructurales impuestas por su andamiaje conservado, rico en puentes disulfuro (Kini, 2003; Magro et al., 2004). Los venenos de muchas especies de viperidos a menudo contienen diferentes combinaciones de PLA₂s, que pueden incluir variantes enzimáticas tanto ácidas como básicas; así como variantes básicas catalíticamente inactivas denominadas proteínas homólogas de PLA₂ (Lomonte et al., 2009; Lomonte y Rangel, 2012), y codificadas por una multiplicidad de genes. Los detalles estructurales que determinan las actividades particulares de diferentes PLA₂s de los venenos de serpiente, han sido difíciles de definir y continúan siendo un desafío (Gutiérrez y Lomonte, 2013). Al caracterizar comparativamente las nuevas variantes de PLA₂ de la gran biodiversidad de serpientes venenosas, es posible obtener información sobre sus determinantes de toxicidad e inferir tendencias funcionales generales sobre la base de sus características estructurales compartidas.

Siguiendo con el estudio proteómico sobre el veneno de *P. lansbergii lansbergii* de Colombia (Jiménez-Charris et al., 2015), se caracterizaron dos de sus PLA₂s más

abundantes. *Pllans-I* y *Pllans-II* representan aproximadamente el 3.0% y el 10.8%, respectivamente; de las proteínas totales del veneno. Las masas moleculares observadas por ESI-MS/MS, junto con las movilidades electroforéticas en SDS-PAGE, indican que *Pllans-II* existe como un monómero, en similitud con otras PLA₂s ácidas caracterizadas a partir de los venenos de serpiente de la familia viperidae (Fernández et al., 2010; Silveira et al. 2013; Van der Laat et al., 2013); mientras que *Pllans-I* tiende a formar agregados de orden superior, siguiendo la misma tendencia observada para muchas PLA₂s básicas que forman homodímeros dentro de esta familia de serpientes (Suzuki et al., 1995; Angulo et al., 2000; dos Santos et al., 2011). Aunque los homodímeros se han observado comúnmente en estudios cristalográficos, estas PLA₂s básicas pueden exhibir un equilibrio dinámico de asociación-disociación, que incluye trímeros o incluso asociaciones más altas en solución, como lo demuestran los resultados electroforéticos presentados en esta investigación (Figura 21).

La alineación de las secuencias parciales de aminoácidos de *Pllans-I* y *Pllans-II* con proteínas relacionadas, reveló la similitud de *Pllans-I* con PLA₂s básicas, y de *Pllans-II* con PLA₂s ácidas (Figura 23). De acuerdo con la presencia de Asp49 en su secuencia (un residuo clave del sitio activo de las PLA₂s), tanto *Pllans-I* como *Pllans-II* mostraron actividad catalítica, la cual fue similar entre ellas cuando se evaluaron en micelas (PC) o sustratos monodispersos (NOBA) (Figura 24).

A pesar de su eficiencia catalítica similar (Figura 24), se evidenciaron diferencias marcadas cuando las dos enzimas se caracterizaron funcionalmente. *Pllans-I* exhibió efectos tóxicos visibles en ratones, incluyendo miotoxicidad (Figura 26) y letalidad por vía intracerebro-ventricular. Además, *Pllans-I* ejerció actividad anticoagulante *in vitro* y citotoxicidad sobre miotubulos cultivados (Figura 28). Por el contrario, *Pllans-II* carecía de todas estas actividades *in vivo* e *in vitro*. El único efecto compartido por las dos enzimas fue la inducción de un edema leve y transitorio, mediante el ensayo de la almohadilla plantar de ratón (Figura 27); una característica común de las PLA₂s secretadas de diversas fuentes, incluyendo algunas enzimas no tóxicas, como la PLA₂ pancreática porcina (Cirino et al., 1989; Lloret y Moreno, 1993; Landucci et al., 2000).

Estos hallazgos concuerdan con la noción de que, aunque la actividad de las PLA₂s juega un papel indispensable en los efectos tóxicos que despliegan las enzimas tipo Asp49 de los venenos de serpiente (Rosenberg, 1986; Kini, 2003; Rossetto y Montecucco, 2007; Mora-Obando et al., 2014a), no es suficiente inducir toxicidad *per se*. Los pasos adicionales necesarios para la toxicidad de las PLA₂s deben implicar el reconocimiento y la interacción interfacial con los blancos biológicos apropiados (Montecucco et al., 2008); lo que explica por qué hay PLA₂s que son altamente activas en catalizar la hidrólisis de fosfolípidos en ensayos "artificiales" comúnmente utilizados, pero no pueden inducir toxicidad en los sistemas biológicos.

A pesar de la atractiva simplicidad de este concepto, el progreso en la identificación de los principales blancos biológicos para las acciones tóxicas de las PLA₂s de los venenos ha sido muy limitado (Šribar y Križaj, 2011; Gutiérrez y Lomonte, 2013). Las características funcionales divergentes de *Pllans-I* y *Pllans-II*, añaden más evidencia a una tendencia creciente observada para las PLA₂s de los venenos de serpiente; en el sentido que los principales efectos tóxicos son altamente sesgados hacia las variantes básicas. Con pocas excepciones, las enzimas ácidas muestran baja toxicidad *in vivo*, siendo en muchos casos completamente inofensivas en bioensayos comunes (Fernández et al., 2010; García Denegri et al., 2010; Vargas et al., 2012; Van der Laat et al., 2013; Marques et al. 2015). De acuerdo con esta tendencia, la *Pllans-I* básica mostró un perfil funcional típico de las miotoxinas Asp49-PLA₂ de los vipéridos, incluidas varias actividades tóxicas; mientras que la *Pllans-II* ácida careció de toxicidad en los mismos ensayos.

Es importante destacar que no se puede descartar la posibilidad de que variantes de las PLA₂s ácidas, aparentemente inocuas como *Pllans-II* puedan ser tóxicas para animales particulares distintos de los roedores, o que puedan tener funciones aún desconocidas que no estén relacionadas con la toxicidad. Por ejemplo, dos PLA₂s ácidas y no tóxicas aisladas de los venenos de *Bothrops jararacussu* (BthA-I-PLA₂; Roberto et al., 2004) o *Porthidium nasutum* (PnPLA₂; Vargas et al., 2012) han demostrado actividad bactericida. Por lo tanto, al menos algunas PLA₂s ácidas podrían ser funcionalmente relevantes para la defensa contra las infecciones bacterianas en las glándulas de veneno, más que para su toxicidad.

Una consideración adicional es que algunas PLA₂s catalíticamente activas, pueden tener un rol sinérgico cuando actúan en combinación con variantes similares a PLA₂s tipo Lys49 (Cintra-Francischini et al., 2009; Mora-Obando et al., 2014b) o incluso con otros tipos de componentes del veneno tales como metaloproteinasas (Bustillo et al., 2012, 2015). En el presente estudio, se encontró que la PLA₂ no tóxica *Pllans-II* aumenta dos veces más la acción miotóxica de *Pllans-I* en ratones; lo que demuestra una sinergia entre estos dos tipos de PLA₂s (Figura 29).

Aunque el mecanismo que subyace a esta mejora, aún no se ha investigado; tal sinergia puede proporcionar al menos una explicación parcial, para racionalizar la presencia de una cantidad considerable (10.8% de las proteínas totales) de una PLA₂ aparentemente inocua en el veneno de *P. lansbergii lansbergii*, *Pllans-II*, la cual es casi tres veces más abundante que la miotóxica *Pllans-I*. Además, la posibilidad de que *Pllans-II* pueda tener propiedades antibacterianas similares a las de BthA-I-PLA₂ (Roberto et al., 2004) o PnPLA₂ (Vargas et al., 2012), es algo que no fue explorado en este trabajo y queda por estudiar.

La PLA₂ básica *Pllans-I* mostró características típicas y funciones tóxicas de otras PLA₂s miotóxicas tipo Asp49 de los venenos de la familia Viperidae. Por lo tanto, se

evaluó su posible relación antigénica con estas últimas, usando anticuerpos contra la miotoxina II, una PLA₂ homóloga tipo Lys49 de *Bothrops asper* (Figura 25). Estudios previos han demostrado que los anticuerpos policlonales (Lomonte y Gutiérrez, 1989) y monoclonales (Lomonte y Kahan, 1988) generados contra las PLA₂s básicas miotóxicas del veneno *B. asper*, reconocen de forma cruzada las variantes Asp49 y Lys49, así como una gran cantidad de PLA₂s miotóxicas estructuralmente relacionadas, presentes en los venenos de diferentes especies de viperidos dentro de los géneros *Bothrops*, *Protobothrops* (*Trimeresurus*), *Atropoides*, *Cerrophidion*, *Bothriechis* y *Agkistrodon* (Lomonte et al., 1987, 1990); varias de las cuales han sido aisladas y caracterizadas como miotoxinas (Moura-Silva et al., 1990; Lomonte et al., 1990; Gutiérrez y Lomonte, 1995). La falta de inmunoprecipitación de *Pllans-II* al entrar en contacto contra los anticuerpos anti-miotoxina II era de esperarse, ya que se ha descrito que las PLA₂s ácidas de los viperidos forman un grupo antigénico diferente de los PLA₂s básicas (Fernández et al., 2010; Van der Laat et al., 2013). Sin embargo, la falta de reconocimiento de *Pllans-I* por los anticuerpos contra la miotoxina II es más sorprendente, dadas las similitudes funcionales de estas dos proteínas. Este hallazgo sugiere que las PLA₂s básicas del veneno de las especies de *Porthidium* podrían representar un nuevo grupo antigénico, diferente de las contrapartes básicas presentes en muchos de los venenos de viperidos, que son fácilmente reconocibles por estos anticuerpos; una hipótesis que se abordará en un futuro trabajo.

En conclusión, se caracterizaron las dos PLA₂s más abundantes del veneno de *P. lansbergii lansbergii*. *Pllans-I* demostró ser una PLA₂ básica tipo Asp49 miotóxica; mientras que *Pllans-II* se caracterizó como una PLA₂ tipo Asp49 ácida, aparentemente sin efectos tóxicos, pero capaz de aumentar la miotoxicidad de *Pllans-I*. En conjunto, los resultados son consistentes con la noción de que las PLA₂s ácidas y básicas de los viperidos muestran perfiles funcionales altamente divergentes, con actividades tóxicas que están muy sesgadas hacia las variantes básicas de la enzima. Además, estos hallazgos subrayan la importancia de evaluar los potenciales sinérgicos, al caracterizar funcionalmente las múltiples variantes de PLA₂s que pueden coexistir en un mismo veneno, con la finalidad de comprender mejor sus roles dentro del contexto de los efectos inducidos por los venenos enteros.

Capítulo 3

Potencial antitumoral de *Pllans-II*, una Asp49-PLA₂ ácida proveniente del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* sobre células de carcinoma cervical humano

1. Resumen

Este trabajo revela por primera vez los efectos potenciales antitumorales y angiostáticos de *Pllans-II*, una Asp49-PLA₂ ácida monomérica proveniente del veneno de serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii* sobre células de carcinoma cervical-HeLa. *Pllans-II* mostró predominantemente mayor citotoxicidad dependiente de la dosis sobre las células HeLa, que sobre las células de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231. Interesantemente, *Pllans-II* presentó un efecto insignificante *in vitro* sobre células normales tales como MCF 10A, una línea de células epiteliales de mama no tumorigénicas y sobre células endoteliales-HUVEC. Además, *Pllans-II* indujo la detención del ciclo celular sobre HeLa con un aumento significativo en el número de células en la fase G1. El análisis por citometría de flujo mostró que *Pllans-II* indujo apoptosis temprana y tardía en células HeLa, verificada por la modulación de importantes mediadores de las vías de apoptosis, tales como CASP8, BCL2L1, BCL2, BAX, BAD y BIRC5. Esta modulación, indica una posible muerte celular apoptótica desencadenada por la vía extrínseca. *Pllans-II* también fue capaz de inhibir la migración celular en las células HeLa al interferir con las integrinas tipo $\alpha 5$ y $\beta 1$. Asimismo, *Pllans-II* inhibió la angiogénesis *in vitro* en células HUVEC a través de una vía independiente de VEGF. Nuestros resultados muestran que *Pllans-II* podría ser empleado como un agente anticancerígeno para el desarrollo de nuevos prototipos antitumorales.

2. Introducción

El cáncer de cuello uterino (CCU) es el segundo cáncer más común en las regiones menos desarrolladas después del cáncer de mama (Ferlay et al., 2015). Según la Liga Contra el Cáncer en Colombia, es el segundo cáncer más frecuente y la segunda causa de muerte en las mujeres. Aproximadamente 4.661 nuevos casos son diagnosticados cada año, y 1.986 mujeres mueren por esta consecuencia. Se estima que en 5 años exista un total de 15.104 casos nuevos (Liga contra el Cáncer, 2018). Por lo tanto, el CCU sigue siendo un problema de salud pública en el país, imponiendo un desafío para el sistema de salud, en la generación de intervenciones oportunas, efectivas y articuladas para reducir tanto la incidencia y mortalidad; cuyo control debe priorizarse a través de tratamientos nuevos y eficientes.

En todos los tipos de cáncer y en particular, en el CCU se genera un conjunto de alteraciones que inducen un efecto común, el proceso de resistencia a la muerte celular por apoptosis. Por lo tanto, la reactivación de la apoptosis se ha convertido en un objetivo principal para la eliminación de las células cancerosas. Si bien es cierto que el tratamiento de primera línea contra el CCU es el tratamiento quirúrgico (Oberlin et al., 2011; Echeverri et al., 2016; Sawaya et al., 2016), y en estadios más avanzados, el tratamiento suele combinar radioterapia y quimioterapia (ESMO, 2012; Miranda et al., 2016); desafortunadamente, este tipo de cáncer puede reaparecer después de este procedimiento y los pacientes a menudo abandonan el tratamiento para evitar la disminución de la calidad de vida.

Por lo tanto, con la necesidad de explorar nuevas estrategias de intervención y medicamentos más efectivos contra el CCU e inocuas contra las células normales, se están investigando nuevas moléculas que contrarrestan los efectos secundarios de la terapia; y que se enfoquen en el microambiente tumoral, particularmente en la inhibición de la angiogénesis y la inducción de apoptosis celular. Algunos de estos tratamientos se basan en proteínas de los venenos de serpiente (Sarray et al., 2013; Calderon et al., 2014). Dentro de la proteína más utilizada se encuentran: L-aminoácido oxidasa, desintegrinas, lectinas de tipo C, metaloproteinasas, inhibidor de PLA₂ y fosfolipasas A₂ (de Carvalho et al., 2001; Rodrigues et al., 2009a; Sánchez et al., 2009; Azevedo et al., 2016; de Oliveira et al. 2017; Gimenez et al., 2017).

Las PLA₂ secretadas de los venenos de serpiente (svPLA₂s) han sido bastante efectivos en detener el desarrollo de las células tumorales de diferentes orígenes (Osipov y Utkin, 2017). Los efectos son tan significativos que los svPLA₂ pueden considerarse seriamente como agentes anticancerígenos (Rodrigues et al., 2009b). Muchos estudios han demostrado que la actividad antitumoral, antimetastásica y antiangiogénica de las svPLA₂ son independientes de su actividad catalítica,

participando otros mecanismos tales como la interacción con las proteínas de membrana de la superficie celular (Ej., Receptores de PLA₂ tipo M o integrinas) y las vías de transducción de señales intracelulares (Stábeli et al., 2006; Gebrim et al., 2009; Calderón et al., 2014; Brglez et al., 2014; Osipov y Utkin., 2017). Los efectos son tan prominentes que las svPLA₂ podrían ser consideradas seriamente como prototipos de agentes anticancerígenos (Rodrigues et al., 2009b)

Recientemente, una Lys49-PLA₂ aislada del veneno de *Bothrops pauloensis*, BnSP-6 generó una citotoxicidad dependiente de la dosis e inhibió la adhesión en células humanas de cáncer de mama MDA-MB-231; junto con una baja actividad citotóxica contra la línea celular de mama no tumorigénica MCF 10A (Azevedo et al., 2016). Una svPLA₂ ácida de *Bothrops jararacussu* (BthA-I-PLA₂) y una Lys49-PLA₂ (MjTX-II) de *Bothrops moojeni*, mostraron efectos antitumorales sobre la leucemia T humana, el adenocarcinoma de mama y el tumor de ascitis de Ehrlich (Roberto et al., 2004; Stábeli et al., 2006). Además, se ha demostrado el efecto antitumoral para la crotoxina, una svPLA₂ derivada del veneno del *Crotalus durissus terrificus* (Cura et al., 2002). Adicionalmente, dos svPLA₂ del veneno de *Cerastes cerastes*, CC-PLA₂-1 y CC-PLA₂-2, fueron capaces de inhibir la adhesión y migración de células cancerosas, junto con la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Zouari-Kessentini et al., 2009; Kessentini-Zouari et al., 2010). A pesar de estos hallazgos, hay pocos estudios que hayan evaluado la actividad de las svPLA₂s en células CCU. Recientemente, Erzurumlu et al. (Erzurumlu et al., 2017) observaron que una fracción de fosfolipasa del veneno de *Montivipera bulgardaghica* alteró el ciclo celular de una línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino-HeLa, sin inducir apoptosis.

Por lo tanto, en la búsqueda de nuevos fármacos para la terapia contra el cáncer, nuestro grupo de investigación describió el primer análisis proteómico del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* (Jiménez-Charris et al., 2015) y caracterizó las dos svPLA₂s tipo Asp49 más abundantes y catalíticamente activas: una básica (*Pllans-I*) y una ácida (*Pllans-II*) (Jiménez-Charris et al., 2016). La proteína *Pllans-I* induce mionecrosis, edema y es letal por inyección intracerebro-ventricular en ratones, así como citolítica y anticoagulante *in vitro*. Interesantemente, *Pllans-II* carece de estos efectos; y la actividad citotóxica sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12 fue mínima (Jiménez-Charris et al., 2016).

Dado la posibilidad de que las svPLA₂s ácidas como *Pllans-II*, podrían ser inocuas para células normales de roedores o humanos, como se observó en esta investigación, y dado que no se ha investigado su potencial terapéutico; se evaluó el efecto citotóxico de *Pllans-II* contra diferentes líneas celulares de cáncer de mama humano, tales como MDA-MB-231 y MCF7, y la línea celular HeLa, un adenocarcinoma de cuello uterino humano. Además, se evaluó la toxicidad de

Pllans-II sobre MCF 10A, una línea de células epiteliales de mama no tumorigénicas, y en células endoteliales de vena umbilical humana – HUVEC. Como resultado de esta investigación, se demostró por primera vez que la proteína *Pllans-II* presentó mayor afinidad citotóxica sobre las células HeLa, que por las células de cáncer de mama y no tumorigénicas. Por lo tanto, el estudio también evaluó el mecanismo de muerte celular que generó la proteína *Pllans-II* sobre las células HeLa y la capacidad de afectar procesos que promueven la metástasis, tales como la migración celular y la angiogénesis.

3. Materiales y métodos

3.1. Veneno

El veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* se obtuvo de especímenes recolectados en tres municipios del Departamento del Atlántico–Colombia: Juan de Acosta, Piojó y Baranoa. Las serpientes fueron liberadas después de la recolección de sus muestras. Se hizo un pool de venenos y se centrifugó a 14000 rpm para eliminar los desechos. Luego, se secaron en una centrifuga de vacío y se almacenaron a –20 °C hasta su uso. La Corporación Autónoma Regional del Atlántico – C.R.A., mediante Resolución N° 000187 de 2015, proporcionó la autorización para la captura de especies silvestres de diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial.

3.2. Purificación de la proteína *Pllans-II*

La purificación de *Pllans-II* se llevó a cabo siguiendo las condiciones de HPLC en fase inversa descritas por Jiménez–Charris et al., (2016), con algunas modificaciones. En resumen, 2 mg de veneno fueron separados en una columna Zorbax SB–C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm de diámetro de partícula; Agilent) y eluidas a 1 mL/min usando un gradiente de H₂O/TFA al 0.1% y ACN/TFA 0.1%. Los eluyentes fueron monitoreados a 215 nm en un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity, usando el software EZ CHROM ELITE (Agilent Technologies, Inc. 2006). La fracción de *Pllans-II* se recogió manualmente, se secó mediante centrifugación al vacío y se almacenó a –20 °C.

3.3. Cultivo celular

Las células de cáncer de mama – MDA–MB–231 y MCF7, la línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino – HeLa, la línea de células epiteliales mamarias no tumorigénicas – MCF10A y las células endoteliales de vena umbilical humana – HUVEC, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA). Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Las células MDA–MB–231 y MCF–7 fueron mantenidas en medio IMDM suplementado con suero fetal bovino – SFB al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 mg/mL. Las células MCF 10A se mantuvieron en medio DMEM F12 con 10% de SFB, suplementado con factores de crecimiento epidermal – EGF 100 µg/mL, hidrocortisona 1 mg/mL e insulina 10 mg/mL, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin. Las células HeLa y HUVEC se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía 10% de SFB, 2 mM de L–glutamina, 2 mM de piruvato de sodio, 1 mM de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin.

3.4. Ensayo de citotoxicidad

La actividad citotóxica de los cultivos celulares tratados con *Pllans–II*, se evaluó mediante el ensayo colorimétrico MTT (3– (4, 5–dimetiltiazol–2–il) –2, 5–difeníl–tetrazolio–bromuro). Las células (4 x 10⁴ células/pozo) se sembraron en una microplaca de 96 pozos. Las células adheridas se incubaron con medio completo, en ausencia (células de control) o con la presencia de diferentes concentraciones de *Pllans–II* (100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 o 1.6 y 0.8 µg/mL) durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Después del tratamiento, las células se incubaron con MTT (5 mg/mL, 20 µL/pozo) durante 3 horas a 37 °C y los cristales de formazan se disolvieron con 100 µL de PBS que contenía 10% de SDS y 0.01 N de HCl. Luego de 18 horas de incubación, la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer–Thermo Scientific, USA) a 570 nm. La actividad citotóxica de nuestra proteína experimental se comparó con Cisplatino® para determinar la eficacia de *Pllans–II* como posible agente terapéutico antitumoral.

3.5. Análisis del ciclo celular

El análisis del arresto del ciclo celular inducido por *Pllans–II* sobre las células HeLa, se analizó mediante la cuantificación del contenido de ADN como lo describió previamente Krishan (1975). En resumen, las células HeLa (5 × 10⁵ células/pozo)

se trataron con 100 µg/mL de *Pllans-II* o medio de cultivo (grupo control) durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Luego, las células fueron recolectadas y fijadas en etanol al 70% durante 18 horas a 4 °C. Para cada grupo, las células se incubaron con yoduro de propidio (PI) (10 µg/mL) y RNasa A (100 µg/mL) durante 45 minutos a 37 °C, para garantizar la tinción del ADN. El ciclo celular de las células fue analizado en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD) y los datos se obtuvieron utilizando el software FlowJo (versión 7.6.3).

3.6. Análisis de muerte celular

El ensayo de apoptosis se evaluó mediante el uso del kit “FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II” (BD Biosciences, Brasil), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las células HeLa (1 x 10⁶/pozo) se colocaron en placas de cultivo de 12 pozos y se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂, durante 24 h. Después de este tiempo, las células se incubaron con medio tanto en ausencia (células de control) o presencia de *Pllans-II* (100 µg/mL). Luego, las células se re-suspendieron en buffer de enlace 1X y se les adicionó 2 µL de anexina V-FITC y 2 µL de PI; para su posterior tinción en la oscuridad durante 15 minutos. El análisis de apoptosis se realizó mediante citometría de flujo (FACSCanto II – BD, USA), y los porcentajes de células apoptóticas se determinaron usando el software FlowJo (FlowJo v.7.6.3).

3.7. Cuantificación relativa de genes asociados a muerte celular apoptótica mediante PCR en tiempo real

Las células HeLa (3 x 10⁵ células/pozo) se incubaron con *Pllans-II* (50 µg/mL) o RPMI 1640 como control negativo, en placas de cultivo de 12 pozos durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, se usó TRIZOL (Invitrogen, Brasil) para extraer el ARN total de acuerdo con el protocolo del fabricante. La pureza y concentración del ARN, se estimaron por densidad óptica a 230 y 260 nm. La construcción de los cDNAs se sintetizaron mediante un sistema de transcripción inversa, usando el kit GoScript® Reverse Transcription System (PROMEGA, Brasil), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los primers que se usaron fueron: BAD, BAX, BCL2, BCL2L1, BIRC5 y CASP8 (GO-GenOne, Brasil) (<http://www.genone.com.br>).

Los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado, utilizando SYBR Green PCR master mix (LGC Biotechnology, Brasil), cDNA (2 µL) y 0.1 µM de cada primer, usando el termociclador ABI 7300 de Applied Biosystem – USA. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 50 ciclos a 95 °C durante 10s y 58 °C durante 45s. Los datos obtenidos se normalizaron utilizando GAPDH como

gen constitutivo, y se analizaron mediante el método del CT comparativo, de acuerdo con Livak y Schmittgen (2001). Los resultados fueron expresados en función de un análisis de expresión diferencial de cada gen, al comparar el grupo tratado con *Pllans-II* y el grupo tratado solo con medio RPMI 1640.

3.8. Ensayo de Wound healing

La inhibición de la migración de las células HeLa se llevó a cabo mediante el ensayo Wound healing (curación de heridas) como lo describió Yue et al. (2010), con algunas modificaciones. Se sembró un total de 5×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos, hasta lograr una confluencia completa. Después de 24 horas, el medio se descartó y la monocapa fue rasgada por la mitad con una punta plástica de 10 μ L. Luego, a cada pozo tratado, se le añadieron 50 μ g/mL de *Pllans-II* o medio RPMI 1640 (grupo control). El tiempo de finalización del experimento se determinó por el cierre de la herida en la muestra control. La confluencia celular fue analizada tanto a las 24 como 48 horas, mediante el uso de un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100, Japón).

3.9. Cuantificación de integrinas

Las células HeLa (2×10^5 células/tubo) se pre-incubaron con 50 μ g/mL de *Pllans-II* o medio RPMI, durante 1 hora a 37 °C y en una incubadora humidificada que contenía 5% de CO₂. Las células se incubaron en buffer de bloqueo que contenía 0.5% de BSA, durante 20 minutos a 4 °C. Luego, las células se centrifugaron, se lavaron y se re-suspendieron en 100 μ L de PBS. Posteriormente, las células fueron incubadas a 4 °C durante 30 minutos con 2 μ L (concentración de 2 μ g/ 10^6 células en PBS) disueltos en 1% de BSA de anticuerpos monoclonales anti-human α 2 (CD49b) marcado con fluoresceína, anti-human β 1 (CD29) marcado con ficoeritrina, anti-human α V β 3 (CD51 / CD61) marcado con fluoresceína y anti-human α 5 (CD49e) marcado con fluoresceína (Ambriex, Brasil). Además, todas las muestras fueron incubadas con sus respectivos anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína o ficoeritrina como control negativo. Finalmente, las células se lavaron, se re-suspendieron en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan II BD (BD Accuri C6-Biosciences, CA, USA). Los resultados se procesaron utilizando el software FlowJo (FlowJo v.7.6.3; Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

3.10. Ensayo de angiogénesis in vitro

El efecto de la *Pllans-II* sobre la formación de vasos por parte de las células HUVEC, fue evaluado mediante el ensayo de formación de vasos sobre Matrigel. Para este ensayo, las células HUVEC (5×10^5 células/pozo) se pre-incubaron con 50 µg/mL de *Pllans-II* durante 30 minutos a 37 °C en medio RPMI suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico – bFGF (10 ng/mL). Las células que fueron incubadas solo con medio RPMI y suplementado con bFGF, se usaron como control. Después de la incubación, las células se sembraron en una cámara de cultivo celular, recubierta con 50 µL de Matrigel 5.25 mg/mL (Corning® Matrigel® Matrix, USA), e incubadas durante 18 h a 37 °C y 5% de CO₂. El número de vasos formados fue cuantificado a una magnificación de 20×, usando un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100).

3.11. Cuantificación de VEGF

Los niveles de VEGF se cuantificaron en los sobrenadantes de las células HUVEC, que se obtuvieron del ensayo de angiogénesis *in vitro*. La cuantificación se evaluó usando el kit “BD Cytometric Bead Array (CBA), Human VEGF Flex Set” para muestras de sobrenadante provenientes de cultivo celular (BD–USA), según el protocolo del fabricante. Las muestras se analizaron por medio del software BD Accuri C6 (BD Accuri C6–Biosciences, CA, USA).

3.12. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ Desviación Estándar. Las diferencias significativas entre los promedios del tratamiento y del control, se determinó mediante la prueba t de Student o ANOVA de una vía; mientras que la comparación de dos o más variables se evaluó mediante la ANOVA de dos vías, seguido del post-test de Bonferroni. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA), donde *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 fueron considerados como significativos.

4. Resultados

4.1. *Pllans-II* disminuyó la viabilidad celular en varias líneas celulares cancerígenas

Se investigó los efectos de *Pllans-II* sobre la viabilidad de las células cancerígenas usando el ensayo MTT. Se detectó que *Pllans-II* inhibe la viabilidad de las células HeLa y MCF7 de manera dosis-dependiente de la concentración (Figura 30A). El efecto inhibitor más potente se observó contra las células HeLa. Después de tratar las células con 100 µg/mL de *Pllans-II* por 24 horas, la viabilidad celular se redujo al 45%. En el caso de las células de cáncer de mama, *Pllans-II* solo redujo la viabilidad de las células MCF-7 en aproximadamente 80%, y redujo ligeramente la viabilidad de las células MDA-MB-231. En cambio, al usar las mismas concentraciones de proteína que se usaron con las células HeLa, *Pllans-II* no afectó significativamente la viabilidad de las células HUVEC y MCF 10A (Figura 30A).

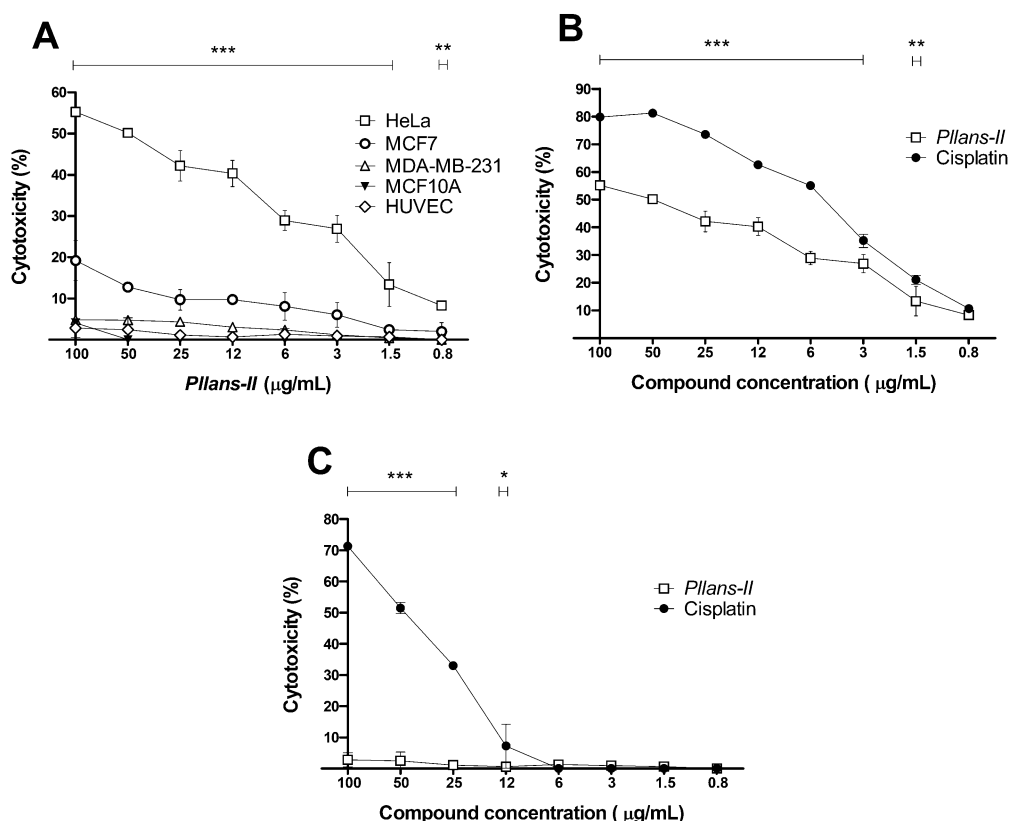


Figura 30. Actividad citotóxica de *Pllans-II* y Cisplatino® sobre diferentes líneas celulares cancerígenas y no tumorales usando el ensayo de MTT. **A)** Las células de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231), adenocarcinoma de cérvix (HeLa), las células no tumorigénicas de mama (MCF 10A), y las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron sembradas en placas de 96 pozos, a una densidad de 4×10^4 células/pozo. Las células fueron tratadas con diferentes

concentraciones seriadas (100 – 0.8 $\mu\text{g/mL}$) de *Pllans-II* por 24 h. Para determinar la efectividad de *Pllans-II* como posible modelo terapéutico antitumoral, se comparó con Cisplatino® para determinar sus actividades citotóxicas, usando una densidad celular de células HeLa **(B)** y HUVEC **(C)** de 4×10^4 células/pozo. Al final del tiempo de incubación, la viabilidad celular fue determinada por el ensayo de reducción de MTT, como se describió en la sección de Materiales y métodos. Los datos fueron expresados en función del promedio $\pm$ DE (n=3). **(A)** Se consideró estadísticamente significativo a un $***p < 0.001$ cuando fue comparado con las líneas celulares no tumorigénicas (MCF 10A y HUVEC). **(B, C)** Las diferencias significativas fueron comparadas entre ellos a una $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ y $*p < 0.05$.

La actividad citotóxica de *Pllans-II* fue comparada con Cisplatino®, un agente quimioterapéutico utilizado para tratar varios tipos de cáncer, incluyendo el CCU. A las diferentes concentraciones usadas, el Cisplatino® presentó un mayor efecto citotóxico sobre las células HeLa (Figura 30B), pero *Pllans-II* es más inofensivo sobre las células normales que el medicamento control (Figura 30C). Estos resultados sugieren que *Pllans-II* es más citotóxico para el adenocarcinoma de cuello uterino, que para las células de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7) y casi inocuo para las células no tumorigénicas. Por lo tanto, las células HeLa se usaron para evaluar la inducción de apoptosis, detención del ciclo celular y el efecto de *Pllans-II* sobre la inhibición de la metástasis.

4.2. *Pllans-II* induce tanto detención del ciclo celular como apoptosis sobre las células HeLa

Con el fin de validar si la reducción en la viabilidad de las células HeLa también involucró cambios en el ciclo celular, se evaluó el efecto de *Pllans-II* en la progresión del ciclo celular (Figura 31).

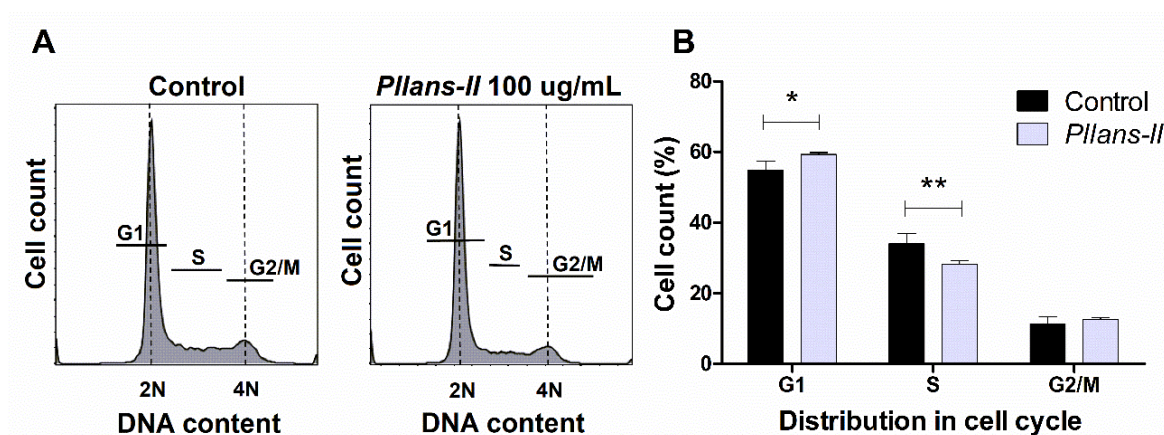


Figura 31. Efecto de *Pllans-II* sobre el ciclo celular de las células HeLa. **A)** El contenido de ADN en cada fase del ciclo celular de las células HeLa fue analizado por citometría de flujo y por medio del programa GraphPad Prism. Los histogramas representan la incubación celular con 100 $\mu\text{g/mL}$ de

Pllans-II por 24 horas, e incubadas con PI (10 µg/mL) y RNase A (100 µg/mL) por 45 minutos a 37 °C. **B)** El tratamiento con *Pllans-II* indujo una disminución significativa en el número de células en la fase S e incrementó el número de células en la fase G1, al compararse con el control. Los resultados fueron expresados como el promedio ± DE de tres replicas. Se consideraron con diferencias significativas a un * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Pllans-II indujo el arresto del ciclo celular en las células HeLa, al aumentar significativamente el número de células en la fase G1 desde 54.8% a 59.3% (* $p < 0.05$); y disminuyó de 34.0% a 28.2% el número de células en la etapa S (** $p < 0.01$). El porcentaje de células en la fase G2/M no presentó cambios evidentes de 11.2% a 12.5%; $p > 0.05$ (Figura 31B). El efecto apoptótico de *Pllans-II* sobre las células HeLa se confirmó mediante citometría de flujo, usando anexina V–FITC y PI. Los resultados indicaron que el porcentaje de células positivas para anexina V aumentó después del tratamiento con 100 µg/mL de *Pllans-II* (Figura 32A).

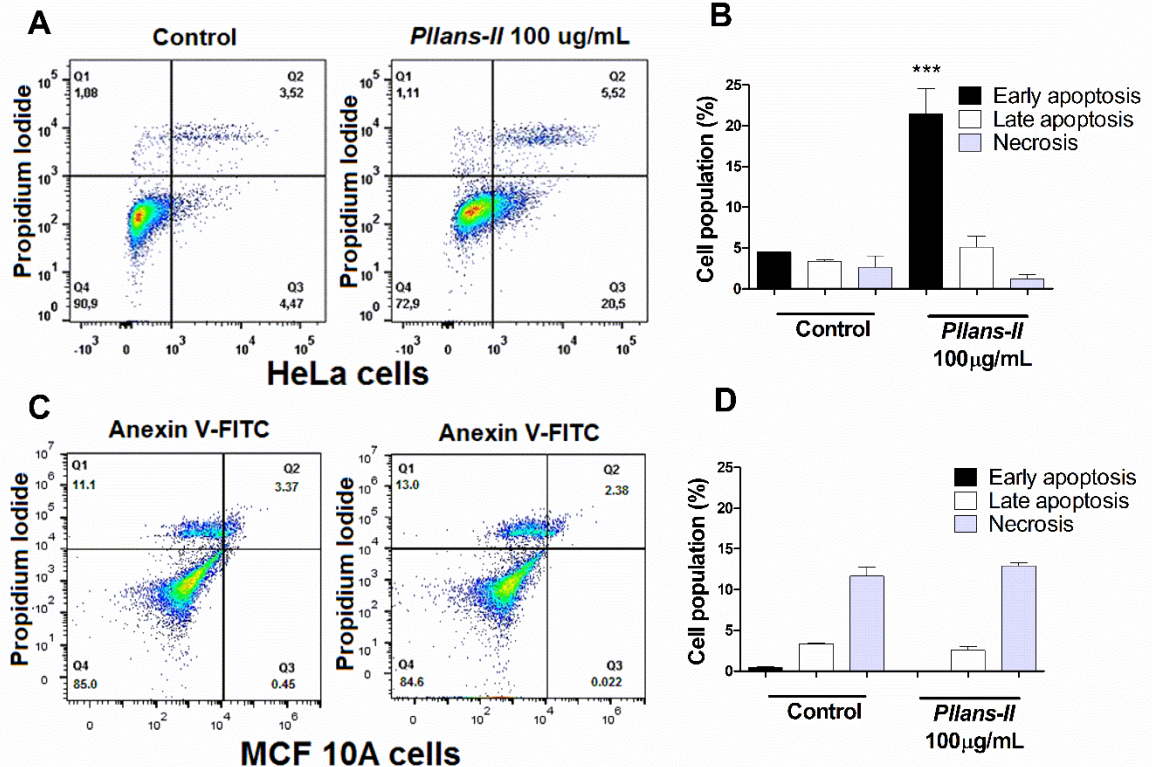


Figura 32. Evaluación del tipo de muerte celular inducido por el tratamiento de *Pllans-II* sobre las células de cáncer de cérvix – HeLa (**A**, **B**) y las células no tumorigénicas de mama – MCF10A (**C**, **D**). Las células fueron incubadas con 100 µg/mL de *Pllans-II* o medio RPMI 1640 como control por 24 h. Luego, las células fueron colectadas y sometidas a doble marcaje con Anexina V–FITC/Yoduro de propidio (PI). La distribución de las células apoptóticas fue analizada por citometría de flujo. (**A**, **C**) La adquisición representativa del diagrama de puntos, reveló áreas con apoptosis temprana (cuadrante inferior derecho), apoptosis tardía (cuadrante superior derecho) y necrosis (cuadrante superior izquierdo). (**B**, **D**) El diagrama de barras refleja el porcentaje de células apoptóticas mostradas en **A** y **C**. Cada barra representa el promedio ± DE de ensayos por triplicado. Tratamiento estadísticamente significativo a una *** $p < 0.001$ en comparación con el control.

La proporción de células con apoptosis temprana (Anexina V–positiva y PI–negativa) aumentó significativamente de 4,47% en las células control a 20.52% en las células tratadas con la proteína (Figura 32B). Además, se incrementaron las células con apoptosis tardía y se observó un bajo porcentaje de células necróticas cuando fueron tratadas con *Pllans–II*. Interesantemente, aunque no es un control obtenido de la misma región tisular, no se observó apoptosis temprana o tardía, ni mucho menos necrosis sobre las células MCF 10A, pre tratadas con la proteína *Pllans–II* (Figura 32C, D). Estos datos indican que *Pllans–II* es un componente bioactivo, que puede inducir principalmente apoptosis en las células HeLa y evitar la inducción de muerte celular en líneas celulares no tumorigénicas.

4.3. Nivel de expresión relativa del ARNm de los genes asociados con apoptosis en células HeLa inducidas por *Pllans–II*.

Con el fin de determinar el efecto de *Pllans–II* sobre la expresión de genes de señalización inductores de apoptosis en HeLa, las células fueron incubadas con 50 µg/mL de la proteína durante 24 h. Como genes típicos de estas respuestas biológicas, se seleccionaron los genes BIRC5, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1 y CASP8 para este análisis. Como se muestra en la Figura 33, el tratamiento con *Pllans–II* moduló tanto la expresión génica de BAX, BCL2 y BCL2L1, asociados con la vía intrínseca; así como el gen CASP8, asociado a la vía de señalización extrínseca.

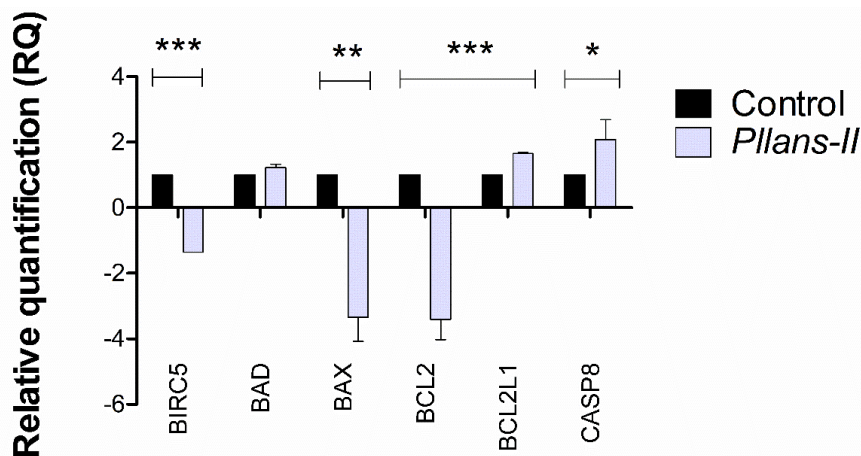


Figura 33. Cuantificación relativa de los genes asociados a apoptosis en las células HeLa por PCR en tiempo real, después del tratamiento con 50 µg/mL de *Pllans–II* por 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Los resultados fueron normalizados usando el gen constitutivo GAPDH y analizado por el método CT comparativo. Los genes BAD, BCL2L1 y CASP8 fueron regulados positivamente, mientras que los genes BIRC5, BAX y BCL2 fueron regulados negativamente. Las barras representan el promedio ± DE de experimentos por triplicados. Un *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 se consideraron estadísticamente significativos para los experimentos en tiempo real.

Los genes BAX y BCL2 se regularon negativamente mientras que BCL2L1 y CASP8 se regularon positivamente. En el caso del gen BAD, un promotor de muerte celular; este no mostro diferencias significativas en las células HeLa cuando fue comparado con la muestra control. Asimismo, *Pllans-II* fue capaz de disminuir la expresión de BIRC5 ($***p < 0.001$), un miembro de la familia de los genes inhibidores de la apoptosis.

4.4. Efecto de *Pllans-II* sobre la migración de las células HeLa

Dado que la capacidad migratoria para las células de adenocarcinoma de cuello uterino, es uno de los pasos claves para obtener el potencial metastásico, se investigó el papel de *Pllans-II* en la migración de las células HeLa, utilizando el ensayo de Wound healing. Como se muestra en la Figura 34A–D, se tomaron imágenes microscópicas de la herida a 0, 24 (imagen no mostrada) y 48 horas después del tratamiento con medio RPMI o *Pllans-II*.

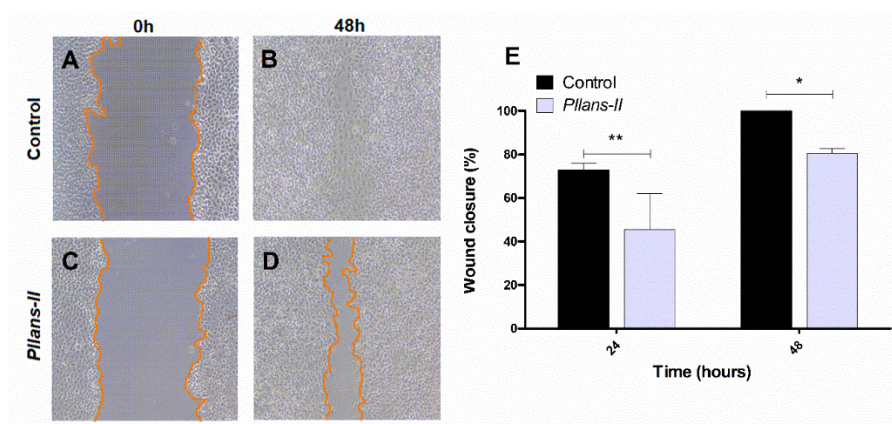


Figura 34. Evaluación de la migración de las células HeLa por medio del ensayo de Wound healing. Las células fueron sembradas con una cantidad de 5×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos, hasta obtener una confluencia completa. Después de 24 horas, el medio fue descartado y la monocapa fue lesionada con una punta plástica de 10 μ L para crear un área desprovisto de células (0 h) (A y C). Luego, las células fueron tratadas en ausencia (A y B) o presencia de 100 μ g/mL de *Pllans-II* (C y D). Se monitoreó la migración celular cada 24 (imagen no mostrada) o 48 horas, hasta completar el 100% de confluencia en el grupo control. Los análisis fueron desarrollados en un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100). (E) El gráfico de barras muestra el porcentaje de migración de las células después de 24 y 48 h. Los resultados representan el promedio $\pm$ DE de cuatro experimentos. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativas al compararse con el control.

La herida realizada en la monocapa de las células control, se cerró completamente después de 48 h de incubación (Figura 34B). Sin embargo, el tratamiento con *Pllans-II* redujo la migración de las células HeLa después de 48 h (Figura 34D). La migración de las células HeLa fue inhibida por 50 μ g/mL de *Pllans-II* desde 54,6%

(24 h) a 19,6% a las 48 h, en comparación con el control (27,7% de inhibición a las 24 h) (Figura 34E).

4.5. Medición de la expresión de integrinas en las células HeLa al ser expuestas a *Pllans-II*

La invasión celular durante la remodelación tisular y la morfogénesis depende de la adhesión celular y la migración, asociado a la interacción de sus integrinas con la matrix extracelular y a los diferentes ligandos. Por lo tanto, para sustentar estos hallazgos, se evaluaron algunas integrinas tales como $\alpha 2$ (CD49b), $\beta 1$ (CD29), $\alpha V\beta 3$ (CD51 / CD61) y $\alpha 5$ (CD49e) mediante citometría de flujo (Figura 35). La expresión de las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ se redujeron significativamente en la superficie celular de las células HeLa, cuando fueron expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de *Pllans-II*. Este hallazgo, indica que estas integrinas podrían ser funcionalmente inhibidas en la invasión de las células cancerígenas. No obstante, la expresión de las integrinas $\alpha 2$ y $\alpha V\beta 3$ no se vieron afectadas en las células HeLa, al ser pre-incubadas con *Pllans-II*.

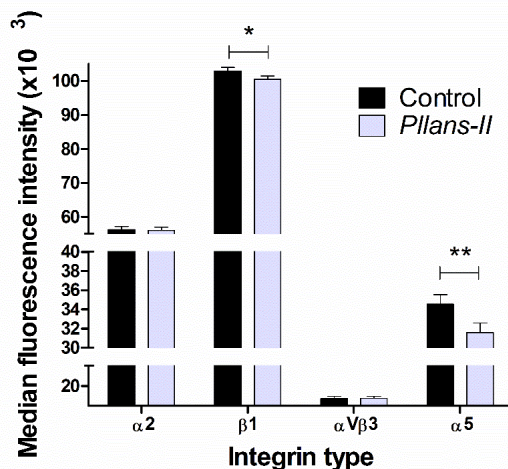


Figura 35. Expresión de integrinas ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ and $\alpha 5$) en las células HeLa después de un tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de *Pllans-II*. Los datos fueron expresados como el promedio $\pm$ DE, y los experimentos se realizaron por triplicado. Las diferencias entre los tratamientos y control fueron analizadas por ANOVA de dos vías, seguidos del post-test de Bonferroni. Estadísticamente significativo: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

4.6. Efecto de *Pllans-II* en la formación de nuevos vasos por medio del ensayo angiogénesis

Con el fin de evaluar la capacidad de *Pllans-II* en inhibir la formación de nuevos vasos, se evaluó su efecto sobre las células HUVEC usando el ensayo de

angiogénesis sobre Matrigel. Se observó una disminución significativa en la formación de nuevos vasos inducidos por bFGF en presencia de 50 $\mu\text{g/mL}$ de *Pllans-II* (Figura 36A, B). El número de vasos formados en presencia y ausencia de *Pllans-II* se muestra en la Figura 36C. *Pllans-II* redujo significativamente la formación del número de vasos en un 85,4% ($***p < 0.001$), en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, *Pllans-II* estimuló la producción de VEGF presente en el sobrenadante de las células HUVEC, que se obtuvo a partir del ensayo de angiogénesis *in vitro* (Figura 36D). La concentración de VEGF liberado de las células HUVEC no tratadas fue de $695,7 \pm 17,3 \text{ pg/mL}$, en contraste con el aumento en las células tratadas con *Pllans-II* de $1039 \pm 2,4 \text{ pg/mL}$ ($***p < 0.0001$).

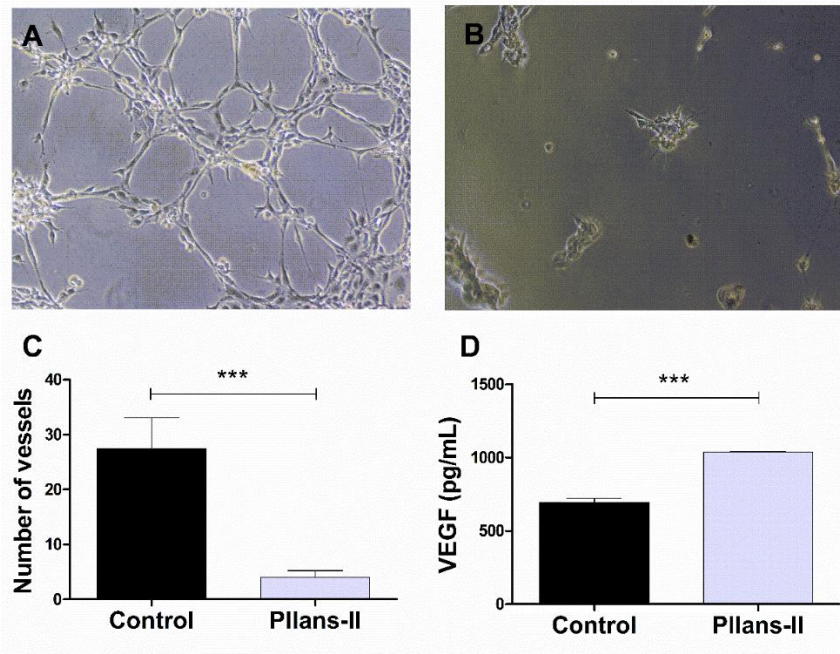


Figura 36. Análisis *in vitro* del efecto anti-angiogénico de *Pllans-II* sobre las células HUVEC. Para el ensayo de angiogénesis, las células HUVEC fueron pre-incubadas en ausencia (A) o (B) presencia de *Pllans-II* (50 $\mu\text{g/mL}$) por 30 min a 37 °C en medio RPMI suplementado con bFGF (10 ng/mL). Posteriormente, las células fueron sembradas en una cámara de cultivo celular, cubierto con 50 μL de Matrigel (5.25 mg/mL) y mantenido a 37 °C y 5% de CO_2 . Luego de 18 horas de incubación, se tomaron fotografías del cultivo y se cuantificaron tanto el número de vasos (C), como la concentración de VEGF en el sobrenadante del cultivo de células HUVEC (D). Los datos se expresaron como el promedio $\pm$ DE, y los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las diferencias entre los tratamientos y controles fueron analizadas por la prueba t-test no pareada. Estadísticamente significativo a una $***p < 0.0001$.

5. Discusión

Varios tratamientos quirúrgicos locales son suficientes para curar el CCU en etapas tempranas (Oberlin et al., 2011; Echeverri et al., 2016; Sawaya et al., 2016), y en

etapas avanzadas, el tratamiento generalmente combina radioterapia y quimioterapia (ESMO, 2012; Baskar et al., 2012; Miranda et al., 2016;). Desafortunadamente, los pacientes eventualmente se vuelven resistentes a las terapias, debido a que la toxicidad en los tejidos normales limita la cantidad de fármacos que pueden administrarse sistemáticamente, reduciendo la cantidad de fármaco que alcanza eficazmente el tumor (Holohan et al., 2013). Además, este tipo de tratamientos no quirúrgicos pueden causar efectos secundarios muy graves y potencialmente mortales. Por lo tanto, el CCU constituye una enfermedad con un amplio impacto en la salud pública, cuyo control debe priorizarse a través de tratamientos nuevos y efectivos, basados en una supresión más selectiva del crecimiento de las células tumorales.

La búsqueda de agentes anticancerígenos, especialmente de productos naturales se está incrementando, y las toxinas de los venenos de serpiente han demostrado tener un amplio espectro de actividades biológicas. Muchos tipos de svPLA₂ tales como PLA₂s básicas y ácidas poseen actividad antitumoral, inhiben la adhesión celular y la migración, así como propiedades anti-integrinas y anti-angiogénicas (Roberto et al., 2004; Bazaa et al., 2009; Zouari-Kessentini et al., 2009; Kessentini-Zouari et al., 2010; Khunsap et al., 2011; Azevedo et al., 2016; Osipov y Utkin, 2017).

Por lo tanto, en este trabajo se reporta por primera vez una Asp49-PLA₂ ácida y enzimáticamente activa proveniente del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii*, con actividad anticancerígena dosis dependiente sobre células de adenocarcinoma de cuello uterino humano – HeLa e inocuidad tanto en células no tumorigénicas (Figura 30A), como en un modelo animal reportado previamente por Jiménez-Charris et al. (2016). Aunque el Cisplatino® mostró una mayor citotoxicidad que *Pllans II* a dosis más altas contra las células HeLa (Figura 30B), esta proteína parece ser inofensiva sobre células normales humanas (Figura 30C); contrariamente a los muchos efectos secundarios no deseados, exhibidos por la mayoría de los agentes quimioterapéuticos ampliamente utilizados, incluyendo Cisplatino® (Siddik, 2003; Cepeda et al., 2007). Es importante tener en cuenta, que un fármaco quimioterapéutico ideal debería tener mínimos efectos nocivos sobre las células normales (Pabla et al., 2011).

La actividad antitumoral de las svPLA₂s tipo Asp49, podría estar mediada por la interacción con aceptores de PLA₂s u otros receptores endógenos (tales como integrinas) en la membrana plasmática de la célula diana, a través de "sitios farmacológicos" distintos del sitio catalítico de las svPLA₂s (Bazaa et al., 2009; Rodrigues et al., 2009b; Kessentini-Zouari et al., 2010; Osipov y Utkin, 2017). Algunos autores proponen que la actividad enzimática de las svPLA₂s no es absolutamente necesaria para la actividad citotóxica o la inducción de apoptosis sobre líneas celulares tumorales (Gebrim et al., 2009; Samel et al., 2013; de Moura et al., 2014; Osipov y Utkin, 2017). La regulación del ciclo celular y la apoptosis son dos de los mecanismos principales que regulan tanto el crecimiento y la supervivencia celular. La muerte celular por apoptosis, ocurre cuando se detiene la

inducción de puntos de control específicos durante el ciclo celular (Murray, 2004; Lu et al., 2007). En este estudio, se encontró que *Pllans-II* indujo la detención del ciclo celular (Figura 31) y estimuló la muerte celular apoptótica en las células HeLa (Figura 32), como se demostró mediante la tinción de PI y anexina V-FITC, respectivamente.

La apoptosis es un proceso celular programado que ocurre en condiciones fisiológicas y patológicas (Rodríguez y Zhivotovsky, 2006). Sin embargo, la muerte celular programada se interrumpe en el cáncer, lo que conduce al crecimiento excesivo de células malignas (Takeda et al., 2007). La inducción de la apoptosis en las células tumorales, es el objetivo final de muchas terapias contra el cáncer (Hasty y Christy, 2013). La externalización de la fosfatidilserina (PS), como marca distintiva de la apoptosis de la fase temprana, fue analizada usando el marcaje con anexina V y PI. La apoptosis temprana fue el principal estadio de muerte celular detectado en las células HeLa tratadas con *Pllans-II* (Figura 32A), sugiriendo que este proceso es el mecanismo predominante de muerte celular inducido por *Pllans-II* en las células de adenocarcinoma cervical humano.

La externalización de PS en la superficie celular, estimula los receptores de PS de los macrófagos para el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos y por ende la fagocitosis de las células en proceso de muerte (Fadok et al., 2000). Interesantemente, en las células no tumorigénicas MCF 10A no se observaron diferencias significativas en el número de células en apoptosis ni necrosis, al ser pretratadas con *Pllans-II* y luego comparadas con el control (Figura 32B). La posible inocuidad de la proteína experimental se ha probado en otras células no tumorales, como lo demostraron Jiménez-Charris et al. (2016). Por lo tanto, la comparación del efecto antitumoral de agentes anticancerígenos sobre células tumorales y normales, es uno de los primeros pasos para descubrir un posible fármaco potencial en la terapia contra el cáncer.

Además, se investigó la distribución del ciclo celular para apoyar la aparición de la apoptosis en las células cancerosas a través de RNasa A y tinción con yoduro de propidio (Krishan, 1975; Teixeira et al., 2017). En base al análisis por citometría de flujo, se observó que las células HeLa estaban detenidas en la etapa G1, inhibiendo el crecimiento celular o la progresión del cáncer (Figura 31). La detención de las células HeLa en esta etapa del ciclo celular, podría desencadenar la muerte celular por apoptosis, ya que ambos procesos tienden a compartir un conjunto en común de proteínas reguladoras (Pucci et al., 2000). Las proteínas de punto de control (CHK, CDK y CKI) podrían evitar que las células continúen con el ciclo celular y permanezcan en la fase G1. Ante cualquier daño al ADN, las proteínas CKI tienen la capacidad de suspender el ciclo celular y activar los sistemas de reparación.

En caso de que los sistemas de reparación sean incapaces de corregir el daño, se inducen procesos de muerte celular (Douglas y Haddad, 2003). Además, el proceso

de muerte celular por vía apoptótica de las células HeLa se verificó por una reducción significativa en la expresión de BIRC5 (Figura 33), un gen miembro de la familia de genes inhibidores de la apoptosis, que codifica para proteínas reguladoras que previenen la muerte celular apoptótica.

El principal mecanismo de muerte celular que activan las toxinas provenientes de los venenos de serpiente sobre las células cancerígenas, es la vía de muerte celular dependiente de mitocondrias (Attarde y Pandit, 2017). Las proteínas de la familia BCL-2 son componentes clave en la vía de la apoptosis mitocondrial y pueden regular indirectamente la actividad de las caspasas en las vías apoptóticas relacionadas (Ichim y Tait, 2016; Adams y Cory, 2018). La actividad de la *Pllans-II* en las células HeLa, mostró una inducción de muerte celular apoptótica posiblemente desencadenada a través de vías extrínsecas (Figura 33). La vía extrínseca se activa mediante receptores de muerte ubicados en la membrana plasmática, tales como la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (Ichim y Tait, 2016; Adams y Cory, 2018).

Después de la unión al ligando, los receptores de muerte activan algunas caspasas iniciadoras como la caspasa-8 (Ichim y Tait, 2016), cuyo gen CASP8 estuvo sobre-expresado en las células HeLa de nuestra investigación. Esta caspasa es suficiente para inducir la apoptosis, en ausencia de la permeabilización mitocondrial de la membrana externa – MOMP (Tait y Green, 2010). El uso de la vía de muerte extrínseca fue corroborado por un notable aumento de la regulación del gen anti-apoptótico BCL2L1, que contrarresta la baja regulación del gen anti-apoptótico BCL2. Las proteínas codificadas por estos dos genes están relacionadas con la regulación de MOMP, que liberan varias proteínas del espacio intermembrana mitocondrial, lo que contribuye a la activación de la caspasa efectora y la apoptosis (Adams y Cory, 2018). Asimismo, la preferencia por esta vía de muerte se confirmó mediante una reducción significativa en la expresión del gen pro-apoptótico BAX. Un gen donde su proteína promueve la apoptosis, al aumentar la apertura del canal aniónico mitocondrial dependiente del voltaje, lo que conduce a la pérdida del potencial de membrana y a la liberación de citocromo c (Tait y Green, 2010; Ichim y Tait, 2016).

Además de la muerte celular programada, la metástasis del cáncer es uno de los sucesos más importantes responsable de la malignidad tumoral. Comprende una compleja cascada de eventos biológicos que incluye: adhesión celular, invasión a través de las paredes de los vasos y migración dentro de la MEC a sitios remotos, con el establecimiento de un nuevo foco de crecimiento (Hunter et al., 2008). Las integrinas sobre-expresadas en las células tumorales han sido reconocidas como reguladoras clave de este proceso neoplásico (Guo y Giancotti, 2004). La interrupción en dicho proceso, retarda la progresión metastásica, previniendo la

propagación del cáncer. En este estudio, *Pllans-II* mostró la capacidad de interrumpir la migración de las células tumorales (Figura 34), al interferir con las integrinas tipo $\alpha 5$ y $\beta 1$ (Figura 35). Estos resultados son acordes a la acción de otras svPLA₂s tales como la Asp49-PLA₂ ácida, aislada del veneno de *Macrovípera lebetina transmediterránea* que inhibe la migración de diversas células tumorales humanas mediadas por integrinas $\alpha 5 \beta 1$ y αv (Bazaa et al, 2009). Además, dos svPLA₂s ácidas purificadas del veneno de *Cerastes cerastes*, CC-PLA₂-1 y CC-PLA₂-2, también inhibieron la migración de las células HT-1080 usando fibrinógeno y fibronectina como sustrato (Zouari-Kessentini et al, 2009).

La angiogénesis tumoral es otro de los procesos involucrados en la metástasis, en la que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes y representa un paso vital en el cambio de tumores benignos en malignos a través de células endoteliales (Kerbel, 2008; Weis y Cheresch, 2011). Basado en su importancia, la angiogénesis se ha considerado un objetivo atractivo para el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas (Dong et al., 2018). En nuestra investigación, la angiogénesis fue inhibida por *Pllans-II* al usar el ensayo de formación de vasos por HUVEC inducida por bFGF (Figura 36). Interesantemente, la actividad anti-angiogénica de *Pllans-II* probablemente no se deba a ningún efecto citotóxico sobre las células HUVEC. De hecho, el crecimiento de las células endoteliales no se vio afectada por el tratamiento con *Pllans-II* a lo largo de las 24 h de exposición, a las diferentes concentraciones ensayadas (Figura 30A). Las células no se separaron del sustrato durante la prueba y no se observaron restos celulares.

Uno de los reguladores esenciales para este proceso neoplásico es el VEGF, que participa al mismo tiempo en la proliferación, migración y formación tubular de las células endoteliales vasculares (Yamauchi et al., 2007). Sin embargo, se encontró que *Pllans-II* estimula la síntesis de VEGF (Figura 36D); por lo que el mecanismo por el cual esta proteína bloquea la angiogénesis, podría involucrar otros factores pro-angiogénicos que inhiben la formación de nuevos vasos a través de otras vías anti-angiogénicas independientes de la señalización por VEGF. Por lo tanto, los niveles elevados de VEGF podrían estar relacionados con un intento de contrarrestar el efecto anti-angiogénico de *Pllans-II* sobre las células HUVEC, estimulando la formación de vasos por medio de la sobre-expresión de VEGF en el ambiente circundante. La inducción de una vía anti-angiogénica independiente de VEGF ha sido reportada previamente por Yamauchi et al. (2007), donde la trombospondina-1 indujo la expresión de p21 y una forma no fosforilada de Retinoblastoma-Rb, lo que resultó en la detención del crecimiento celular y la inhibición de la angiogénesis en células HUVEC por una nueva vía anti-angiogénica. Raimondi et al. (2014) también describieron la inhibición de la angiogénesis independiente de VEGF, por la activación de la tirosina quinasa ABL1 dependiente de neuropilina 1 en células endoteliales, por la acción de Imatinib, un

medicamento comercial usado para tratar el cáncer.

En resumen, en esta investigación se demostró por primera vez que una Asp49–PLA₂ ácida y enzimáticamente activa del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii*, posee la capacidad de ejercer un efecto citotóxico sobre las células de adenocarcinoma de cuello uterino; mediante la inducción de apoptosis por la vía extrínseca y detención del ciclo celular en la fase G1. Además, *Pllans-II* tiene la capacidad de reducir el potencial de migración de las células HeLa mediante el bloqueo de las integrinas tipo $\alpha 5$ y $\beta 1$, e inhibe la angiogénesis a través de una vía independiente de VEGF. Interesantemente, la actividad citotóxica de *Pllans-II* fue más específica para las células de adenocarcinoma y significativamente más baja contra las líneas celulares no tumorigénicas MCF 10A y HUVEC. En conjunto, nuestros resultados destacan la capacidad de *Pllans-II* no solo para detener la proliferación de las células HeLa, sino también para controlar la propagación de las células de adenocarcinoma de cuello uterino; mostrando un potencial prometedor en el tratamiento del cáncer de cuello uterino. No obstante, podría ser interesante evaluar el efecto de *Pllans-II* sobre la tumorigénesis *in vivo*; sin despreciar una mejor comprensión del mecanismo de muerte celular apoptótico, el potencial de disrupción de la metástasis, y estudios estructurales y funcionales que nos ayuden a explicar la interacción de *Pllans-II* con los receptores de integrina en las células cancerosas.

Conclusiones

En la presente investigación, se caracterizó el veneno de *P. lansbergii lansbergii* proveniente del Departamento del Atlántico, identificando 9 familias de proteínas conocidas: metaloproteinasas, fosfolipasas A₂, desintegrinas, péptidos pequeños, lectina tipo C, serina proteinasas, L-amino ácido oxidasas, CRISP, 5' nucleotidasas, y 3 familias no identificadas previamente en el género *Porthidium*, tales como: svVEGF, fosfolipasas B y fosfodiesterasas. Funcionalmente, el principal mecanismo de inmovilización de la presa por el veneno de la serpiente *P. lansbergii lansbergii* podría ser el sangrado, la generación de la permeabilidad vascular y la extravasación, tanto en el sitio local de la lesión como a nivel sistémico, generando un estado hipovolémico que conlleva a un choque hipovolémico cardiovascular

Además, se caracterizaron dos de sus principales fosfolipasas A₂ tipo Asp49: la *Pllans-I*, una enzima básica heterodimérica con actividad miotóxica y la *Pllans-II*, una enzima ácida monomérica, aparentemente desprovistos de sus efectos tóxicos, pero capaz de aumentar la miotoxicidad de *Pllans-I*.

A su vez, en la búsqueda de nuevas moléculas farmacológicas con actividad anticancerígena, que no generen daños colaterales al tejido sano; se seleccionó a la proteína *Pllans-II* por sus características inocuas, para ser utilizada como prototipo antitumoral. Esta molécula presentó un mayor efecto citotóxico sobre la línea de cáncer de cuello uterino – HeLa, generando un detenimiento del ciclo celular en la fase G1, una muerte celular apoptótica e inhibición de la migración por interferencia de las integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$. Además, la proteína *Pllans-II* tuvo la capacidad de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos sobre las células HUVEC.

Por sus características especiales, *Pllans-II* podría ser empleado como un agente anticancerígeno para el desarrollo de nuevos prototipos antitumorales.

Perspectivas

Los resultados del presente trabajo de investigación representan un avance muy importante en el conocimiento y entendimiento de la composición y efecto biológico tanto del veneno de serpiente *P. lansbergii lansbergii* y sus componentes como posibles agentes farmacológicos. Estos hallazgos estimulan futuras investigaciones, orientadas a estudiar más a fondo el efecto de la proteína *Pllans-II* sobre el cáncer de cuello uterino; para lo cual es necesario:

1. Producir la proteína recombinante *Pllans-II* y re-validar su efecto citotóxico sobre las células de cáncer de cuello uterino y su efecto anti-angiogénico
2. Realizar un análisis metabolómico para determinar el mecanismo antitumoral de *Pllans-II* sobre las células de cáncer cuello uterino
3. Realizar un análisis diferencial en la expresión genética y proteómica inducida por la proteína *Pllans-II* sobre las células de cáncer cuello uterino
4. Evaluar el efecto de la proteína recombinante *Pllans-II* sobre modelos murinos inducidos previamente con el cáncer cuello uterino.

Bibliografía

ACS – American Cancer Society (2016). Cáncer de cuello uterino (cervical). Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino.html>
Consultado el 4 de mayo de 2018.

Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324.

Adams, J. M., & Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell death and differentiation*, 25(1), 27.

Aguayo, F., Anwar, M., Koriyama, C., Castillo, A., Sun, Q., Morewaya, J., & Akiba, S. (2010). Human papillomavirus-16 presence and physical status in lung carcinomas from Asia. *Infectious agents and cancer*, 5(1), 20.

Angulo, Y., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D., Lomonte, B., 2000. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 63–71.

Aird, S. D. (2002). Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*, 40(4), 335–393.

Aird, S. D., Watanabe, Y., Villar-Briones, A., Roy, M. C., Terada, K., & Mikheyev, A. S. (2013). Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC genomics*, 14(1), 790.

Arni, R.K., Ward, R.J., 1996. Phospholipase A₂ – a structural review. *Toxicon* 34, 827–841.

Arni, R. K., Ward, R. J., Gutiérrez, J. M., & Tulinsky, A. (1995). Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystallographica Section D*, 51(3), 311–317.

Attarde, S. S., Pandit, S. V. (2017). Cytotoxic activity of NN-32 toxin from Indian spectacled cobra venom on human breast cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 503.

Ayerbe, S., & Latorre, J. P. (2009). Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico. Popayán, Colombia: Secretaría Departamental de Salud del Cauca.

Azevedo, F. V. P. V., Lopes, D. S., Gimenes, S. N. C., Achê, D. C., Vecchi, L., Alves, P. T., ... & Yoneyama, K. A. G. (2016). Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. *International journal of biological macromolecules*, 82, 671–677.

Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 19, No. 5, pp. 329–337). Academic Press.

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193.

Bazaa, A., Luis, J., Srairi–Abid, N., Kallech–Ziri, O., Kessentini–Zouari, R., Defilles, C., Lissitzky, J. C., El Ayeb, M., Marrakchi, N. (2009). MVL–PLA₂, a phospholipase A₂ from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. *Matrix Biology*, 28(4), 188–193.

Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Angiogenesis: tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401.

Bernardes–Oliveira, E., Gomes, D. L., Martelli Palomino, G., Juvenal Silva Farias, K., da Silva, W. D., Rocha, H. A. O., ... & Crispim, J. C. D. O. (2016). *Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* Snake Venoms Promote Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis via the Mitochondrial Depolarization of Cervical Cancer Cells. *Evidence–Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.

Bernheimer, A. W., Linder, R., Weinstein, S. A., & Kim, K. S. (1987). Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*. *Toxicon*, 25(5), 547–554.

Bogarín, G., Morais, J. F., Yamaguchi, I. K., Stephano, M. A., Marcelino, J. R., Nishikawa, A. K., ... & Gutiérrez, J. M. (2000). Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon*, 38(10), 1429–1441.

Brglez, V., Lambeau, G., & Petan, T. (2014). Secreted phospholipases A₂ in cancer: diverse mechanisms of action. *Biochimie*, 107, 114–123.

Burkhart, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 671.

Bustillo, S., García–Denegri, M.E., Gay, C., Van de Velde, A.C., Acosta, O., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Leiva, L., 2015. Phospholipase A₂ enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chem–Biol. Interactions* 240, 30–36.

- Bustillo, S., Gay, C.C., García Denegri, M.E., Ponce-Soto, L.A., Bal de Kier Joffe, E., Acosta, O., Leiva, L.C., 2012. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA₂ from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon* 59, 338–343.
- Calderón, L. A., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., de Moura, A., Grabner, A. N., Mazzi, M. V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C. F. C., Zuliani, J. P., Carvalho, B. M. A., da Silva, S. L., Stábeli, R. G., Soares, A. M. (2014). Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International*, 2014, 1–19.
- Calvete, J. J. (2011). Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert review of proteomics*, 8(6), 739–758.
- Calvete, J. J., Juárez, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of mass spectrometry*, 42(11), 1405–1414.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS letters*, 583(11), 1736–1743.
- Camacho, E., Villalobos, E., Sanz, L., Pérez, A., Escalante, T., Lomonte, B., ... & Rucavado, A. (2014). Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie*, 101, 145–155.
- Campbell, J. A., & Lamar, W. W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Pérez, J. M. (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7(1), 3–18.
- Chaudary, N., Pintilie, M., Jelveh, S., Lindsay, P., Hill, R. P., & Milosevic, M. (2017). Plerixafor improves primary tumor response and reduces metastases in cervical cancer treated with radio-chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 23(5), 1242–1249.
- Cintra-Francischinelli, M., Pizzo, P., Rodrigues-Simioni, L., Ponce-Soto, L., Rossetto, O., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Pozzan, T., Montecucco, C., 2009. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1718–1728.
- Cirino, G., Peers, S.H., Wallace, J.L., Flower, R.J., 1989. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.* 166, 505–510.

Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Munoz, N., & Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British journal of cancer*, 88(1), 63–73.

Cura, J. E., Blanzaco, D. P., Brisson, C., Cura, M. A., Cabrol, R., Larrateguy, L., Mendez, C., Sechi, J. C., Silveira, J. S., Theiller, E., de Roodt, A. R. (2002). Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*, 8(4), 1033–1041.

de Araújo, A. L., & Radvanyi, F. (1987). Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon*, 25(11), 1181–1188

de Carvalho, D. D., Schmitmeier, S., Novello, J. C., Markland, F. S. (2001). Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon*, 39(10), 1471–1476.

de Moura, A., Kayano, A. M., Oliveira, G. A., Setúbal, S. S., Ribeiro, J. G., Barros, N. B., Nicolete, R., Moura, L. A., Fuly, A. L., Nomizo, A., da Silva S. L., Fernandes, C. F. C., Zuliani, J. P., Stábeli, R. G., Soares, A. M., Calderon, L. A. (2014). Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom with toxicity against Leishmania and tumor cells. *BioMed research international*, 2014.

de Oliveira Guimarães, D., Lopes, D. S., Azevedo, F. V. P. V., Gimenes, S. N. C., Silva, M. A., Achê, D. C., Rocha Gomes, M. S., Vecchi, L., Goulart, L. R., Yoneyama, K. A. G., Santos Rodrigues, R., Rodrigues de Melo, V. (2017). In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. *International journal of biological macromolecules*, 97, 770–777.

de Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 17(8), 457.

Desgrosellier, J. S., & Cheresch, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 9.

Doley, R., Zhou, X., Kini, R.M., 2010. Snake venom phospholipase A₂ enzymes. In: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, Mackessy, S.P., (Ed.), CRC Press: Boca Raton, USA, pp. 173–205.

Dong, J., Saunders, D., Silasi-Mansat, R., Yu, L., Zhu, H., Lupu, F., Towner, R., Dong, Y., Chen, H. (2018). Therapeutic efficacy of a synthetic epsin mimetic peptide in glioma tumor model: uncovering multiple mechanisms beyond the VEGF-associated tumor angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology*, 1–11.

dos Santos, J.I., Cintra–Francischinelli, M., Borges, R.J., Fernandes, C.A.H., Pizzo, P., Cintra, A.C.O., Braz, A.S.K., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., 2011. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. *Proteins* 79, 61–78.

Douglas, R. M., Haddad, G. G. (2003). Invited review: effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest. *Journal of Applied Physiology*, 94(5), 2068–2083.

Dunne, E. F., Unger, E. R., Sternberg, M., McQuillan, G., Swan, D. C., Patel, S. S., & Markowitz, L. E. (2007). Prevalence of HPV infection among females in the United States. *Jama*, 297(8), 813–819.

Echeverri, L., López, C., Rendón, G. J., Ángel, G., & Pareja, R. (2016). Traquelectomía radical laparoscópica en pacientes con cáncer de cuello uterino en estado IB1 en el Instituto de Cancerología–Las Américas, Medellín, Colombia. *REV Chil Obstet Ginecol*, 81(1), 38–43.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.

Erzurumlu, Y., Petras, D., Goçmen, B., Hempel, B. F., Heiss, P., Yildiz, M. Z., Süßmuth, R. D., Nalbantsoy, A. (2017). Apoptotic Effects of Mount Bulgar Viper (*Montivipera bulgardaghica*) PLA₂ and SVMPS Venom Peptide fractions on HeLa and A549 Cancer Cells. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 1(10), 1049.

Escobar, J., & Fuentes, G. (2004). Manejo del accidente ofídico. Barranquilla–Colombia: Protocolos de la Universidad del Norte.

ESMO (2012). Cáncer de cuello uterino: una guía para pacientes – Basada en la Guía de Práctica Clínica de la ESMO – v. 2012.1

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. B., & Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine–specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405(6782), 85.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893–2917.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Maxwell Parkin, D., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5) E359 – E386.

Fernández, J., Gutiérrez, J. M., Angulo, Y., Sanz, L., Juárez, P., Calvete, J. J., & Lomonte, B. (2010). Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. *Biochimie*, 92(3), 273–283.

Ferreira, S. H., Bartelt, D. C., & Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 9(13), 2583–2593.

Finney, D. J. Statistical methods in biological assay, 1978. London: Charles Griffin.

Fox, J. W., Ma, L., Nelson, K., Sherman, N. E., & Serrano, S. M. (2006). Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*, 47(6), 700–714.

Fox, J. W., & Serrano, S. M. (2008). Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*, 8(4), 909–920.

Fry, B. G., & Wüster, W. (2004). Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Molecular biology and evolution*, 21(5), 870–883.

Garcia Denegri, M.E., Acosta, O.C., Huancahuire–Vega, S., Martins–de–Souza, D., Marangoni, S., Maruñak, S.L., Teibler, G.P., Leica, L.C., Ponce–Soto, L.A., 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 56, 64–74.

Gebrim, L. C., Marcussi, S., Menaldo, D. L., de Menezes, C. S., Nomizo, A., Hamaguchi, A., Silveira–Lacerda, E. P., Homsí–Brandeburgo, M. I., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. (2009). Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2–like BthTX–I and a synthetic peptide derived from its C–terminal region. *Biologicals*, 37(4):222–9.

Gené, J., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J., & Cerdas, L. (1989). Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27(8), 841–848.

Gimenes, S. N., Lopes, D. S., Alves, P. T., Azevedo, F. V., Vecchi, L., Goulart, L. R., Rodrigues, T. C. S., Santos, A. L., Brites, V., Teixeira, T. L., Silva, C. V., Dias, M. H., Teixeira, S., C., Santos Rodrigues, R., Yoneyama, K. A. G., Oliveira, R. A., Rodrigues de Melo, V. (2017). Antitumoral effects of γCdcPLI, a PLA₂ inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA–MB–231 breast cancer cell. *Scientific Reports*, 7, 7077.

Giraud, E., Inoue, M., & Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 114(5), 623–633.

Girón, M. E., Estrella, A., Sánchez, E. E., Galán, J., Tao, W. A., Guerrero, B., ... & Rodríguez-Acosta, A. (2011). Purification and characterization of a metalloproteinase, Porthidin-1, from the venom of Lansberg's hog-nosed pitvipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*). *Toxicon*, 57(4), 608–618.

GLOBOCAN. (2012) Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Colombia. [Online]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx Citado: Junio 1 de 2018.

Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., Giri, B., ... & Gomes, A. (2010). Anticancer potential of animal venoms and toxins.

Greshock, J., Nathanson, K., Martin, A. M., Zhang, L., Coukos, G., Weber, B. L., & Zaks, T. Z. (2007). Cancer cell lines as genetic models of their parent histology: analyses based on array comparative genomic hybridization. *Cancer research*, 67(8), 3594–3600.

Guo, W., & Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(10), 816.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A₂: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., & Cerdas, L. (1986). Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon*, 24(9), 885–894.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., Cerdas, L., 1986a. Pharmacological activities of a toxic phospholipase a isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comparative Pharmacology* 84, 159–164.

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*, 86(3), 353–364.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646–674.

Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*, 13(4), 215.

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714–726.

Hulkower, K. I., & Herber, R. L. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*, 3(1), 107–124.

Ichim, G., Tait, S. W. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539.

Jaisamrarn, U., Castellsagué, X., Garland, S. M., Naud, P., Palmroth, J., Del Rosario-Raymundo, M. R., ... & Teixeira, J. C. (2013). Natural history of progression of HPV infection to cervical lesion or clearance: analysis of the control arm of the large, randomised PATRICIA study. *PLoS One*, 8(11), e79260.

Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F., Fierro, L., Lomonte, B. (2015). Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of proteomics*, 114, 287–299.

Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Castro-Herrera, F., Fierro-Pérez, L., & Lomonte, B. (2016). Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A₂ in the venom of the snake *Porthidium lansbergii lansbergii*. *Toxicon*, 119, 289–298.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275–282.

Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Sherman, N., & Fox, J. W. (2000). Mass spectrophotometric evidence for P-III/P-IV metalloproteinases in the venom of the Boomslang (*Dispholidus typus*). *Toxicon*, 38(11), 1613–1620.

Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 12.

Kazerounian, S., Yee, K. O., & Lawler, J. (2008). Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cellular and molecular life sciences*, 65(5), 700.

Kele Arruda Macedo, J., W Fox, J., & de Souza Castro, M. (2015). Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. *Current protein and peptide science*, 16(6), 532–548.

Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *New England Journal of Medicine*, 358(19), 2039–2049.

Kessentini–Zouari, R., Jebali, J., Taboubi, S., Srairi–Abid, N., Morjen, M., Kallech–Ziri, O., Bezzine, S., Marvaldi, J., El Ayeb, M., Marrakchi, N., Luis, J. (2010). CC–PLA₂–1 and CC–PLA₂–2, two *Cerastes cerastes* venom–derived phospholipases A₂, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo. *Laboratory Investigation*, 90(4), 510–519.

Khunsap, S., Pakmanee, N., Khow, O., Chanhom, L., Sitprija, V., Suntravat, M., Lucena, S. E., Perez, J. C., Sánchez, E. E. (2011). Purification of a phospholipase A₂ from *Daboia russelii siamensis* venom with anticancer effects. *Journal of venom research*, 2, 42–51.

Kim, Y. W., Chaturvedi, P. K., Chun, S. N., Lee, Y. G., & Ahn, W. S. (2015). Honeybee venom possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer cell line. *Oncology reports*, 33(4), 1675–1682.

Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*, 42(8), 827–840.

Kini, R.M. (2005). Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. *Toxicon* 45, 1147–1161.

Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology*, 66(1), 188–193.

Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(7), 393.

Landucci, E.C.T., Toyama, M., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., de Nucci, G., 2000. Effect of crotoxin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 38, 199–208.

Liga contra el cáncer, Cáncer de cuello uterino.
<https://www.ligacontraelcancer.com.co/cancer-de-cuello-uterino/>, 2018
(Consultado: Mayo 18 de 2018).

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402–408.

Lloret, S., Moreno, J.J., 1993. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* 31, 949–956.

Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of Lysine–49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.

Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P., Gutiérrez, J.M., 1999. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon* 37, 145–158.

Lomonte, B., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., 2009. The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: Biological activities and their possible adaptive roles. *Protein Pept. Lett.* 16, 860–876.

Lomonte, B., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2014). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *Journal of proteomics*, 105, 323–339.

Lomonte, B., Furtado, M.F., Rovira, M.E., Carmona, E., Rojas, G., Aymerich, R., Gutiérrez, J.M., 1990. South American snake venom proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23, 427–435.

Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27, 725–733.

Lomonte, B., Kahan, L., 1988. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. *Toxicon* 26, 675–689.

Lomonte, B., Moreno, E., Gutiérrez, J.M., 1987. Detection of proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxin in crotaline snake venoms. *Toxicon* 25, 947–955.

Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520–530.

Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W. C., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*,

Porthidium ophryomegas, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: toxicological and taxonomical insights. *Journal of proteomics*, 75(5), 1675–1689.

Lomonte, B., Tarkowski, A., & Hanson, L. Å. (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom. *Inflammation*, 17(2), 93–105.

Lomonte, B., Tsai, W. C., Ureña–Díaz, J. M., Sanz, L., Mora–Obando, D., Sánchez, E. E., ... & Calvete, J. J. (2014). Venomics of New World pit vipers: genus–wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. *Journal of proteomics*, 96, 103–116.

López–Johnston, J. C., de Bosch, N., Scannone, H., & Rodríguez–Acosta, A. (2007a). Inhibition of adrenaline and adenosine diphosphate induced platelet aggregation by Lansberg's hognose pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom. *Annals of hematology*, 86(12), 879–885.

López–Johnston, J. C., de Bosch, N., Scannone, H., & Rodríguez–Acosta, A. (2007b). Inhibition of collagen, and thrombin–induced platelet aggregation by Lansberg's hognose pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 24(3), 275–282.

Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307.

Lu, Y. J., Yang, S. H., Chien, C. M., Lin, Y. H., Hu, X. W., Wu, Z. Z., Wu, M. J., Lin, S. R. (2007). Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a novel enediyne derivative, THDB, in chronic myeloid leukemia (HL–60) cells. *Toxicology in vitro*, 21(1), 90–98.

Magro, A.J., Murakami, M.T., Marcussi, S., Soares, A.M., Arni, R.K., Fontes, M.R., 2004. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 323, 24–31.

Margres, M. J., Aronow, K., Loyacano, J., & Rokyta, D. R. (2013). The venom–gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC genomics*, 14(1), 531.

Marques, P.P., Esteves, A., Lancellotti, M., Ponce–Soto, L.A., Marangoni, S., 2015. Novel acidic phospholipase A₂ from *Porthidium hyoprora* causes inflammation with mast cell rich infiltrate. *Biochem. Biophys. Reports* 1, 78–84.

Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*, 3(11), e442.

Menin, L., Perchuć, A., Favreau, P., Perret, F., Michalet, S., Schöni, R., ... & Stöcklin, R. (2008). High throughput screening of bradykinin–potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon*, 51(7), 1288–1302.

Miranda, M. O., Pinho, D. F., Wardak, Z., Albuquerque, K., & Pedrosa, I. (2016). Resonancia magnética en la planificación de la braquiterapia intracavitaria para el tratamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado. *Radiología*, 58(1), 16–25.

Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912.

Mora–Obando, D., Díaz, C., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2014a. Role of enzymatic activity in muscle damage and cytotoxicity induced by *Bothrops asper* Asp49 phospholipase A₂ myotoxins: are there additional effector mechanisms involved? *PeerJ* 2:e569; DOI 10.7717/peerj.569

Mora–Obando, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2014b. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 9, e109846. doi: 10.1371/journal.pone.0109846.

Mora–Obando, D., Guerrero–Vargas, J. A., Prieto–Sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., ... & Lomonte, B. (2014). Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of proteomics*, 96, 159–172.

Mora, R., Valverde, B., Díaz, C., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2005). A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon*, 45(5), 651–660.

Moura–da–Silva, A.M., Cardoso, D.F., Tanizaki, M., 1990. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon* 28, 1293–1304.

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V.,... & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–527

Muñoz, N., & Bravo, L. E. (2012). Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *Colomb. Med.* 43(4) 298–304.

Muñoz, N., & Bravo, L. E. (2014). Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *Salud pública de México*, 56(5), 431–439.

Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116(2), 221–234.

NIH – Instituto Nacional de Cancer. (2016). Tratamiento del cáncer de cuello uterino (PDQ®) –Versión para profesionales de salud. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuellouterino/pro/tratamiento-cuello-uterino-pdq> Consultado: Mayo 05 de 2018

Oberlin, O., Martelli, H. (2011). Enfermedades benignas del ovario y tumores malignos de ovario, útero y vagina en la niña y en la adolescente. *EMC–Ginecología–Obstetricia*, 47(1), 1–8.

Organización Mundial de la Salud. (2005). Unión Internacional contra el Cáncer. Acción mundial contra el cáncer. Berna–OMS: p 1–14.

Orth, J. D., Loewer, A., Lahav, G., & Mitchison, T. J. (2012). Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Molecular biology of the cell*, 23(4), 567–576.

Osipov, A.V., Utkin, Y. N. (2017). Antiproliferative effects of snake venom phospholipases A₂ and their perspectives for cancer treatment. In: Cruz, L., Luo, S. (eds) *Toxins and Drug Discovery. Toxinology*. Springer, Dordrecht.

Otero, R. (2014). Envenenamiento Ofídico. In: Correa, J.A., Gómez, J.F., Posada, R., editors. *Fundamentos de Pediatría (Tomo V)*. Medellín: Fondo Editorial CIB. p. 73–119.

Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M. B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J. L., ... & Caro, E. (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40(8), 1107–1114.

Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Díaz, A., & Saldarriaga, M. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia*, 15(1), 05–15.

Otero, R., Tobón, G. S., Gómez, L. F., Osorio, R., Valderrama, R., & Hoyos, D. (1992). Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989–febrero de 1990) *Acta Méd Colomb*, 17, 229–249.

Ouchterlony, Ö., Nilsson, L.Å., 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M. (Ed.), Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 19.1–19.44.

Pabla, N., Dong, G., Jiang, M., Huang, S., Kumar, M. V., Messing, R. O., Dong, Z. (2011). Inhibition of PKC δ reduces cisplatin–induced nephrotoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy in mouse models of cancer. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2709–2722.

Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro–Cerdá, J., Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II– (115–129) – peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253, 452–461.

Paredes, A. E. (2012). Informe del evento accidente ofídico final año 2012. Vigilancia y Control en Salud Pública. Colombia: Instituto Nacional de Salud.

Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2(4), 291–299.

Raimondi, C., Fantin, A., Lampropoulou, A., Denti, L., Chikh, A., Ruhrberg, C. (2014). Imatinib inhibits VEGF–independent angiogenesis by targeting neuropilin 1–dependent ABL1 activation in endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 211(6), 1167–1183.

Ramos, J., Veliz, D., Brema, A., & Irausquín, J. (2010). Efecto de la toxicidad in vivo e in vitro del veneno de *Porthidium Lansbergii Rozei*. *Comunidad y Salud*, 8(1), 025–031.

Rathinam, R., & Alahari, S. K. (2010). Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(1), 223–237.

Reid P. (2010). Crotoxin administration for cancer treatment and pain relief. United States Patent Application Publication, 1–4.

Roberto, P. G., Kashima, S., Marcussi, S., Pereira, J. O., Astolfi–Filho, S., Nomizo, A., ... & França, S. C. (2004). Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. *The protein journal*, 23(4), 273–285.

Rodríguez, A. C., Schiffman, M., Herrero, R., Wacholder, S., Hildesheim, A., Castle, P. E., ... & Burk, R. (2008). Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(7), 513–517.

Rodríguez–Nieto, S., Zhivotovsky, B. (2006). Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment. *Current pharmaceutical design*, 12(34), 4411–4425.

Rodrigues, R. S., da Silva, J. F., França, J. B., Fonseca, F. P., Otaviano, A. R., Silva, Hamaguchi, A., Magro, A. J., Braz, A. S., dos Santos, J. L., Homsí–Brandeburgo, M. I., Fontes, M., Fuly, A. L., Soares, A. M., Rodrigues, V. M. (2009a). Structural and functional properties of Bp–LAAO, a new L–amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie*, 91(4), 490–501.

Rodrigues, R. S., Izidoro, L. F. M., De Oliveira, J. R., Robson, J., Sampaio, S. V., Soares, A. M., & Rodrigues, V. M. (2009). Snake venom phospholipases A₂: a new class of antitumor agents. *Protein and peptide letters*, 16(8), 894–898.

Rosenberg, P. (1986). The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: *Natural Toxins* (Harris, J.B., Ed.), pp.129–174. Oxford, Clarendon Press.

Rossetto, O. and Montecucco, C., 2007. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. *Handb. Exp. Pharmacol.* 184, 129–170.

Rokyta, D. R., Wray, K. P., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., & Caudle, S. B. (2011). A high–throughput venom–gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. *Toxicon*, 57(5), 657–671.

Salazar–Valenzuela, D., Mora–Obando, D., Fernández, M. L., Loaiza–Lange, A., Gibbs, H. L., & Lomonte, B. (2014). Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon*, 90, 15–25.

Samel, M., Vija, H., Kurvet, I., Künnis–Beres, K., Trummal, K., Subbi, J., Kahru, A., Siigur, J. (2013). Interactions of PLA₂–s from *Vipera lebetina*, *Vipera berus berus* and *Naja naja oxiana* venom with platelets, bacterial and cancer cells. *Toxins*, 5(2), 203–223.

Sánchez, E. E., Rodríguez–Acosta, A., Palomar, R., Lucena, S. E., Bashir, S., Soto, J. G., Pérez, J. C. (2009). Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK–Mel–28 cell adhesion. *Archives of toxicology*, 83(3), 271–279.

Sarray, S., Luis, J., El Ayeb, M., & Marrakchi, N. (2013). Snake venom peptides: Promising molecules with anti–tumor effects. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. InTech.

Sawaya, G. F., Smith–McCune, K. (2016). Detección de Cáncer de Cuello Uterino. *Obstet Gynecol*, 127, 459–67.

Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 250, 1541–1546.

Serrano, S. M., Shannon, J. D., Wang, D., Camargo, A., & Fox, J. W. (2005). A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*, 5(2), 501–510.

Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265–7279.

Silveira, L.B., Marchi–Salvador, D.P., Santos–Filho, N.A., Silva Jr., F.P., Marcussi, S., Fuly, A.L., Nomizo, A., da Silva, S.L., Stábéli, R.G., Arantes, E.C., Soares, A.M., 2013. Isolation and expression of a hypotensive and anti–platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 73, 35–43.

Smith–McCune, K. K., & Weidner, N. (1994). Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer research*, 54(3), 800–804.

Šribar, J., Križaj, I., 2011. Secreted phospholipases A₂ – not just enzymes. *Acta Chim. Slov.* 58, 678–688.

Stábéli, R. G., Amui, S. F., Sant'Ana, C. D., Pires, M. G., Nomizo, A., Monteiro, M. C., Romão, P. R. T., Guerra–Sá, R., Vieira, C. A., Giglio, J. R., Fontes, M. R., Soares, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin–II, a Lys49–phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(3–4), 371–381.

Suzuki, A., Matsueda, E., Yamane, T., Ashida, T., Kihara, H., Ohno, M., 1995. Crystal structure analysis of phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake) venom at 1.5 resolution. *J. Biochem.* 117, 730–740.

Tait, S. W., Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 621.

Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome biology*, 8(5), 215.

Takahashi, H., Hattori, S., Iwamatsu, A., Takizawa, H., & Shibuya, M. (2004). A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces

vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor–1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46304–46314.

Takeda, K., Stagg, J., Yagita, H., Okumura, K., Smyth, M. J. (2007). Targeting death–inducing receptors in cancer therapy. *Oncogene*, 26(25), 3745–3757.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

Teixeira, C. F. P., Landucci, E. C. T., Antunes, E., Chacur, M., & Cury, Y. (2003). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon*, 42(8), 947–962.

Teixeira, S. C., Lopes, D. S., Gimenes, S. N. C., Teixeira, T. L., Da Silva, M. S., da Luz, F. A. C., ... & dos Santos, M. A. (2017). Mechanistic insights into the anti–angiogenic activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its potential impact on the onset of chagasic cardiomyopathy. *Scientific reports*, 7, 44978.

Theakston, R. D. G., & Reid, H. A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the world health organization*, 61(6), 949.

Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292.

Vale, C., Tierney, J. F., Stewart, L. A., Brady, M., Dinshaw, K., Jakobsen, A., ... & Chen, H. (2008). Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta–Analysis Collaboration: Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta–analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol*, 26, 58025812.

Van der Laat, M., Fernández, J., Durban, J., Villalobos, E., Camacho, E., Calvete, J. J., Lomonte, B., 2013. Amino acid sequence and biological characterization of BlatPLA₂, a non–toxic acidic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis lateralis* from Costa Rica. *Toxicon* 73, 71–80.

Vargas, A., Finol, H., Girón, M., Scannone, H., Fernández, I., & Rodríguez–Acosta, A. (2011). Effects of Lansberg’s Hognose pit vipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom on renal ultrastructure in experimental mice. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(1), 01–06.

Vargas, L. J., Londoño, M., Quintana, J. C., Rua, C., Segura, C., Lomonte, B., & Núñez, V. (2012). An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(4), 341–347.

Vidi, P. A., Bissell, M. J., & Lelièvre, S. A. (2013). Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. *Methods Mol. Biol.* 945, 193–219.

Wagstaff, S. C., Favreau, P., Cheneval, O., Laing, G. D., Wilkinson, M. C., Miller, R. L., ... & Harrison, R. A. (2008). Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*, 365(4), 650–656.

Wang, W. J., Shih, C. H., & Huang, T. F. (2004). A novel PI class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkistlysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(1), 224–230.

Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine*, 17(11), 1359.

Wiesner, C., Tovar, S., Piñeros, M., Cendales, R., & Murillo, R. (2009). La oferta de servicios para tamización de cáncer de cuello uterino en Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*, 13(3), 134–144.

Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11–22.

Yamauchi, M., Imajoh-Ohmi, S., Shibuya, M. (2007). Novel antiangiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle. *Cancer science*, 98(9), 1491–1497.

Yue, P. Y., Leung, E. P., Mak, N. K., & Wong, R. N. (2010). A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *Journal of biomolecular screening*, 15(4), 427–433.

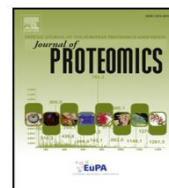
Zouari-Kessentini, R., Luis, J., Karray, A., Kallech-Ziri, O., Srairi-Abid, N., Bazaa, A., Loret, E., Bezzine S., El Ayeb, M., Marrakchi, N. (2009). Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. *Toxicon*, 53(4), 444–453.

Anexos (Artículos publicados en revistas Internacionales)

Paper 1: Proteomic and functional analyses of the venom of Porthidium lansbergii lansbergii (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia



Eliécer Jiménez-Charris^a, Leonel Montealegre-Sanchez^a, Luis Solano-Redondo^b,
Diana Mora-Obando^d, Erika Camacho^d, Fernando Castro-Herrera^b,
Leonardo Fierro-Pérez^c, Bruno Lomonte^{d,*}

^aGrupo de Nutrición, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

^bGrupo Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle, Cali, Colombia

^cGrupo Farmacología Univalle, Universidad del Valle, Cali, Colombia

^dInstituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2014

Accepted 14 November 2014

Keywords:

Snake venom

Venomics

Toxicity

Porthidium lansbergii lansbergii

ABSTRACT

The venom of the Lansberg's hognose pitviper, *Porthidium lansbergii lansbergii*, a species found in the northern region of Colombia, is poorly known. Aiming to increase knowledge on *Porthidium* species venoms, its proteomic analysis and functional evaluation of *in vitro* and *in vivo* activities relevant to its toxicity were undertaken. Out of 51 protein components resolved by a combination of RP-HPLC and SDS-PAGE, 47 were assigned to 12 known protein families. In similarity with two previously characterized venoms from species within this genus, *Porthidium nasutum* and *Porthidium ophryomegas*, that of *P. lansbergii lansbergii* was dominated by metalloproteinases, although in lower proportion. A common feature of the three *Porthidium* venoms appears to be a high content of disintegrins. Proteins not previously observed in *Porthidium* venoms belong to the vascular endothelium growth factor, phosphodiesterase, and phospholipase B families. *P. lansbergii lansbergii* venom showed relatively weak lethal activity to mice, and induced a moderate local myotoxicity, but considerable hemorrhage. Its isolated VEGF component showed potent edema-inducing activity in the mouse footpad assay. Significant thrombocytopenia, but no other major hematological changes, were observed in envenomed mice. *In vitro*, this venom lacked coagulant effect on human plasma, and induced a potent inhibition of platelet aggregation which was reproduced by its purified disintegrin components. Phospholipase A₂ and proteolytic activities were also demonstrated. Overall, the compositional and functional data herein described for the venom of *P. lansbergii lansbergii* may contribute to a better understanding of envenomings by this pitviper species, for which specific clinical information is lacking.

Biological significance

Porthidium lansbergii lansbergii is estimated to be responsible for nearly 20% of snakebite envenoming cases at the Atlantic Department of Colombia, but the identity and functional

* Corresponding author at: Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica.
E-mail address: bruno.lomonte@ucr.ac.cr (B. Lomonte).

properties of its venom components are largely unknown. This study provides the first combined proteomic and functional analyses of the venom of this pitviper, which may contribute to a better understanding of the features of envenomings by this species.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Neotropical snake genus *Porthidium* includes nine species, commonly referred to as 'hognose' pitvipers, found in lowland tropical forests from southern Mexico southward through Central America to northwestern South America, including Ecuador, Venezuela, and Colombia [1]. Two of these species are found in Colombia: *Porthidium nasutum* in the Pacific region, and *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose pitviper) in the Caribbean region [2]. The latter, locally known as 'patoco' or 'patoquilla', is a small terrestrial species, reaching up to 90 cm in length. It has nocturnal habits and spends most of the time among leaf litter or under fallen logs. It feeds on lizards, frogs and small rodents, and inhabits arid and semi-arid lands and humid zones of the Caribbean region to the Magdalena River Valley, from low elevations up to 1400 m above sea level [1,2].

Information on the venoms of *P. lansbergii* subspecies is scarce. The venom of *Porthidium lansbergii rozei* from Venezuela was reported to possess hemorrhagic, myotoxic, phospholipase A₂ (PLA₂), and proteolytic activities [3]. *Porthidium lansbergii hutmanni* venom showed inhibition of platelet aggregation, edema-forming, fibrinolytic, and hemorrhagic activities, and a 23 kDa metalloproteinase (Porthidin-1) has been isolated [4–6]. In contrast, the venom of *P. lansbergii lansbergii* has not been characterized, despite the epidemiological relevance of this species in the Atlantic Department of Colombia, where it is responsible for an estimated 20% of snakebite envenoming cases [7]. Moreover, clinical features of envenomings by this species have not been specifically discussed in the medical literature [8,9].

A growing number of in-depth analyses on the protein composition of snake venoms are leading to a better understanding of their diverse toxicological profiles and effects. Moreover, such information is providing new insights into the evolutionary relationships of snake species and the diversification of their toxic arsenals [10–12]. However, little is known on the venoms of the various species and subspecies that constitute the genus *Porthidium*. A previous study analyzed the venom proteomes of *P. nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* (currently *Cerrophidion sasai*), the latter species being previously classified within the genus *Porthidium* [13]. The observed composition of their venoms was in agreement with the current hypothesis about the phylogenetic relationship between these species, by revealing the divergent profile in *C. godmani* as compared to the similarity between the two *Porthidium* species [13]. Thus, 'venomics' analyses may provide potentially useful information on the relationships between closely related snake taxa, as also illustrated by a recent report on the venom of *Bothrops ayerbeii*, a newly described species from Colombia that used to be considered a variant form of *Bothrops asper* [14]. In an effort to expand knowledge on venoms of the genus *Porthidium*, the present study describes the first analysis of the venom of *P.*

lansbergii lansbergii from Colombia, reporting its proteomic and functional profiles.

2. Materials and methods

2.1. Snake venoms

Venom was obtained from three adult specimens of *P. lansbergii lansbergii*. Two snakes were found near Villa LEJO farm, in Juan de Acosta town (~10°49'05.31"N, 75°00'09.59"W; 97 m asl), and one at Campeche village, close to Baranoa town (~10°43'29.22"N, 74°54'48.95"W; 106 m asl), at the Atlantic Department, Colombia (Fig. 1). Snakes were released after collection of samples of their venoms, which were centrifuged to remove debris, dried in a vacuum centrifuge, and stored at -20 °C. In some assays, a venom pool obtained from *P. nasutum* adults from Costa Rica (provided by Instituto Clodomiro Picado, University of Costa Rica) was included for comparative purposes.



Fig. 1 – (A) Morphology of a specimen of *Porthidium lansbergii lansbergii* collected in Juan de Acosta, Atlantic Department, at 97 m above sea level (red dot in map), and (B) geographic distribution of this species in Colombia, indicated in green shade. Photograph by Luis Manuel Solano.

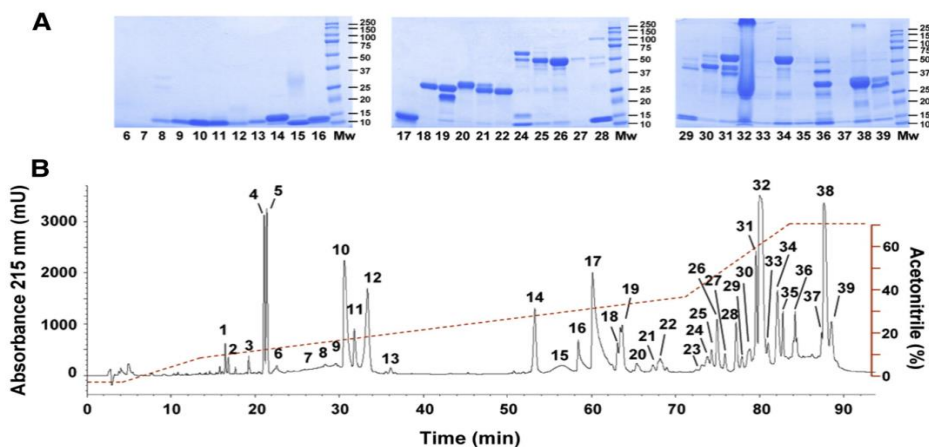


Fig. 2 – Separation of *Porthidium lansbergii lansbergii* venom proteins by RP-HPLC, followed by SDS-PAGE. Two mg of venom were fractionated on a C_{18} column (B) and eluted with an acetonitrile gradient (dashed line), as described in Methods. Fractions were further separated by SDS-PAGE under reducing conditions (A). Molecular weight markers (Mw) are indicated in kDa. Coomassie-stained bands were excised, digested in-gel with trypsin and subjected to MALDI-TOF/TOF or nESI-MS/MS analysis for assignment to protein families, as shown in Table 1.

2.2. Reverse-phase HPLC and SDS-PAGE

Venom composition was analyzed following the 'snake venomomics' strategy [15] with slight modifications [16]. A venom pool was prepared by mixing equal amounts (dry weight) of samples from the three *P. lansbergii lansbergii* specimens. Venom (2 mg) was dissolved in 200 μ l of water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA; solution A) and subjected to reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C_{18} column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m particle; Teknokroma) using an Agilent 1200 chromatograph. Elution was performed at 1 ml/min by applying a gradient towards solution B (acetonitrile, containing 0.1% TFA), as follows: 0% B for 5 min, 0–15% B over 10 min, 15–45% B over 60 min, 45–70% B over 10 min, and 70% B over 9 min [16]. Fractions were collected manually, dried in a vacuum centrifuge, and further separated by SDS-PAGE under reducing conditions (5% 2-mercaptoethanol at 100 $^{\circ}$ C for 5 min), using 12% gels. Relative protein abundances were estimated by integration of peak signals at 215 nm using ChemStation[®] software (Agilent). When a peak from HPLC contained two or more SDS-PAGE bands, their relative distribution was estimated by densitometry using the ImageLab[®] software (Bio-Rad).

2.3. Characterization of RP-HPLC venom fractions

Protein bands were excised from Coomassie blue R-250-stained gels and subjected to reduction (10 mM dithiothreitol) and alkylation (50 mM iodoacetamide), followed by overnight in-gel digestion with sequencing grade bovine trypsin (in 50 mM ammonium bicarbonate) at 37 $^{\circ}$ C. Tryptic peptides were extracted with 50% acetonitrile containing 1% TFA, and analyzed by MALDI-TOF-TOF on an AB4800-Plus Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Peptides were mixed with an

equal volume of saturated α -cyano-hydroxycinnamic acid (in 50% acetonitrile, 0.1% TFA), and spotted (1 μ l) onto an Opti-TOF 384-well plate, dried, and analyzed in positive reflector mode. TOF spectra were acquired using 1500 shots and a laser intensity of 3000. The 10 most intense precursor ions were automatically selected and their TOF/TOF fragmentation spectra were acquired using 500 shots at a laser intensity of 3900. External calibration in each run was performed with CalMix[®] standards (ABSciex) spotted onto the same plate. For protein identification, resulting spectra were searched against the UniProt/SwissProt database using ProteinPilot[®] v.4 and the Paragon[®] algorithm (ABSciex) at $\geq 95\%$ confidence, or manually interpreted. Few peptide sequences with lower confidence scores were manually searched using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) for protein similarity and protein family assignment. Samples resulting in negative identifications were further cleaned-up with micro- C_{18} ZipTips[®] (Millipore) and re-analyzed as described. RP-HPLC fractions corresponding to small peptides (eluting in the initial peaks of the chromatogram) were analyzed by nESI-MS/MS on a Q-Trap[®] 3200 instrument (Applied Biosystems). Samples (10 μ l) were loaded into metal-coated capillary tips (Proxeon) and directly infused into a nano-ESI source operated at 1300 V. Peptide ions were fragmented by collision-induced dissociation using the Enhanced Product Ion tool with Q_0 trapping. Settings for MS/MS analyses were: Q1, unit resolution; collision energy, 25–45 eV; linear ion trap Q3 fill time, 250 ms; and Q3 scan rate, 1000 amu/s. Resulting CID spectra were interpreted manually.

2.4. Toxicological profiling

2.4.1. Animals

In vivo assays were conducted in female CD-1 mice, supplied by Instituto Clodomiro Picado, following protocols approved

Table 1 – Assignment of the RP-HPLC isolated fractions of *Porthidium lansbergii lansbergii* venom to protein families by MALDI-TOF-TOF of selected peptide ions from in-gel trypsin-digested protein bands or nESI-MS/MS of native peptides.

Peak	%	Mass (kDa)	Peptide ion		MS/MS-derived sequence	Conf (%)	Score	Protein family; ~related protein *
			m/z	z				
1	0.4	–	928.5	1	DXRPDGBB	99.0	9	BPP/CNP; ~Q9PW56
		–	2094.2	1	KBBHNDHPBVNHPGSBDB	99.0	18	Nucleobindin-2-like protein; ~T1DJX5
2	0.3	–	1277.6	1	SETHYSPDGRE	99.0	11	Metalloproteinase fragment; ~U3TAC5
3	0.2	–	969.5	1	ZBWPPGHH	99.0	9	BPP/CNP; ~J3S3U4
		–	1102.6	1	DGBBARBNW	99.0	10	BPP/CNP ~ Q2PE51
		–	1449.7	1	NVEBEDEAPBMC	99.0	13	Metalloproteinase fragment; ~B7U492
		–	2207.3	1	KBBHNDHPBVNHPGSBDBX	99.0	11	Nucleobindin-2-like protein; ~T1DJX5
		–	1912.8	1	P(M ²⁺)BPBBEPSP(N ^{da})BPRYV	99.0	9	Amelogenin fragment; ~D4N4N1
4	2.8	–	430.6	1	ZNW	man	man	Peptide SVMF inhibitor; ~P01021
5	3.8	–	444.4	1	ZBW	man	man	Peptide SVMF inhibitor; ~P01021
6	0.7	–	1583.9	1	DXRPDGBBARBNW	99.0	13	BPP/CNP; ~Q9PW56
		–	1292.7	1	ZB(W ²⁺)PPGHHXPP	99.0	11	
7	0.4	–	1148.6	1	ZWPPGHHXPP	99.0	12	BPP/CNP; ~J3S3U4
		–	1276.6	1	ZBPPGHHXPP	99.0	13	
		–	1168.6	1	NDYEVXYPR	99.0	10	Metalloproteinase fragment; ~Q2QA03
8	0.8	10	1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	12	Disintegrin; ~Q9PVK9
		–	2129.8	1	ARGDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	20	
		–	1148.5	1	ZWPPGHHXPP	99.0	10	BPP/CNP; ~J3S3U4
		–	1276.6	1	ZBWPPGHHXPP	99.0	13	
9	1.1	10	2129.9	1	ARGDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	16	Disintegrin; ~Q9PVK9
		–	1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	16	
		–	1148.6	1	ZWPPGHHXPP	99.0	12	BPP/CNP; ~J3S3U4
		–	1276.6	1	ZBWPPGHHXPP	97.4	9	
10	7.0	10	2131.2	1	ARGDDMDDYC(N ^{da})GXSAGCPR	99.0	12	Disintegrin; ~Q9PVK9
11	1.8	10	2131.0	1	ARGDDMDDYC(N ^{da})GXSAGCPR	99.0	13	Disintegrin; ~Q9PVK9
		–	1903.9	1	GDDMDDYC(N ^{da})GXSAGCPR	99.0	12	
12	5.7	10	1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	11	Disintegrin; ~Q7SZD9
		–	1276.6	1	ZBWPPGHHXPP	90.4	8	BPP/CNP; ~J3S3U4
13	0.3	10	1902.7	1	GDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	16	Disintegrin; ~Q9PVK9
		–	2129.9	1	ARGDDMDDYCNGXSAGCPR	99.0	19	
14	3.0	11	1577.7	1	CCFVHDCCYEK	99.0	14	Phospholipase A ₂ , D49; ~U3TDC9
		–	2585.2	1	NAX(P ²⁺)FYAFYGCYCGWGBGRPK	99.0	14	
		–	1727.8	1	BVCECDBAAAXCFR	99.0	15	
15	2.2	10	3151.1	1	Z(T ^{da})XVSXXEEHPHEXSHXFKPSCVTVXR	94.8	12	Vascular endothelium growth factor; ~COK3N2
		–	1369.8	1	(B ^{da})VMPFMEVYSR	man	man	
16	2.4	11	2542.3	1	TATYSYTEENGAXVCGDDPCBK	99.0	13	Phospholipase A ₂ , D49; ~P86456
		–	1471.7	1	CCXVHDCCYGK	99.0	16	
17	10.8	12	1471.7	1	CCXVHDCCYGK	99.0	12	Phospholipase A ₂ , D49; ~P0CAS3
		–	1739.9	1	DNXDTYD(N ^{da})KY(W ^{da})FX	97.1	11	
		–	1710.7	1	(B ^{da})VCECDBAAAXCFR	99.0	12	
18	0.9	29	1471.8	1	BEWVXSAHCDR	99.0	12	Serine proteinase; ~U3TAG7
		–	2996.7	1	XNR(P ²⁺)VBN(S ^{da})AHXEPXSPSSPPSVGSVCR	99.0	15	
		–	1379.8	1	AAYPEFGXPATSR	99.0	14	
19a	1.6	27	1471.8	1	BEWVXSAHCDR	99.0	16	Serine proteinase; ~U3TAG7
		–	922.6	1	XHXGMHSK	99.0	12	
		–	1379.8	1	AAYPEFGXPATSR	99.0	16	
		–	2996.8	1	XNR(P ²⁺)VBN(S ^{da})AHXEPXSPSSPPSVGSVCR	99.0	13	
19b	1.4	21	1537.8	1	MEWYPEAAANAER	99.0	21	Cysteine-rich secretory protein; ~T1E6W3
		–	985.5	1	CXESHSPR	99.0	13	
		–	1138.6	1	SVDFDSESPR	99.0	15	
		–	1981.2	1	KPEXB(N ^{da})BXVDX(H ²⁺)NFXR	99.0	23	
20	0.7	29	1037.6	1	GAHAGXPATSR	99.0	14	Serine proteinase; ~Q9W7S1
		–	2172.3	1	SAHXAPXSXPSNPPXVGSVCR	99.0	23	
		–	1442.8	1	(V ²⁺)GGDECXNEHR	96.5	9	
21	1.1	25	3362.8	1	SSCDGDSGGPXXCNGEXBGXVSWGDXCABPR	99.0	11	Serine proteinase; ~B0VXT7
		–	1512.8	1	VXGGDECXNEHR	99.0	11	
		–	1747.1	1	KBDDEBDBDXMXXR	99.0	23	
22	0.2	24	1189.7	1	WDBDXMIR	99.0	11	Serine proteinase; ~T1E6T7
		–	1573.0	1	NNEVXDBDXMXXR	99.0	10	
23	0.5	–	–	–	–	–	–	Unknown
24a	0.4	74	1971.2	1	YXGYXNVXFDDBGNVXK	99.0	20	5'-Nucleotidase; ~T2HRS9
		–	1889.1	1	XXXPSFXAGGDGYHMXK	99.0	21	

Table 1 (continued)

Peak	%	Mass (kDa)	Peptide ion	MS/MS-derived sequence	Conf (%)	Score	Protein family; ~ related protein *
			1110.6 1	BAFEHSVHR	99.0	13	
			1449.8 1	VVSXNVXCTECR	99.0	14	
			2408.2 1	HPDDNEWNVHSMCXV(N ^{da})GGGXR	99.0	23	
			1753.0 1	SFEXTXXHTNDVHAR	99.0	19	
			3125.7 1	ETPVXSNPGPYXEFRDEVEEXBNHANK	99.0	15	
			1555.9 1	XXAXGHSXGFEDBR	99.0	22	
			1578.0 1	HANFPXXSANXRPK	99.0	19	
			2421.3 1	FHECNXGNXXCDAVXYNNVR	99.0	25	
24b	0.2	62	1379.7 1	KFWEDDGXBGGK	99.0	12	L-amino-acid oxidase; ~ Q6WP39
			1651.8 1	NDEEGWYANXGPMR	99.0	18	
			1514.8 1	ETDYEEFXEXAR	99.0	19	
24c	0.3	9	2136.0 1	GFCCPXGWSSYEGHCYR	99.0	18	C-type lectin/lectin-like; ~ F8S0Z1
			1592.8 1	TTDNBWXSRSCSR	99.0	14	
25	1.0	60	2457.3 1	RFDEXVDGMDXBXTSMYBAXK	99.0	15	L-amino-acid oxidase; ~ J7H670
			1651.8 1	NDEEGWYANXGPMR	99.0	20	
			1514.8 1	ETDYEEFXEXAR	99.0	18	
26	2.1	57	2457.4 1	RFDEXVDGMDXBXTSMYBAXK	99.0	8	L-amino-acid oxidase; ~ J7H670
			1651.9 1	NDEEGWYANXGPMR	99.0	16	
			1514.8 1	ETDYEEFXEXAR	99.0	15	
			2072.1 1	TYRNDEEGWYANXGPMR	98.1	7	
27	0.6	–	–	–	–	–	Unknown
28a	0.3	115	1747.0 1	SMBAXFXAHGPGFNEK	99.0	14	Phosphodiesterase; ~ T2HRT4
			1420.8 1	DFYTFDSEGXVK	99.0	14	
			1532.9 1	XWNYFHTTXXPK	99.0	10	
			1355.8 1	AATYFWPGSEVK	99.0	9	
			2405.4 1	TESEAHNXPYGRPBVBXBNHNSK	99.0	9	
			1924.2 1	VRDVEXTGXNFSYGXK	94.7	7	
28b	1.5	11	1928.9 1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	17	C-type lectin/lectin-like; ~ Q9PS06
			2541.5 1	GGHXVSXESAGERDFVABXVSEN(K ^{am})	99.0	13	
			2603.3 1	DCPSDWSSYEGHCYBPFNEPK	99.0	17	
29a	0.2	51	1404.9 1	YNNYBEDPYAK	99.0	11	Phospholipase B; ~ T2HP68
			1461.0 1	KVPESXFAWER	99.0	12	
			1705.2 1	SXEDGTXYXXEBVVK	99.0	14	
			1011.7 1	TWAETFEK	99.0	11	
29b	0.3	12	1928.9 1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	19	C-type lectin/lectin-like; ~ Q9PS06
			2541.5 1	GGHXVSXESAGEADFVA(B ^{da})XVAENXK	99.0	15	
29c	0.2	11	1928.9 1	DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	11	C-type lectin/lectin-like; ~ Q9PS06
			2603.3 1	DCPSDWSSYEGHCYBPFNEPK	99.0	22	
			920.5 1	WSNAAM ^{ox} XK	98.9	13	
			1345.8 1	EBXMXASVXGXR	96.7	11	
30	1.7	53	1456.9 1	(N ^{da})MPBCXXNBPXK	99.0	17	Metalloproteinase; ~ C5H5D6
			2512.3 1	NPCNXYSPNDEDBGMVXPGTK	99.0	24	
			1270.7 1	XYCFPSSPATK	99.0	16	
			3275.6 1	TDVVSP(P ^{py})VCGNYFVEVGEECDGSPATCR	99.0	15	
			1712.8 1	AABDECDMADXTGR	99.0	22	
			1183.7 1	ZSNXTPEBBR	99.0	12	
31a	2.3	67	2959.6 1	AABDDCDXPESCTGBSABCPTDSFBR	99.0	15	Metalloproteinase; ~ R4FIM1
31b	0.8	52	2136.0 1	YFVEVGEECDGSPATCR	99.0	16	Metalloproteinase; ~ C5H5D6
			2512.3 1	NPCNXYSPNDEDBGMVXPGTK	99.0	23	
			1456.9 1	(N ^{da})MPBCXXNBPXK	99.0	17	
			3275.6 1	TDVVSP(P ^{py})VCGNYFVEVGEECDGSPATCR	99.0	12	
			1270.7 1	XYCFPSSPATK	99.0	15	
			1712.8 1	AABDECDMADXTGR	99.0	21	
			1183.6 1	ZSNXTPEBBR	99.0	12	
31c	0.5	43	1011.5 1	TWAETFEK	99.0	13	Phospholipase B; ~ T2HP68
			1705.0 1	SXEDGTXYXXEBVVK	99.0	16	
			2222.2 1	HBGXPESYNFDFTMBPVX	99.0	17	
			1460.9 1	KVPESXFAWER	99.0	13	
			1332.8 1	VVPESXFAWER	99.0	15	
32a	6.8	207	1135.7 1	TXDXFGBWR	99.0	14	Metalloproteinase; ~ Q2UXQ9
			938.6 1	ERDXHR	99.0	10	
			1093.6 1	YNGDXDBXR	97.8	9	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Peak	%	Mass (kDa)	Peptide ion	MS/MS-derived sequence	Conf (%)	Score	Protein family; ~related protein *
32b	5.9	25	1135.7	1 TXDXFGBWR	99.0	11	Metalloproteinase; ~E3UJL0
			938.6	1 ERDXXHR	99.0	11	
			1094.6	1 Y(N ^{da})GDxDBXR	98.8	10	
32c	0.4	10	1918.8	1 DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	13	C-type lectin/lectin-like; ~T1E3Z4
			938.6	1 ERDXXHR	99.0	10	
			1135.7	1 TXDXFGBWR	99.0	11	
32d	0.1	10	1380.9	1 KPBCXXBBPXK	99.0	9	Metalloproteinase; ~Q92032
			1679.9	1 GPTXGXAYVGTMCDFK	99.0	14	
			–	–	–	–	
33	1.2	–	–	–	–	–	Unknown
34a	0.2	124	2211.9	1 XHSWVECESGECDBCR	99.0	10	Metalloproteinase; ~Q2UXQ4
			1304.8	1 YXEXVXVAD(R ^{ox})R	95.2	9	
34b	3.2	63	2225.9	1 XHSWVECESGECCEBCR	99.0	10	Metalloproteinase; ~T2HPB1
			1155.6	1 KXPCAPBDVK	99.0	9	
			1304.8	1 YXEXVXVAD(R ^{ox})R	99.0	16	
			2211.9	1 XHSWVECESGECDBCR	99.0	26	
			1928.9	1 DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	10	
34c	0.7	10	1918.9	1 DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	14	C-type lectin/lectin-like; ~T1E3Z4
			1918.8	1 DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	16	
35	2.1	10	1918.8	1 DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	16	C-type lectin/lectin-like; ~T1E3Z4
36a	0.3	62	1651.8	1 NDEEGWYANXGPMR	99.0	10	L-amino-acid oxidase; ~Q6WP39
			1514.8	1 ETDYEEFXEXAR	99.0	16	
36b	0.7	47	1228.8	1 KYTHNXXAX(K ^{fo})	99.0	14	Metalloproteinase; ~G1UJB2
			1040.5	1 FVTAGTECR	99.0	10	
			1115.6	1 DGBGXFYCR	99.0	14	
			1137.5	1 CTGBSGDCPR	99.0	12	
			1987.9	1 XTTGSBCAEGXCCDBCK	99.0	21	
36c	1.5	31	1010.6	1 SVGXVBDHR	99.0	12	Metalloproteinase; ~J3SDW3
			1327.8	1 YXEXVXVADHR	99.0	15	
			906.5	1 YHFVANR	99.0	11	
			1928.9	1 DCPSDWSPYEGHCYR	99.0	15	
			1918.8	1 DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	20	
36d	0.8	10	1918.8	1 DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	20	C-type lectin/lectin-like; ~T1E3Z4
37	0.9	–	–	–	–	–	Unknown
38a	0.9	183	1769.7	1 SGSBCGHGDCCEBCK	99.0	15	Metalloproteinase; ~T1E6U1
38b	7.5	31	1151.5	1 CTGBSADCPK	99.0	12	Metalloproteinase; ~U3T788
			1769.7	1 SGSBCGHGDCCEBCK	99.0	20	
38c	1.2	11	2603.2	1 DCPSDWSSYEGHCYBPFNEPK	99.0	8	C-type lectin/lectin-like; ~I2GAE4
			1918.8	1 DCPSDWSSYEGHCYR	99.0	16	
			1611.0	1 XYEXVNTX(N ^{da})VXYR	99.0	10	
39a	1.4	36	1151.5	1 CTGBSADCPK	99.0	11	Metalloproteinase; ~A2CJE5
			1769.7	1 SGSBCGHGDCCEBCK	99.0	20	
			1611.0	1 XYEXVNTX(N ^{da})VXYR	99.0	15	
39b	1.7	31	1702.0	1 VAXXGXEXWSSGEXSK	99.0	17	Metalloproteinase; ~J3SBP6
			2001.9	1 VTTGSBCAEGXCCDBCR	99.0	19	
			1871.8	1 GDDV(N ^{da})DYC(N ^{da})GXSAGCPR	99.0	16	

X: Leu/Ile; B: Lys/Gln. Confidence (% Conf) and Score values are calculated by the Paragon® algorithm of ProteinPilot®. Possible, although unconfirmed or ambiguous amino acid modifications suggested by the automated identification software are shown in parentheses, with the following abbreviations: ^{ox}: oxidized; ^{do}: dioxidized; ^{da}: deamidated; ^{dh}: dehydrated; ^{py}: pyroglutamic; ^{ca}: carbamyl; ^{fo}: formyl; ^{or}: ornitine R; ^{na}: Na cation; ^{kc}: K cation. Man: *de novo* amino acid sequencing by manual interpretation of spectra.

* Cysteine residues are carbamidomethylated. Mass: apparent mass by SDS-PAGE under reducing conditions, in kDa.

by the Institutional Committee for the Use and Care of Animals (CICUA), University of Costa Rica. Mice were housed in cages for groups of 4–6, and provided food and water *ad libitum*.

2.4.2. Venom lethality

The lethal potency of the venom was tested by intraperitoneal injection, in groups of four mice of 16–18 g body weight. Deaths induced by the injection of varying doses of venom (48–200 µg), dissolved in phosphate-buffered saline (PBS; 0.12 M NaCl, 0.04 M sodium phosphate buffer, pH 7.2), were recorded after

48 h. The median lethal dose (LD₅₀) was calculated by probits [17], using the BioStat® software (AnalySoft).

2.4.3. Myotoxic activity

Venom (50 µg in 50 µl of PBS) was injected into the gastrocnemius muscle of groups of four mice (18–20 g). A control group received an injection of PBS alone. After 3 h, blood was collected from the tip of the tail into heparinized capillaries, and the plasma creatine kinase (CK) activity was determined using an UV kinetic assay (CK-Nac, Analyticon). Six hours after injection, mice were euthanized by CO₂ inhalation and samples of

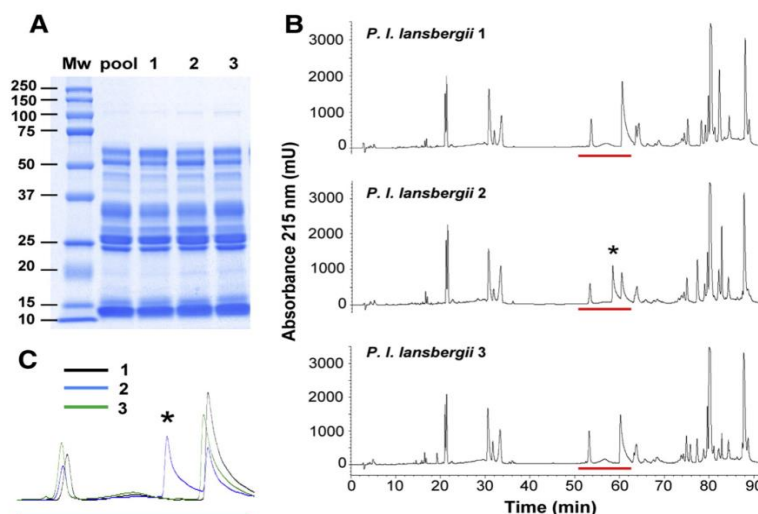


Fig. 3 – Comparison of the SDS-PAGE and RP-HPLC profiles of individual venom samples obtained from the three *Porthidium lansbergii lansbergii* specimens used in this study. (A) SDS-PAGE (12%) under reducing conditions, stained with colloidal Coomassie. Molecular weight markers (Mw) are indicated in kDa. (B) RP-HPLC protein elution profiles on a C₁₈ column, as described in Methods (gradient line is omitted for clarity). The chromatogram region indicated by a red horizontal line in (B) is magnified in (C) in order to show the main difference between the three venom samples. The peak labeled with an asterisk was identified as a D49-type phospholipase A₂ in the venom of specimen 2, being absent in venoms from specimens 1 and 3.

injected muscle tissue were obtained for histological processing of formalin-fixed sections, hematoxylin–eosin staining, and microscopic evaluation [18].

2.4.4. Hemorrhagic activity

Groups of five mice (18–20 g) received an intradermal venom injection (3 µg in 100 µl of PBS) in the abdominal skin. After 2 h, animals were euthanized, and their skin was removed to measure the hemorrhagic areas.

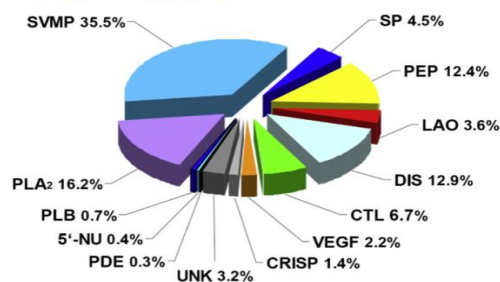


Fig. 4 – Composition of *Porthidium lansbergii lansbergii* venom according to protein families, expressed as percentages of the total protein content. PLA₂: phospholipase A₂; SP: serine proteinases; LAO: L-amino acid oxidase; SVMP: metalloproteinase; DIS: disintegrin; CTL: C-type lectin/lectin-like; 5'-NU: 5' nucleotidase; PLB: phospholipase B; PDE: phosphodiesterase; VEGF: vascular endothelial growth factor; CRISP: cysteine-rich secretory protein; PEP: peptides, UNK: unknown/unidentified.

2.4.5. Edema-forming activity of the VEGF component of venom

A group of four mice (18–20 g) received a subcutaneous injection of VEGF purified from *P. lansbergii lansbergii* venom (3 µg in 30 µl of PBS) in the left footpad. The right footpad was used as control, receiving 30 µl of PBS alone. Edema was estimated at different time points (0.5, 1, 3, 6 and 24 h) by

Table 2 – Comparative protein composition of the venoms from *Porthidium* species found in Colombia and Costa Rica.

Protein family	% of total venom proteins		
	<i>P. lansbergii lansbergii</i> ^a	<i>P. nasutum</i> ^b	<i>P. ophryomegas</i> ^b
Metalloproteinase	35.5	52.1	45.0
Phospholipase A ₂	16.2	11.6	13.5
Disintegrin	12.9	9.9	16.7
Small peptides	12.4	1.9	4.2
C-type lectin/lectin-like	6.7	10.4	8.0
Serine proteinase	4.5	9.6	7.3
L-amino acid oxidase	3.6	3.0	3.3
svVEGF	2.2	–	–
CRISP	1.4	1.3	0.6
Phospholipase B	0.7	–	–
5' Nucleotidase	0.4	0.2	–
Phosphodiesterase	0.3	–	–
Unknown	3.2	–	1.4
Number of families	12	9	8

^a Present study.

^b Although *P. nasutum* is found in Colombia, data correspond to specimens from Costa Rica [13].

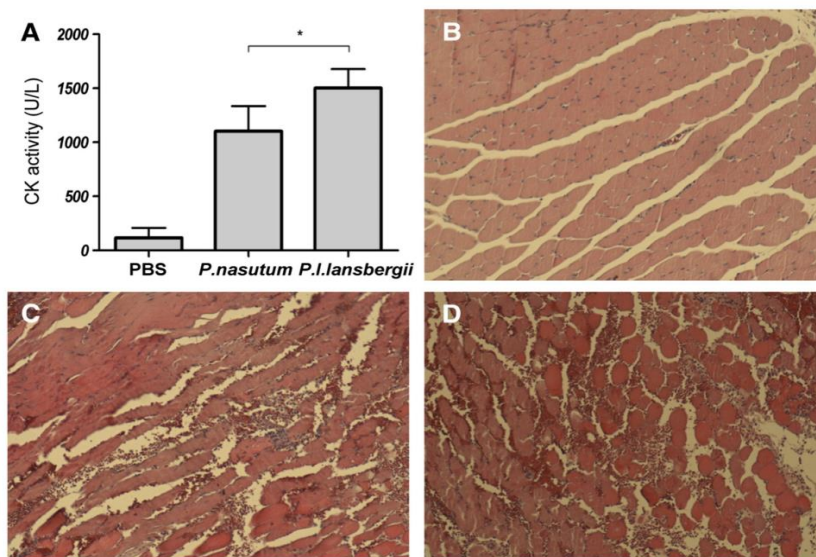


Fig. 5 – (A) Myotoxic activity of *Porthidium lansbergii lansbergii* and *Porthidium nasutum* venoms (50 μ g) after intramuscular injection in mice. (A) Plasma creatine kinase (CK) activity was determined 3 h after injection. Phosphate-buffered saline (PBS) alone was injected in a control group. Bars represent mean $\pm$ SD ($n = 4$). The difference between *P. lansbergii lansbergii* and *P. nasutum* venoms is statistically significant ($p < 0.05$) by Student's t-test. Histological evaluation of hematoxylin–eosin stained skeletal muscle sections, 6 h after local injection of PBS (B), *Porthidium lansbergii lansbergii* (C), or *Porthidium nasutum* (D) venoms. Magnification 200 $\times$. Massive extravasation of red blood cell areas is observed among areas of necrotic muscle fibers in (C) and (D).

measuring the footpad thickness with a low-pressure spring caliper (Oditest®, Kroeplin) [19].

2.4.6. Hematological parameters

Groups of five mice (18–20 g) received an intramuscular injection of venom (100 μ g in 50 μ l of PBS), into their right gastrocnemius. A control group received PBS alone. After 3 h, 200 μ l of blood were collected from the tip of the tail into heparinized capillaries, and

analyzed on a pocH-100i® Hematology Analyzer (Sysmex). Parameters included total white blood cell (WBC) and red blood cell (RBC) counts, hemoglobin (HB) concentration, hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and platelet (PT) count.

2.5. In vitro enzymatic activities

2.5.1. Phospholipase A₂ activity

PLA₂ activity was assayed on the monodisperse synthetic chromogenic substrate 4-nitro-3-octanoyloxybenzoic acid (NOBA) [20], and on micellar phosphatidylcholine (PC) by the phenol red colorimetric method [21]. In the first case, 25 μ l containing various amounts of venom were mixed with 200 μ l of 10 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 0.1 M NaCl, pH 8.0, and 25 μ l of NOBA to achieve a final substrate concentration of 0.32 mM. Plates were incubated at 37 °C for 60 min, and absorbances were recorded at 405 nm in a microplate reader. PLA₂ activity was expressed as the change in absorbance $\times$ 1000. In the second method, 20 μ l containing 0.6 to 5 μ g of venom were added to 1 ml of substrate (0.25% w/v sn-3-phosphatidylcholine, 0.4% v/v Triton X-100, 0.004% w/v phenol red) in a thermoregulated cuvette at 30 °C. The decrease in absorbance at 558 nm was monitored continuously for 1 min. One unit of PLA₂ activity was defined as the change of 0.001 in absorbance per min. Both assays were performed in triplicates.

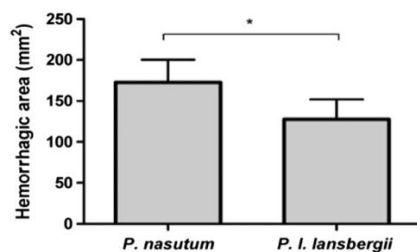


Fig. 6 – Comparison of the hemorrhagic activity of *Porthidium lansbergii lansbergii* and *Porthidium nasutum* venoms (3 μ g) after intradermal injection in mice. The area of hemorrhagic spots was drawn on a transparent film and measured in mm². Bars represent mean $\pm$ SD ($n = 5$). The difference between both venoms is statistically significant ($p < 0.05$) by Student's t-test.

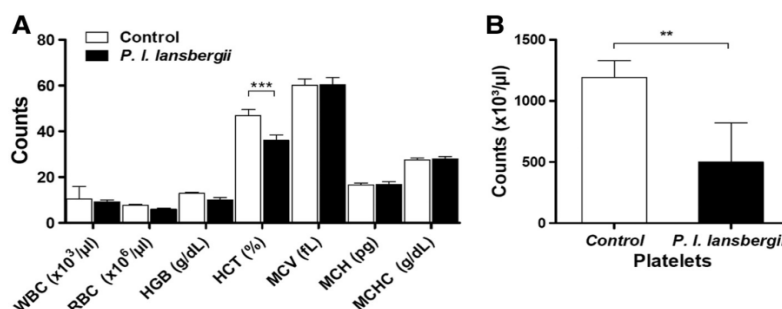


Fig. 7 – Evaluation of hematological parameters after the intramuscular injection of *Porthidium lansbergii lansbergii* venom (100 µg), or PBS alone, in mice. Heparinized blood was collected from the tail 1 h after injection, and analyzed in a Sysmex pocH-100i™ instrument as described in Methods. Bars represent mean $\pm$ SD ($n = 5$). (A) WBC: white blood cells; RBC: red blood cells; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; and MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. (B) Platelet counts. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between mice receiving *Porthidium lansbergii lansbergii* venom or PBS are indicated by asterisks ($p < 0.05$).

2.5.2. Coagulant activity

The coagulant effect of venom was tested by adding 20 µg (in 50 µl of PBS) to 200 µl of citrated human plasma, previously incubated at 37 °C. PBS alone was added to control plasma aliquots [22]. *B. asper* venom from Costa Rica was included as a known positive control. Clotting times were recorded and venom was considered as being devoid of coagulant activity if no clotting was observed after 30 min of incubation. Assays were performed in duplicates.

2.5.3. Anticoagulant activity

Aliquots of 0.2 ml of citrated (3.8% v/v) human plasma were incubated with venom (40 µg in 50 µl of PBS) or PBS alone, for 10 min at 37 °C. Then, 50 µl of 0.25 M CaCl_2 was added and the clotting time was determined [23]. Assays were performed in triplicates.

2.5.4. Proteinase activity

Variable amounts of venom (1.3–40 µg) were added to 100 µl of azocasein (10 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl_2 buffer, pH 8.0), and incubated for 90 min at 37 °C. The reaction was stopped by addition of 200 µl of 5% trichloroacetic acid, and after centrifugation, 150 µl of supernatants were mixed with 150 µl of 0.5 M NaOH, and absorbances were recorded at 450 nm. The absorbance of azocasein incubated with PBS alone was used as a blank, being subtracted from all readings [24]. Assays were performed in triplicates.

2.5.5. Inhibition of platelet aggregation

Fresh platelet-rich human plasma was prepared by centrifugation of citrated blood from healthy volunteers, at 135 $\times g$ for 10 min. Aliquots of 225 µl of this preparation were incubated with 25 µl of venom (4–8 µg) or venom fractions 10 or 11 (300 nmol) (Fig. 2, Table 1) for 5 min at 37 °C. Then, platelet aggregation was induced by adding 25 µl of ADP (20 µM final concentration), and monitored through the increase in the percentage of light transmittance using an AggRAM® analyzer (Helena Laboratories) at a spin rate of 600 rpm for 5 min. The aggregation induced by 25 µl of ADP alone was considered as 100% response. Platelet-poor plasma (225 µl), obtained after centrifugation at 800 $\times g$ for 20 min, was used as a blank [25]. Assays were performed in duplicates.

2.6. Statistical analyses

Results were expressed as mean $\pm$ SD. The significance of differences between the means of two experimental groups was determined by Student's t-test using the Prism® software (GraphPad), where $p < 0.05$ was considered significant.

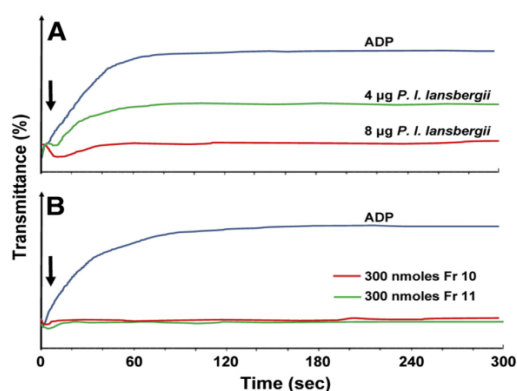


Fig. 8 – Inhibition of human platelet aggregation caused by whole *Porthidium lansbergii lansbergii* venom (A) or by disintegrin fractions (Fr 10, Fr 11) as identified in Table 1 (B). Venom (4 or 8 µg) or fractions (300 nmol) were added for 5 min to platelet-rich plasma that had been prewarmed at 37 °C, under constant speed in an aggregometer, as described in Methods. Then, ADP was added (arrows) and aggregation was monitored by the changes in transmittance. Control plasma samples were incubated with PBS alone, before agonist addition.

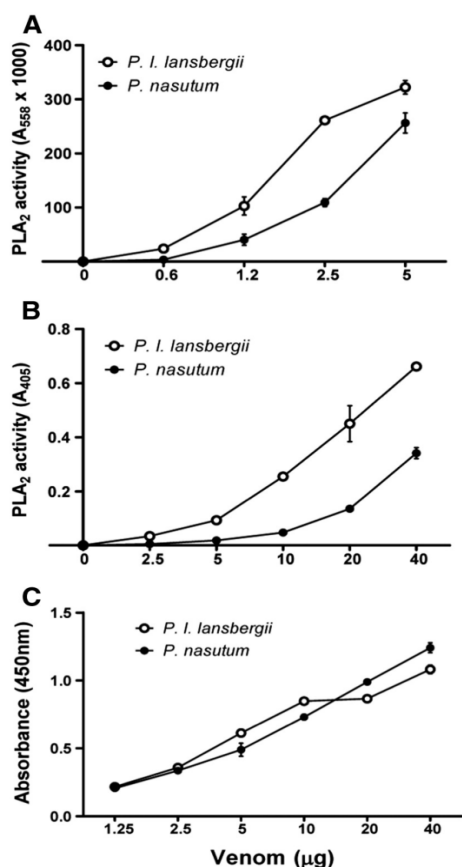


Fig. 9 – Comparison of enzymatic activities of the venoms of *Porthidium lansbergii lansbergii* (○) and *Porthidium nasutum* (●). Phospholipase A₂ activity was assayed on micellar phosphatidylcholine (A) or on 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid, a synthetic monodisperse substrate (B). Proteolytic activity was evaluated on azocasein (C). Each point represents mean ± SD (n = 3). Differences between *Porthidium lansbergii lansbergii* and *Porthidium nasutum* venoms are statistically significant (p < 0.05) in (A) and (B), whereas in (C) no statistically significant differences were recorded (p > 0.05).

3. Results and discussion

Venoms from species within the genus *Porthidium* have received less attention compared to those of other pitvipers distributed in Latin America. To date, the venoms of only two of its species, *P. nasutum* and *P. ophryomegas*, have been studied by a proteomics approach [13]. The venom composition and toxicological profile of the Lansberg's hognose pitviper, *P. lansbergii lansbergii*, was analyzed in this study. RP-HPLC resolved this venom into 39

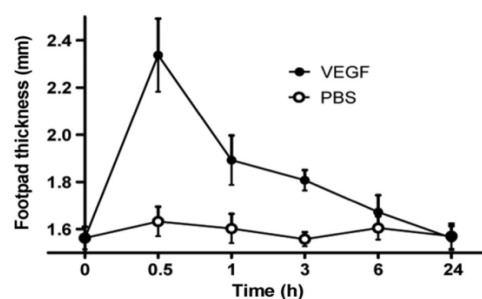


Fig. 10 – Time course of the edema induced in the mouse footpad assay by the VEGF fraction (Fr. 15; Table 1) isolated from *Porthidium lansbergii lansbergii* venom. Mice received a subcutaneous injection containing 3 µg of the VEGF in 30 µl of PBS, in the left footpad. The right footpad received the same volume of PBS. Footpad thickness was measured at different times, as described in Methods. Each point represents mean ± SD (n = 4). Differences between VEGF and PBS at 0.5, 1, and 3 h are statistically significant (p < 0.05).

peaks, which generated a total of 51 protein bands after SDS-PAGE separation (Fig. 2). Of these, 47 components were assigned to known protein families following in-gel digestion and MALDI-TOF-TOF analysis (Table 1). Peaks 1–7, corresponding to small peptides which cannot be resolved by gel electrophoresis, were therefore analyzed by direct infusion using nESI-MS/MS (Table 1). The chromatographic profile of *P. lansbergii lansbergii* venom shows general similarities to those previously described for *P. ophryomegas* and *P. nasutum*, analyzed by the same method [13,26]. A comparison of the electrophoretic (Fig. 3A) and chromatographic (Fig. 3B) profiles of venoms obtained from each of the three *P. lansbergii lansbergii* specimens evidenced a general conservation among individuals, although few variations were observed in the expression of peaks corresponding to PLA₂s (Fig. 3C).

Protein family abundances in the venom of *P. lansbergii lansbergii*, expressed as percentage of total protein content, are represented in Fig. 4. Its most abundant proteins correspond to metalloproteinases (SVMPs; 35.5%), followed by PLA₂s (16.2%) and disintegrins (DIS; 12.9%). The high content of disintegrins is noteworthy, and could represent a common feature in the venoms of this genus, since *P. nasutum* and *P. ophryomegas* venoms also present disintegrin proportions as high as 9.9% and 16.7%, respectively [13]. In contrast, venoms from most of other pitvipers studied by the same methods contain less than 3% of disintegrins, or even lack this type of small proteins [27–29]. Other protein types present in the venom of *P. lansbergii lansbergii* include members of the C-type lectin/lectin-like (CTL), serine proteinase (SP), L-amino acid oxidase (LAO), vascular endothelial growth factor (VEGF), cysteine-rich secretory proteins (CRISP), phospholipase B (PLB), 5'-nucleotidase (5'-NU), and phosphodiesterase (PDE) families, as well as small peptides belonging to the bradykinin-potentiating peptide/C-type natriuretic peptide (BPP/CNP) and tripeptide SVMP inhibitor families (Fig. 4). Few venom proteins remained

unidentified, altogether representing 3.2% of the total protein content (Table 1).

The composition of *P. lansbergii lansbergii* venom is compared to those of the two other *Porthidium* species previously studied, in Table 2. As shown, the venom of *P. lansbergii lansbergii* conserves a trend similar to that observed in *P. nasutum* and *P. ophryomegas* venoms, sharing a predominance of SVMPS, high content of DIS, and relatively uniform abundances of PLA₂, CTL, LAO proteins. However, some differences are evident, such as a somewhat lower proportion of SPs and SVMPS, as well as a considerably higher content of small peptides (Table 2). In addition, at least three types of components in *P. lansbergii lansbergii* venom, namely VEGF (2.2%), PLB (0.7%), and PDE (0.3%), have not been found in any of the other two *Porthidium* species studied, underscoring a somewhat higher diversity of protein families in this venom.

Correlations between venom proteome and toxic or enzymatic activities were investigated by several functional assays. Regarding lethality in mice, the LD₅₀ of *P. lansbergii lansbergii* venom was 140 ± 8 µg/mouse (8.2 µg/g body weight) when administered by the i.p. route. This lethal potency is weaker than that reported for *P. nasutum* from Antioquia and Chocó (Colombia), with an LD₅₀ of 5.7 µg/g [30], and for *P. lansbergii hutmanni* from Margarita Island (Venezuela), with a LD₅₀ of 2.5 µg/g [31], but slightly stronger than the potency of *P. nasutum* from Costa Rica (10.8 µg/g) [32]. Local tissue damaging activities of *P. lansbergii lansbergii* venom include a moderate myotoxicity (Fig. 5) and a potent hemorrhagic effect (Fig. 6). In comparison to the venom of *P. nasutum*, the increase in plasma CK activity induced by *P. lansbergii lansbergii* venom was significantly higher, in agreement with their slight difference in relative content of PLA₂s (Table 2), which are the main myotoxic components of most viperid venoms. Nevertheless, the magnitude of plasma CK values observed at 3 h after venom (50 µg) injection indicates that this myotoxic effect, which was corroborated histologically (Fig. 5), is moderate. Comparison of the hemorrhagic activity of *P. lansbergii lansbergii* and *P. nasutum* venoms was also in agreement with their differences in the content of SVMPS, which include the main hemorrhagic components. At identical doses (3 µg), the venom of *P. nasutum* (containing 52.1% SVMPS) caused a significantly higher intradermal hemorrhagic area than that of *P. lansbergii lansbergii* (having 35.5% SVMPS) (Fig. 6).

Regarding hematological alterations induced by the i.m. injection of *P. lansbergii lansbergii* venom (100 µg), after 3 h, no significant differences from control mice were recorded for WBC, RBC, HGB, MCV, MCH, and MCHC parameters, although a slight decrease in hematocrit (HTC; Fig. 7A) and a considerable drop in platelet counts (Fig. 7B) occurred. This observation suggests the presence of venom components which would affect platelets, at least in the mouse, such as CTL proteins (6.7%), disintegrins (12.9%), or other types of components. The high content of disintegrins in this venom (12.9%) would explain its ability to inhibit ADP-induced human platelet aggregation (Fig. 8A). Indeed, two isolated disintegrin fractions displayed such inhibitory activity (Fig. 8B), in agreement with the presence of an RGD motif [33] observed in their partial amino acid sequences (Table 1). Inhibition of

human platelet aggregation has also been described for the venom of *P. lansbergii hutmanni* from Venezuela [5,6].

P. lansbergii lansbergii venom lacked coagulant activity upon human plasma, in similarity to those of other *Porthidium* species [13,34], despite containing abundant SVMPS and SPs. On the other hand, this venom showed anticoagulant activity upon human plasma *in vitro*, unlike *P. nasutum* venom. The recalcification clotting time of plasma incubated with *P. nasutum* venom was 106 ± 8 sec, while *P. lansbergii lansbergii* venom prolonged this time to more than 2400 s. Under the same conditions, plasma incubated with PBS clotted after 188 ± 2 s. The components responsible for the anticoagulant activity of *P. lansbergii lansbergii* venom remain to be identified.

In agreement with its higher content of PLA₂ proteins (Table 2), the venom of *P. lansbergii lansbergii* showed significantly higher PLA₂ activity than *P. nasutum* venom on both micellar (Fig. 9A) and monodisperse (Fig. 9B) substrates. Comparison of the proteolytic activity of these venoms upon azocasein did not evidence significant differences (Fig. 9C), in spite of the higher content of SVMPS and SP enzymes in *P. nasutum* (Table 2).

VEGFs found in diverse viperid snake venoms have been reported to increment microvascular permeability at the site of injection [35], an activity which might enhance the absorption and distribution of toxins in the prey. Accordingly, the VEGF peak obtained from *P. lansbergii lansbergii* venom was confirmed to induce a rapid, transient edema in the mouse footpad assay, after the injection of 3 µg (Fig. 10). This suggests that VEGF, which accounts for ~2.2% of the proteins, together with other well-known inflammatory components such as PLA₂s [36], is likely to contribute significantly to the edema induced by this venom. In addition to VEGF, other protein types not previously observed in *Porthidium* species are PLB and PDE enzymes. The former has been identified in only few viperid and elapid venoms [37–39], where they may act as putative toxins with hemolytic and cytotoxic activity, as shown for the venom of *Pseudechis colleti* [40]. On the other hand, PDE enzymes may indirectly act as toxins by catalyzing the hydrolysis of phosphodiester bonds and releasing bioactive nucleosides such as adenosine [41]. Lastly, among the abundant small peptides identified in *P. lansbergii* venom, ZNW/ZBW-tripeptides were detected in the prominent RP-HPLC peaks 4 and 5 (Fig. 2B and Table 1). These peptides have been related to the inhibition of SVMPS during glandular storage [42,43]. Other peptides identified as belonging to the BPP/CNPs are known for their potential vasoactive properties [44]. Few other peptides identified in the early chromatographic peaks corresponded to fragments of larger venom proteins such as SVMPS, although some could correspond to fragments of other proteins, such as amelogenin and nucleobindin-2-like (Table 1), a finding that warrants further investigation.

On the basis of the compositional and functional data here obtained on the venom of *P. lansbergii lansbergii*, it may be suggested that human envenomings by this species would not be associated with a high fatality rate, although they would be predicted to involve at least considerable local hemorrhage and moderate myonecrosis, and possibly lack of major coagulation disturbances. A thrombocytopenic effect was recorded in mice, but due to species differences this

activity would have to be confirmed by clinical observations in patients. Unfortunately, clinical features of envenomings by *P. lansbergii lansbergii* have not been specifically reported in the medical literature, possibly owing to the fact that *Porthidium* species were formerly classified within the genus *Bothrops* [1], and hence their snakebites have been discussed essentially as “bothropic accidents” in Colombia [8,9,45,46]. The present information may be useful for future studies analyzing clinical correlates to the venom composition of *P. lansbergii lansbergii*, and also for the further isolation and characterization of its venom components.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank Raul Charris Morales-MVZ and Eliécer Jiménez Vargas, for their help in the collection of venom samples. The collaboration of the staff of Instituto Clodomiro Picado, especially of Dr José María Gutiérrez, Daniela Solano, Juan Manuel Ureña, Gabriela Solano, and Adriana Sánchez is gratefully acknowledged. Financial support was provided by COLCIENCIAS (Programa Nacional de Formación de Investigadores-Becas Colciencias No. 567-2012), The School of Basic Sciences, Faculty of Health (Universidad del Valle), and Vicerrectoría de Investigación (Universidad de Costa Rica; 741-B3-760, “Network for proteomic characterization of snake venoms of medical and biological relevance in Latin America”). This study was performed as part of the PhD thesis of E. Jiménez at Universidad del Valle (Cali, Colombia).

REFERENCES

- [1] Campbell JA, Lamar WW. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca, New York: Cornell University Press; 2004.
- [2] Otero R. Envenenamiento Ofídico. In: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editors. Fundamentos de Pediatría (Tomo V). Medellín: Fondo Editorial CIB; 2014. p. 73–119.
- [3] Ramos J, Veliz D, Brema A, Irausquin J. Efecto de la toxicidad *in vivo* e *in vitro* del veneno de *Porthidium lansbergii rozeti*. Comunidad y Salud 2010;8:25–31.
- [4] Girón ME, Estrella A, Sánchez E, Galán J, Tao WA, Guerrero B, et al. Purification and characterization of a metalloproteinase, Porthidin-1, from the venom of Lansberg's hog-nosed pitvipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*). Toxicon 2011;57: 608–18.
- [5] Lopez-Johnston JC, de Bosch N, Scannone H, Rodríguez-Acosta A. Inhibition of adrenaline and adenosine diphosphate induced platelet aggregation by Lansberg's hog-nosed pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom. Ann Hematol 2007;86: 879–85.
- [6] Lopez-Johnston JC, de Bosch N, Scannone H, Rodríguez-Acosta A. Inhibition of collagen and thrombin-induced platelet aggregation by Lansberg's hog-nosed pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom. J Thromb Thrombolysis 2007;24:275–82.
- [7] Paredes AE. Informe del evento accidente ofídico final año 2012. Vigilancia y Control en Salud Pública. Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2012.
- [8] Otero R, Gutiérrez J, Mesa MB, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. Toxicon 2002;40:1107–14.
- [9] Escobar J, Fuentes G. Manejo del Accidente Ofídico. Barranquilla- Colombia: Protocolos de la Universidad del Norte; 2004.
- [10] Fry BG, Wüster W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analyses of toxin sequences. Mol Biol Evol 2004; 21:870–83.
- [11] Fox JW, Serrano SMT. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. Proteomics 2008;8:909–20.
- [12] Calvete JJ. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. Toxicon 2013;75:44–62.
- [13] Lomonte B, Rey-Suárez P, Tsai WC, Angulo Y, Sasa M, Gutiérrez JM, et al. Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: toxicological and taxonomical insights. J Proteomics 2012;75:1675–89.
- [14] Mora-Obando D, Guerrero-Vargas J, Prieto-Sánchez R, Beltrán J, Rucavado A, Sasa M, et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. J Proteomics 2014;96:159–72.
- [15] Calvete JJ. 2011. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. Expert Rev Proteomics 2011;8:739–58.
- [16] Lomonte B, Tsai WC, Ureña-Díaz JM, Sanz L, Mora-Obando D, Sánchez EE, et al. Venomomics of New World pit vipers: genus-wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. J Proteomics 2014;96:103–16.
- [17] Finney DJ. Statistical Methods in Biological Assay. London: Charles Griffin and Company Limited; 1971.
- [18] Gutiérrez JM, Lomonte B, Cerdas L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. Toxicon 1986;24:885–94.
- [19] Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Inflammation 1993;17:93–105.
- [20] Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. Toxicon 1996;34:1149–55.
- [21] de Araújo AL, Radvanyi F. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. Toxicon 1987;25:1181–8.
- [22] Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. Bull World Health Organ 1983;61:949–56.
- [23] 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;92:273–83.
- [24] Wang WJ, Shih CH, Huang TF. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkistylisin, from *Agkistrodon acutus* venom. Biochem Biophys Res Commun 2004;324:224–30.
- [25] Camacho E, Villalobos E, Sanz L, Pérez A, Escalante T, Lomonte B, et al. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. Biochimie 2014;101:145–55.
- [26] Vargas LJ, Londoño M, Quintana JC, Rua C, Segura C, Lomonte B, et al. An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from

- Porthidium nasutum* snake venom. *Comp Biochem Physiol B* 2012; 161:341–7.
- [27] Lomonte B, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Sasa M, Gutiérrez JM, et al. Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of "snake venomomics". *J Proteomics* 2014;105: 323–39.
- [28] Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venom, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett* 2009;583:1736–43.
- [29] Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernández ML, Loaiza-Lange A, Gibbs LH, Lomonte B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon* 2014; 90:15–25.
- [30] Otero-Patiño R, Núñez V, Barona-Acevedo MJ, Díaz-Cadavid A, Saldarriaga M. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia* 2002;15: 5–15.
- [31] Vargas A, Finol H, Girón M, Scannone H, Fernández I, Rodríguez-Acosta A. Effects of Lansberg's hognose pit vipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom on renal ultrastructure in experimental mice. *Acta Sci Vet* 2011;39:1–6.
- [32] Bogarín G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, et al. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 2000;38:1429–41.
- [33] Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, Esteve V, Celda B, Juárez P, et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 2005;45:1063–74.
- [34] Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1989;27:841–8.
- [35] Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, Shibuya M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem* 2004; 279:46304–14.
- [36] Texeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 2003;42:947–62.
- [37] Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics* 2013;14:531.
- [38] Rokyta DR, Wray KP, Lemmon AR, Lemmon EM, Caudle SB. A high-throughput venom-gland transcriptome for the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. *Toxicon* 2011;57:657–71.
- [39] Aird SD, Watanabe Y, Villar-Briones A, Roy MC, Terada K, Mikheyev AS. Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC Genomics* 2013; 14:790.
- [40] Bernheimer A, Linder R, Weinstein S, Kim KS. Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*. *Toxicon* 1987;25:547–54.
- [41] Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* 2002;40:335–93.
- [42] Menin L, Perchué A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schöni R, et al. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon* 2008;51:1288–302.
- [43] Wagstaff SC, Favreau P, Cheneval O, Laing GD, Wilkinson MC, Miller RL, et al. Molecular characterization of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:650–6.
- [44] Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 1970;9:2583–93.
- [45] Otero R, Tobón GS, Gómez LF, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, et al. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). *Acta Méd Colomb* 1992;17:229–49.
- [46] Ayerbe S, Latorre JP. Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico. Popayán, Colombia: Secretaría Departamental de Salud del Cauca; 2009.

Paper 2: Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A₂ in the venom of the snake Porthidium lansbergii lansbergii



Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A₂ in the venom of the snake *Porthidium lansbergii lansbergii*

Eliécer Jiménez-Charris^a, Leonel Montealegre-Sánchez^a, Luis Solano-Redondo^b,
Fernando Castro-Herrera^b, Leonardo Fierro-Pérez^c, Bruno Lomonte^{d,*}

^a Grupo de Nutrición, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B # 36-00, Cali, Colombia

^b Laboratorio de Herpetología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B # 36-00, Cali, Colombia

^c Farmacología Univalle, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B # 36-00, Cali, Colombia

^d Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2016

Received in revised form

29 June 2016

Accepted 1 July 2016

Available online 2 July 2016

Keywords:

Snake venom

Porthidium lansbergii lansbergii

Phospholipase A₂

Myotoxin

Cytotoxin

ABSTRACT

The Lansberg's hognose pitviper, *Porthidium lansbergii lansbergii*, inhabits northern Colombia. A recent proteomic characterization of its venom (J. Proteomics [2015] 114, 287–299) revealed the presence of phospholipases A₂ (PLA₂) accounting for 16.2% of its proteins. The two most abundant PLA₂s were biochemically and functionally characterized. PIlans-I is a basic, dimeric enzyme with a monomer mass of 14,136 Da, while PIlans-II is an acidic, monomeric enzyme of 13,901 Da. Both have Asp49 in their partial amino acid sequences and, accordingly, are catalytically active upon natural or synthetic substrates. Nevertheless, these two enzymes differ markedly in their bioactivities. PIlans-I induces myonecrosis, edema, and is lethal by intracerebro-ventricular injection in mice, as well as cytolytic and anticoagulant *in vitro*. In contrast, PIlans-II is devoid of these effects, except for the induction of a moderate edema. In spite of lacking myotoxicity, PIlans-II enhances the muscle damaging action of PIlans-I *in vivo*. Altogether, results further illustrate the divergent functional profiles of basic and acidic PLA₂s in viperid venoms, and suggest that PIlans-I plays a myotoxic role in envenomings by *P. l. lansbergii*, whereas PIlans-II, apparently devoid of toxicity, enhances muscle damage caused by PIlans-I.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Lansberg's hognose pitviper, *Porthidium lansbergii lansbergii*, locally known as 'patoco' or 'patoquilla', is found in the Caribbean region of Colombia, inhabiting arid and semi-arid lands and humid zones of the Magdalena River Valley, from low elevations up to 1400 m. Its diet appears to be generalist, including preys such as frogs, lizards and small rodents (Campbell and Lamar, 2004; Otero, 2014). Although snakebite accidents have been reported for this species (Paredes, 2012), specific clinical features of these envenomings are lacking in the medical literature. Only few studies on its venom are available, and none of its proteins, to the best of our knowledge, have been isolated and characterized.

In a previous study, the whole venom of *P. l. lansbergii* was analyzed by a combined proteomic and toxicological approach (Jiménez-Charris et al., 2015). In resemblance with two other

Porthidium species (*Porthidium nasutum* and *Porthidium ophryomegas*) from Costa Rica (Lomonte et al., 2012), the proteome of *P. l. lansbergii* venom predominantly contains metalloproteinases, and presents phospholipases A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) as the second most abundant proteins (Jiménez-Charris et al., 2015). However, *P. l. lansbergii* venom showed low proportions of additional protein types that were not found in the other two *Porthidium* species, such as phosphodiesterase, phospholipase B, and vascular endothelium growth factor components. Furthermore, its relative content of PLA₂s was slightly higher than that observed in *P. nasutum* and *P. ophryomegas*, and accordingly, *P. l. lansbergii* venom showed higher PLA₂ activity in comparison to *P. nasutum* venom (Jiménez-Charris et al., 2015). In consequence, and to gain further knowledge on the toxic components of the venom of *P. l. lansbergii*, in this study we aimed for the isolation of its two most abundant PLA₂s in order to characterize their biochemical and functional properties.

Snake venom PLA₂s are heat-stable enzymes which, in spite of their conserved architecture, show remarkable functional diversity (Arni and Ward, 1996; Kini, 2003). They catalyze the hydrolysis of

* Corresponding author.

E-mail address: bruno.lomonte@ucr.ac.cr (B. Lomonte).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.006>

0041-0101/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the 2-acyl bond of phospholipids, releasing fatty acids and lyso-phospholipids in a calcium-dependent reaction (Scott et al., 1990). Based on their disulfide bonding patterns and other distinctive structural features, snake venom PLA₂s have been classified into group I (in elapids) or II (in viperids) (Doley et al., 2010). In turn, group II PLA₂s have been divided into two subtypes: Asp49–PLA₂s, which are catalytically active, and 'PLA₂ homologues' or 'PLA₂-like' proteins, which are catalytically inactive and most commonly possess a Lys49 substitution (Lomonte et al., 2003; Lomonte and Rangel, 2012). Among their diverse effects, snake venom PLA₂s can exert neurotoxic, myotoxic, hemolytic, inflammatory, anticoagulant, bactericidal, and platelet-inhibiting activities (Páramo et al., 1998; Kini, 2003, 2005; Gutiérrez and Lomonte, 1995; Lomonte et al., 2009; Huancahuire-Vega et al., 2011). The subtle structural features and biochemical properties that define specific bioactivities in different venom PLA₂s have been difficult to pinpoint, and many key molecular aspects of their mechanisms of action are still unknown (Gutiérrez and Lomonte, 2013). Therefore, it is of interest to explore the vast biodiversity of venomous snakes to search and characterize novel variants of PLA₂s which could shed light on understanding their diversification, biological roles, and complex structure-function relationships.

2. Materials and methods

2.1. Snake venom

Venom of *P. l. lansbergii* was obtained from three adult specimens found in Atlantic Department, Colombia. Snakes were released after collection of their venoms, which were pooled, centrifuged to remove debris, dried *in vacuo*, and stored at –20 °C.

2.2. Isolation of Pllans-I and Pllans-II

The reverse-phase HPLC conditions previously described for the proteomic characterization of *P. l. lansbergii* venom (Jiménez-Charris et al., 2015) were followed in order to isolate two PLA₂ enzymes, named Pllans-I and Pllans-II. In brief, aliquots of venom (2 mg) were separated in a C₁₈ column (250 × 4.6 mm, 5 μm particle diameter; Teknokroma) eluted at 1 ml/min with a gradient from water/0.1% trifluoroacetic acid (TFA) to acetonitrile/0.1% TFA, as follows: 0% B for 5 min, 0–15% B over 10 min, 15–45% B over 60 min, 45–70% B over 10 min, and 70% B over 9 min. The eluent was monitored at 215 nm in an Agilent 1200 chromatograph using ChemStation® software, and the targeted PLA₂ fractions were collected manually, dried by vacuum centrifugation, and stored at –20 °C.

2.3. SDS–PAGE and mass spectrometry (MS)

Protein concentration of Pllans-I and Pllans-II was estimated by measuring their absorbance at 280 nm in a NanoDrop® 2000c instrument (Thermo Scientific). Their homogeneity was then evaluated by SDS–PAGE under non-reducing or reducing (5% 2-mercaptoethanol at 100 °C for 5 min) conditions, using 12% gels, stained with Coomassie blue R–250. In addition, homogeneity and isotope-averaged molecular mass were determined by ESI–MS on a QTrap3200® mass spectrometer (Applied Biosystems). The proteins were diluted in 50% acetonitrile containing 0.1% formic acid, loaded into metal-coated disposable glass capillaries, and directly infused into a nanospray source for ionization at 1200 V. MS analysis was performed in positive enhanced multicharge mode in the range 600–1700 m/z, aided by the Analyst® v.1.5 software (ABSciex) for deconvolution.

2.4. Partial amino acid sequencing by tandem mass spectrometry

Pllans-I and Pllans-II were digested with sequencing grade trypsin (Sigma) or chymotrypsin (G–biosciences) after their reduction with dithiothreitol (10 mM) and alkylation with iodoacetamide (50 mM) as described (Van der Laat et al., 2013). Peptide products were desalted using C₁₈ ZipTips® (Millipore), diluted with an equal volume of a saturated α-cyano-4-hydroxycinnamic acid solution in 50% acetonitrile/0.1% TFA, and spotted onto an Opti-TOF384 plate for MALDI–TOF/TOF analysis on a Proteomics Analyzer 4800–Plus (Applied Biosystems) as described (Lomonte et al., 2014). Spectra were acquired in positive reflector mode at 2 kV in the 900–4000 m/z range, using 1500 shots and a laser intensity of 3000. External calibration was performed using CalMix® standards (ABSciex) spotted on the same plate. In addition, some peptides were analyzed by nESI–MS/MS on a QTrap3200 instrument by direct infusion. Doubly- or triply-charged ions selected from scans in positive enhanced resolution mode (250 amu/s) were subjected to fragmentation using the enhanced product ion tool with Q₀ trapping. Settings were: Q₁, unit resolution; collision energy, 25–40 eV; linear ion trap Q₃ fill time, 250 ms; and Q₃ scan rate, 1000 amu/s (Calvete et al., 2007). All fragmentation spectra obtained by MALDI– or ESI–mass spectrometry were interpreted manually to derive *de novo* amino acid sequences.

2.5. Sequence alignment of Pllans-I and Pllans-II

Four available sequences corresponding to basic and acidic Asp49-PLAs characterized from Viperidae family, with amino acid sequence identity values of at least 59% and 45% in comparison to Pllans-I and Pllans-II, were retrieved after a BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.gov>). These proteins, together with the manually added sequence of PhTX–II isolated from *Porthidium hyoprora* venom (Huancahuire-Vega et al., 2014), were aligned with the program MUSCLE (Edgar, 2004) using the MEGA 6.06 software (Tamura et al., 2013) and the maximum likelihood method based on the JTT matrix-based model (Jones et al., 1992).

2.6. Immunochemical cross-recognition screening

The purified Pllans-I and Pllans-II enzymes were tested by gel immunodiffusion (Ouchterlony and Nilsson, 1978) to determine their possible cross-recognition by rabbit polyclonal antibodies raised against myotoxin II, a group II PLA₂ present in the venom of *Bothrops asper* (Lomonte and Gutiérrez, 1989). The central well of a 1% agarose gel, dissolved in 0.12 M NaCl, 0.04 M sodium phosphate (PBS; pH 7.2) was filled with 30 μL of rabbit antiserum to myotoxin II, while 30 μL of two dilutions of Pllans-I and Pllans-II (0.25 and 0.5 μg/μL) were dispensed in the peripheral wells. Purified myotoxin II was utilized as a positive control for immunoprecipitation. After 24 h of diffusion at room temperature, precipitation lines were recorded using a ChemiDoc® imager with ImageLab® software (Bio–Rad).

2.7. Toxicological profiling

Animal experiments were performed in CD–1 mice of either sex, following protocols approved by the Institutional Committee for the Use and Care of Animals (CICUA), University of Costa Rica.

2.7.1. Intracerebro-ventricular lethal activity

Groups of three mice (16–18 g body weight) were injected with 5 μg of Pllans-I or Pllans-II, respectively, dissolved in 5 μL of PBS, by intracerebro-ventricular route, using a Hamilton microsyringe. This dose was selected on the basis of previous studies with related

snake venom PLA₂ enzymes (Gutiérrez et al., 1986a). Animals were observed up to 24 h after injection to record deaths.

2.7.2. Myotoxic activity

The ability of Pllans-I and Pllans-II to induce skeletal muscle necrosis was evaluated in groups of four mice (18–20 g), respectively. Different amounts of the enzymes, alone or in combination, dissolved in 50 µL of PBS, were injected into the gastrocnemius muscle. Doses were selected on the basis of previous studies on related snake PLA₂s with myotoxic activity (Gutiérrez and Lomonte, 1995). As a negative control, a group of mice received an injection 50 µL of PBS alone. After 3 h, blood was collected from the tail veins into heparinized capillaries, and the creatine kinase (CK) activity of the plasma was determined using an UV kinetic assay (CK–Nac[®], Analyticon), and expressed in units/L (Gutiérrez et al., 1986b). In addition, 6 h after the injection, mice were euthanized by CO₂ inhalation, and samples of injected muscle tissue were obtained, fixed in 10% formalin, and processed for histologic evaluation of hematoxylin–eosin stained sections.

2.7.3. Edema-forming activity

Two groups of four mice (18–20 g) received a subcutaneous injection in the footpad, containing 5 µg of Pllans-I or Pllans-II, respectively, in 30 µL of PBS. As negative control group received an identical injection of PBS alone. Footpad thickness was measured at various time intervals (0.5, 1, 3, 6 and 24 h) using a low-pressure spring caliper (Oditest[®], Kroeplin) as described (Lomonte et al., 1993).

2.8. In vitro activities

2.8.1. Phospholipase A₂ activity

The PLA₂ activity of Pllans-I and Pllans-II was assayed on two types of substrates: micellar phosphatidylcholine (PC) and mono-dispersed 4-nitro-3-octanoyloxybenzoic acid (NOBA), a synthetic substrate. For the first, the phenol red colorimetric method described by de Araújo and Radványi (1987) was followed. Various amounts of the enzymes (0.3–5 µg), dissolved in 20 µL of water, were added to 1 ml of substrate (0.25% PC, 10 mM CaCl₂, 0.4% Triton X–100, 0.004% phenol red, dissolved in 0.15 M NaCl) in a thermo-regulated cuvette at 30 °C. The enzyme amounts correspond to a concentration range of 0.006–3 µM. After a stabilization period of 20 s, the decrease in absorbance at 558 nm was monitored continuously for 1 min. One unit of PLA₂ activity was defined as the change of 0.001 in absorbance per min. For the synthetic substrate, various amounts of the enzymes, dissolved in 225 µL of 10 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 0.1 M NaCl, pH 8.0 buffer, were mixed with 25 µL of NOBA (1 mg/ml in acetonitrile; Holzer and Mackessy, 1996) and incubated at 37 °C for 60 min. The final concentrations corresponded to 0.008–4 µM. The reaction product was colorimetrically quantified at 405 nm in a microplate reader, and the activity was expressed as the final change in absorbance × 1000. The two enzymes were compared on a weight basis, considering that this results in a comparable number of active subunits for either the monomeric or dimeric forms. Both assays were performed in triplicates.

2.8.2. Anticoagulant activity

Aliquots of 0.2 ml of citrated (3.8% v/v) human plasma were dispensed into glass tubes and incubated in a water bath for 5 min at 37 °C. Then, 50 µL of Pllans-I and Pllans-II solutions in PBS containing 5 or 40 µg of each enzyme were added (final concentrations of 4 and 32 µM), respectively, and further incubated for 10 min at 37 °C. Finally, 50 µL of 0.25 M CaCl₂ were added and the clotting time was determined. Negative control tubes contained

plasma incubated with PBS only. Assays were performed in duplicate.

2.8.3. Cytotoxicity

The murine myoblast cell line C2C12 (ATCC CRL–1772) was grown in DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 1 mM pyruvic acid, penicillin (100 U/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), and amphotericin B (0.25 mg/ml), in a humidified atmosphere with 5% CO₂, at 37 °C, in 96-well plates. When near-confluence was reached, differentiation was induced by lowering the FBS to 1%. After the fusion of myoblasts to generate long, multinucleated myotubes, usually in 3–5 days, the growth medium was removed and 20 µg of Pllans-I or Pllans-II, dissolved in 150 µL of assay medium (DMEM, 1% FBS) were added to the cultures, in triplicate wells. This concentration corresponded to 8 µM, and was selected on the basis of previous studies on related snake venom PLA₂ in the same assay (Lomonte et al., 1999; Mora-Obando et al., 2014b). After 3 h of incubation at 37 °C, a supernatant aliquot (60 µL) was collected from each well and the activity of lactate dehydrogenase (LDH) released from damaged cells was quantified by a UV kinetic assay (LDH–BR Chromatest). Control wells for 0% and 100% reference points consisted of assay medium alone or 0.1% Triton X–100 in assay medium, respectively (Lomonte et al., 1999). Additionally, cell damage was assessed by microscopic observation and recorded with a Cytation3[®] Cell Imaging reader (BioTek).

2.9. Statistical analyses

The significance of differences between the means of two experimental groups was determined by Student's *t*-test, and ANOVA was used for the comparison of mean values from more than two groups, followed by Tukey's post-test using the Prism[®] software (GraphPad), where *p* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Biochemical characterization of Pllans-I and Pllans-II

The RP–HPLC fractionation of *P. l. lansbergii* venom is shown in Fig. 1. The peaks eluting at ~53 and ~60 min had been identified as PLA₂s in a previous proteomic study on this venom (Jiménez-Charris et al., 2015). These proteins were named Pllans-I and Pllans-II, respectively. When analyzed by SDS–PAGE, both proteins migrated as single bands of ~14 kDa under reducing conditions (Fig. 2). In the unreduced state, Pllans-I showed a smear of higher order aggregates, in addition to the 14 kDa band, whereas Pllans-II migrated as a 14 kDa band, indicating its monomeric nature (Fig. 2). The electrophoretic mobilities of Pllans-I and Pllans-II are consistent with their observed isotope-averaged molecular masses of 14,136 ± 3 Da and 13,901 ± 1 Da, respectively, as determined by ESI–MS (Fig. 3). The mass spectrum of Pllans-II revealed the presence of an additional, slightly less intense ion peak of 13,959 Da (Fig. 3D), which was interpreted to correspond to a closely related isoform, or to an adduct of +58 Da.

Partial amino acid sequences of the two enzymes were obtained by *de novo* MS/MS sequencing of proteolytic peptides, which determined 75 and 49 residues of Pllans-I and Pllans-II, respectively (Fig. 4). Considering that venom PLA₂s of vipers generally consist of 121–123 amino acid residues, the sequence coverage obtained for Pllans-I and Pllans-II would represent ~62% and ~40%, respectively. The presence of aspartic acid at position 49 (in the common numbering system) was confirmed in both proteins (Fig. 4), in agreement with the proteome data reported earlier (Jiménez-Charris et al., 2015). The His48/Asp49 dyad is a conserved characteristic of enzymatically active snake venom PLA₂s and,

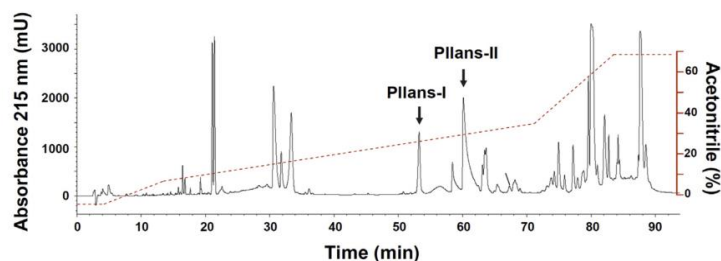


Fig. 1. Isolation of Pllans-I and Pllans-II from the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii*. Venom (2 mg) was separated by reverse-phase HPLC on a C_{18} column (4.6×250 mm) eluted with a gradient from water to acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid (dashed line) and monitored at 215 nm, as described in **Materials and Methods**. The elution times of Pllans-I and Pllans-II (arrows) correspond to 53 min and 60 min, respectively.

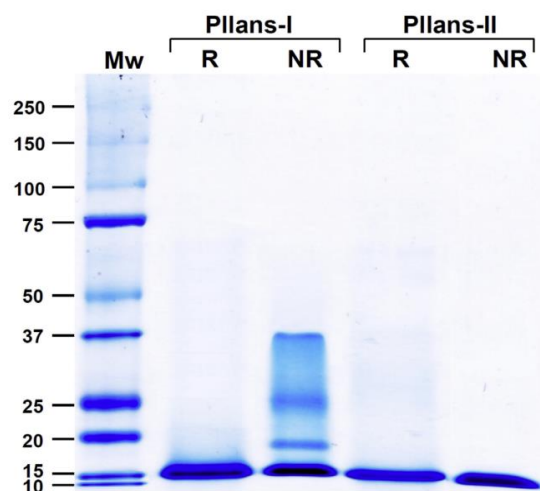


Fig. 2. Electrophoretic analysis of Pllans-I and Pllans-II by SDS–PAGE. Samples were run under non-reducing (NR) conditions or after reduction (R) with 2-mercaptoethanol in a 12% gel, and stained with Coomassie blue R-250. Molecular weight markers (Mw), in kDa, are labeled in the left lane.

accordingly, Pllans-I and Pllans-II displayed PLA_2 activity when tested on substrates of either micellar or monodisperse form, with no significant differences between them in each case (Fig. 5).

Alignment of the partial amino acid sequences of Pllans-I and Pllans-II with related PLA_2 s from viperids revealed their homology with two different groups. Pllans-I is most similar to basic PLA_2 s, whereas Pllans-II groups together with acidic PLA_2 s (Fig. 4). Both enzymes display several differences in their partial sequence alignment with related homologues, as shown by the intermediate identity values obtained, 59–62% for Pllans-I and 45–48% for Pllans-II (Fig. 4).

3.2. Lack of immunochemical recognition of Pllans-I and Pllans-II by antibodies to a *Bothrops* PLA_2 myotoxin

Gel immunodiffusion evidenced that neither of the two isolated PLA_2 s from *P. l. lansbergii* venom was immunoprecipitated by rabbit antibodies to *B. asper* myotoxin II (Fig. 6). Positive control wells confirmed the ability of these antibodies to generate, as expected, a clear precipitin line against the homologous antigen.

3.3. Functional profiles of Pllans-I and Pllans-II

Striking differences were observed in the comparison of the toxic functional profiles of the two newly isolated enzymes. Pllans-I induced 100% lethality in mice when 5 μ g were administered by intracerebro-ventricular injection, whereas Pllans-II, tested under identical conditions, was not lethal nor caused any evident alterations in the animals. When injected intramuscularly, Pllans-I presented a clear myotoxic effect, inducing a significant increment of plasma CK levels in mice, compared to negative control animals that received PBS alone (Fig. 7A). The local muscle damage induced by Pllans-I was confirmed by histological evaluation, which showed widespread necrosis of fibers around the injection site (Fig. 7C). In sharp contrast, an identical injection of Pllans-II did not increase plasma CK levels above control values (Fig. 7A), and did not induce morphological alterations in muscle tissue (Fig. 7D), indicating its lack of myotoxic activity. The only effect shared between Pllans-I and Pllans-II *in vivo* was the induction of a transient, mild edema in the mouse footpad assay, which vanished 6 h after injection (Fig. 8).

In vitro, Pllans-II did not display anticoagulant activity upon human plasma, unlike Pllans-I. The mean recalcification clotting time of plasma incubated with 40 μ g of Pllans-II was 300 ± 14 s, whereas the negative control plasma incubated with PBS clotted after 188 ± 2 s ($p > 0.05$). Under identical conditions, Pllans-I prolonged clotting time to more than 2400 ± 4 s ($p < 0.05$). An additional functional difference recorded for these two PLA_2 s was observed in cytotoxicity experiments. Pllans-I produced overt cytolysis of C2C12 myotubes 3 h after the addition of 20 μ g to cells, as determined by the release of LDH (Fig. 9A), which was confirmed by the drastic morphological alterations observed microscopically (Fig. 9B). Pllans-II, in contrast, did not induce cell damage in identical experiments, since the C2C12 myotubes maintained their normal morphology and their supernatants showed the same basal levels of LDH activity in comparison to cells exposed only to assay medium (Fig. 9C).

3.4. Enhancement of the myotoxic effect of Pllans-I by Pllans-II

The possibility of a synergistic action of Pllans-II toward the myotoxic effect of Pllans-I was explored by combining these two enzymes prior to their intramuscular injection. When 25 μ g of Pllans-II were injected together with 25 μ g of Pllans-I, skeletal muscle damage was significantly increased in comparison to the injection of 25 μ g of Pllans-I alone, and reached a value similar to that induced by 50 μ g of Pllans-I (Fig. 10). Therefore, although Pllans-II lacks an intrinsic myotoxicity, it is able to enhance the myotoxic effect caused by Pllans-I.

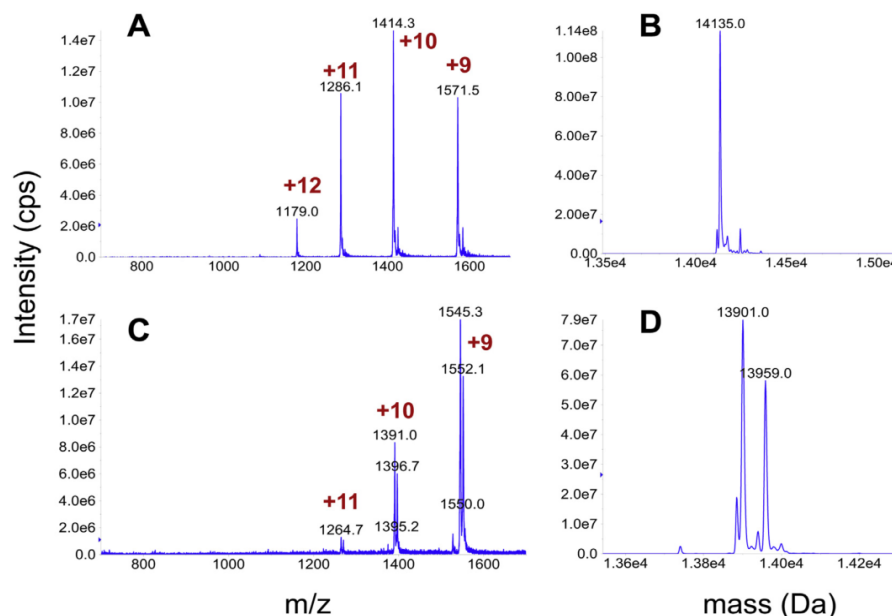


Fig. 3. Isotope-averaged molecular mass of Pllans-I and Pllans-II, as determined by nano-electrospray ionization mass spectrometry (nESI-MS). Proteins were analyzed by direct infusion in a QTrap3200 mass spectrometer at 1200 V, in positive enhanced multi-charge mode, as described in Methods. The multiply-charged ion series for (A) Pllans-I and (C) Pllans-II are deconvoluted in panels (B) and (D), respectively.

4. Discussion

PLA₂s represent one of the most abundant components of snake venoms, showing a notable variety of toxic activities in spite of structural constraints imposed by their conserved, disulfide-rich scaffold (Kini, 2003; Magro et al., 2004). Venoms of many viperid species often contain different combinations of PLA₂s, which may include both acidic and basic enzyme variants, as well as basic, catalytically inactive variants referred to as PLA₂ homologues (or PLA₂-like) proteins (Lomonte et al., 2009; Lomonte and Rangel, 2012), encoded by a multiplicity of genes. The structural details that determine particular activities of different venom PLA₂s have been difficult to define, and mostly remain a challenge (Gutiérrez and Lomonte, 2013). By comparatively characterizing new PLA₂ variants from the large biodiversity of venomous snakes, it may be possible to gain insights into their determinants of toxicity, and to infer general functional trends on the basis of grouping by shared structural features.

As a follow-up of a proteomic study on the venom of *P. l. lansbergii* from Colombia (Jiménez-Charris et al., 2015), we characterized its two most abundant PLA₂s. Pllans-I and Pllans-II represent approximately 3.0% and 10.8%, respectively, of the total venom proteins. Molecular masses observed by ESI-MS, together with electrophoretic mobilities in SDS-PAGE, indicate that Pllans-II exists as a monomer, in similarity with other acidic PLA₂s characterized from viperid venoms (Fernández et al., 2010; Silveira et al., 2013; Van der Laet et al., 2013), whereas Pllans-I tends to form higher order aggregates, following the same trend observed for many basic PLA₂s of this family of snakes mostly found as homodimers (Suzuki et al., 1995; Angulo et al., 2000; dos Santos et al., 2011). Although homodimers have commonly been observed in crystallographic studies, these basic PLA₂s may exhibit a dynamic

association-dissociation equilibrium that includes trimers or even higher associations in solution, as evidenced by the electrophoretic results here presented (Fig. 2).

Alignment of the partial amino acid sequences of Pllans-I and Pllans-II with related proteins revealed the similarity of Pllans-I with basic PLA₂s, and of Pllans-II with acidic PLA₂s. In agreement with the presence of Asp49 (a key residue of the active site of PLA₂s) in their sequence, both Pllans-I and Pllans-II displayed catalytic activity, which was similar between them when assayed on either micellar (PC) or monodisperse (NOBA) substrates.

In spite of their similar catalytic efficiency, marked differences were evidenced when the two enzymes were functionally characterized. Pllans-I displayed conspicuous toxic effects in mice, including myotoxicity and lethality by intracerebro-ventricular route. As well, Pllans-I exerted anticoagulant activity *in vitro*, and cytotoxicity upon cultured myotubes. In contrast, Pllans-II was devoid of all these *in vivo* and *in vitro* activities. The only effect shared by the two enzymes was the induction of a mild, transient edema in the mouse footpad assay, a common characteristic of secreted PLA₂s obtained from a variety of sources, including some non-toxic enzymes such as the porcine pancreatic PLA₂ (Cirino et al., 1989; Lloret and Moreno, 1993; Landucci et al., 2000). These findings are in agreement with the notion that, although PLA₂ activity plays an indispensable role in the toxic effects displayed by Asp49 snake venom enzymes (Rosenberg, 1986; Kini, 2003; Rossetto and Montecucco, 2007; Mora-Obando et al., 2014a), it is not sufficient to induce toxicity *per se*. Additional steps needed for the toxicity of PLA₂s must involve the recognition and interfacial interaction with appropriate biological targets (Montecucco et al., 2008), thus explaining why there are PLA₂s that are highly active in catalyzing phospholipid hydrolysis in commonly used 'artificial' assays, but are unable to induce toxicity

A

Pllans-I	<i>P. l. lansbergii</i>	-----NAIPYAFYGCYCGKGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYE-----	Id	n	pI
Q02517	<i>P. flavoviridis</i>	HLLQFRKMIKKMTGKEPIVSYAFYGCYCGKGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYEKVTGCDP	62	122	8.18
-----	<i>P. hyoprora</i>	NLLQFNKMIKKETGKNAIPFYAFYGCYCGWGGRGKPKDKTDRCCFVHDCCYGKLTGC-P	61	123	8.18
O42187	<i>A. h. pallas</i>	HLLQFRKMIKKMTGKEPVVSYAFYGCYCGSGGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYEKVTGCDP	60	122	8.61
P62022	<i>C. d. terrificus</i>	HLLQFNKMIKFETRKNAPFYAFYGCYCGWGGRGKPKDAT-DRCCFVHDCCYGKLAKCNT	59	122	8.74

Pllans-I	KWDYTYTYGT-----WCEEQVCECDKAAAIICFR-----YMAYPDIFCTD-----	Id	n	pI
Q02517	KWDYTYTYSENGDIVCGGDNPCCKEVCCECDKAAAIICFRDNLKTYK-KRYMTFPDIFCTDPTKEC	62	122	8.18
-----	KWDIYTPSLKSGYITCGKGTWCCEEQICECDRAAAIICFRDNLTYNKYGYMFYPSRCKGPSEQC	61	123	8.18
O42187	KWDDYTYSWKNGTIVCGGDDPCCKEVCCECDKAAAIICFRDNLKTYK-KRYMAYPDILCSSKSEKC	60	122	8.61
P62022	KWDIYTPSLKSGYITCGKGTWCCEEQICECDRAAAIICFRDNLKTYK-KRYMAYPDILCSSKSEKC	59	122	8.74

B

Pllans-II	<i>P. l. lansbergii</i>	-----SYSAYGCYCGW-----CCIVHDCCYGK-----	Id	n	pI
AID56660	<i>G. intermedius</i>	HLMQFETLIMKVAKSGMFWYSAYGCYCGWGGQGRPDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPK	48	124	4.62
Q2PG83	<i>P. elegans</i>	GLWQFENMIMKVAKSGILSYSAYGCYCGWGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPK	47	122	5.81
P06859	<i>P. flavoviridis</i>	GLWQFENMIMKVAKSGILSYSAYGCYCGWGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPK	47	122	6.70
P00623	<i>C. adamanteus</i>	SLVQFETLIMKVAKSGLLWYSAYGCYCGWGGHGRPDATDRCCFVHDCCYGKATDCNPK	45	122	4.91

Pllans-II	-----QVCECDKAAAIICFRDNLIDTYDYTYWR-----	Id	n	pI
AID56660	WDDYTYSENGDIVCGGDDPCCKEVCCECDKAAAIICFRDNLTYDGDYTYWRFTKNCVPESEPC	48	124	4.62
Q2PG83	LGKTYTISENGDIICGGDGPCCK-EVCECDRAAAIICFRDNLTYDRKTYWKYPASNCQE-DSEPC	47	122	5.81
P06859	LGKTYTISWNGDIVCEGDGPCCK-EVCECDRAAAIICFRDNLTYDRNKTYWRYPASNCQE-DSEPC	47	122	6.70
P00623	TVSYTYSENGEIVCGGDDPCGTQICECDKAAAIICFRDNLPSYDN-KYWLFPKNCRE-EPEPC	45	122	4.91

Fig. 4. Multiple alignment of (A) Pllans-I and (B) Pllans-II partial amino acid sequences with homologous phospholipases A_2 from snake venoms. The UniProtKB access codes for the basic and acidic enzyme sequences are shown in blue and red, respectively. The sequence of *Porthidium hyoprora* PhTx-II was taken from Huancahuire-Vega et al. (2014). Sequences were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004) with the MEGA v6.06 software. Identical amino acid positions are shaded in gray, with cysteine residues in boldface. The conserved His/Asp pair in positions 48/49, characteristic of enzymatically active PLA_2 s, is highlighted in yellow. Isoelectric points (pI) were calculated with "Compute pI/MW" tool (web.expasy.org/compute_pi/), and % identity values (Id) were calculated on the basis of the numbers of amino acids (n) determined for the partial sequences of Pllans-I (n = 75) and Pllans-II (n = 49), respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

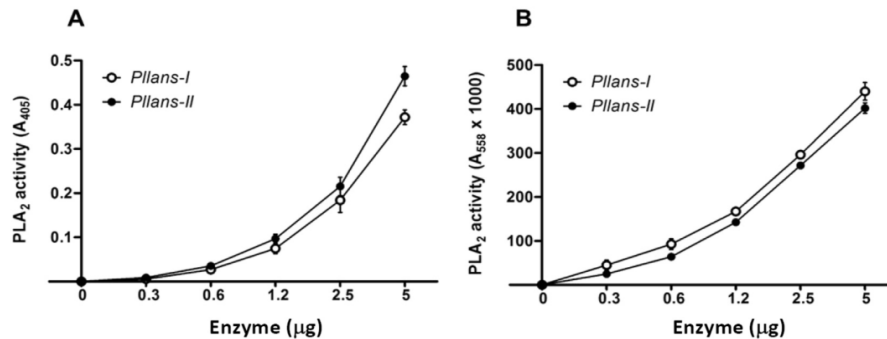


Fig. 5. Phospholipase A_2 activity of Pllans-I (○) and Pllans-II (●) assayed on monodisperse 4-nitro-3octanoyloxy-benzoic acid (A), or on micellar phosphatidylcholine (B) substrates. Each point represents mean $\pm$ SD (n = 3). In some points, SD bars are smaller than symbol size. Differences between Pllans-I and Pllans-II are not statistically significant (p > 0.05). The absolute enzyme amounts added to the assay system correspond to concentrations in the range of (A) 0.006–3 μ M, and (B) 0.008–4 μ M as described in Methods.

in biological systems. Despite the appealing simplicity of this concept, progress in the identification of the key biological targets for the toxic actions of venom PLA_2 s has been very limited (Sribar and Krizaj, 2011; Gutiérrez and Lomonte, 2013).

The divergent functional characteristics of Pllans-I and Pllans-II add further evidence to a growing trend observed for snake venom

PLA_2 s, namely, that major toxic effects are highly biased towards the basic variants. With few exceptions, acidic enzymes display low toxicity *in vivo*, being in many cases completely harmless in common bioassays (Fernández et al., 2010; García Denegri et al., 2010; Vargas et al., 2012; Van der Laat et al., 2013; Marques et al., 2015). In agreement with this trend, the basic Pllans-I displayed a

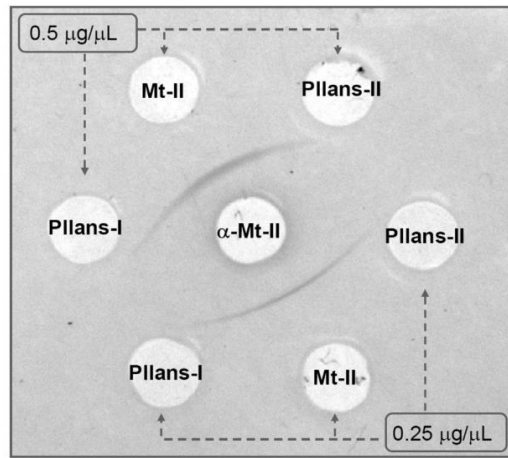


Fig. 6. Lack of immunochemical cross-recognition of PIIans-I and PIIans-II by rabbit antibodies (α -Mt-II) raised against myotoxin II from the venom of *Bothrops asper*, by gel immunodiffusion. The antibodies produce a clear precipitin line against their homologous antigen (Mt-II), but not against the basic (PIIans-I) or acidic (PIIans-II) phospholipases A₂ from *Porthidium l. lansbergii*.

functional profile typical of Asp49–PLA₂ myotoxins of viperids, including several toxic activities, whereas the acidic PIIans-II was devoid of toxicity in the same assays. Importantly, the possibility that apparently innocuous acidic PLA₂s variants such as PIIans-II may be toxic to particular animals other than rodents, or that

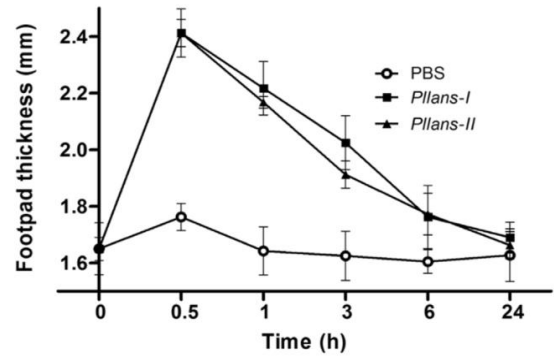


Fig. 8. Edema-forming activity of PIIans-I and PIIans-II. Mice received a subcutaneous injection containing 5 µg of each enzyme in 30 µL of PBS, in the footpad. A control group received the same volume of PBS alone. Footpad thickness was measured at different times, as described in Materials and Methods. Each point represents mean $\pm$ SD ($n = 4$). Differences between PLA₂s and PBS at 0.5, 1, and 3 h are statistically significant ($p < 0.05$).

they may have yet unknown functionalities unrelated to toxicity, cannot be ruled out. For example, two non-toxic, acidic PLA₂ isolated from the venoms of *Bothrops jararacussu* (BthA-I–PLA₂; Roberto et al., 2004) or *Porthidium nasutum* (PnPLA₂; Vargas et al., 2012) have been shown to exert bactericidal activity. Thus, at least some acidic PLA₂s could be functionally relevant to the defense of venom glands against bacterial infections, rather than to toxicity.

An additional consideration is that some catalytically-active PLA₂s may have a synergistic role when acting in combination

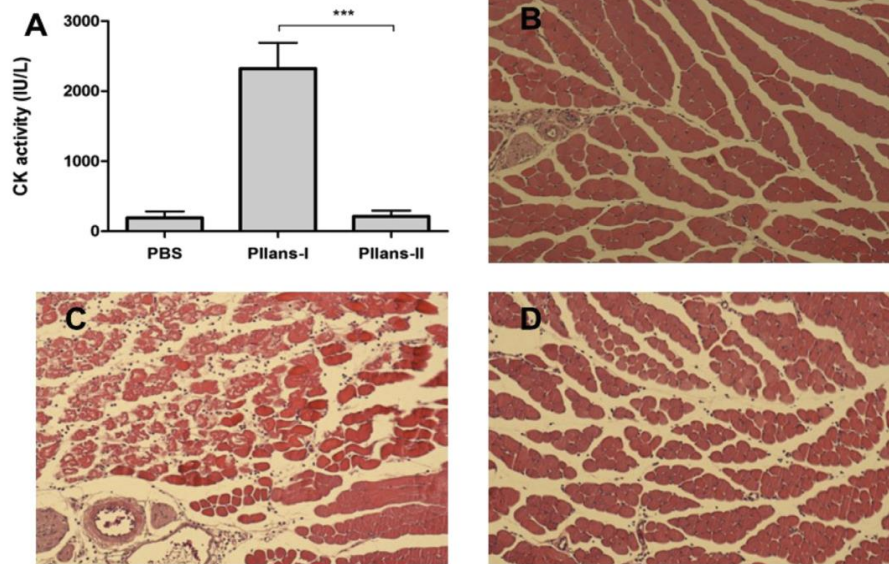


Fig. 7. Evaluation for myotoxic activity of PIIans-I and PIIans-II after intramuscular injection in mice. (A) Plasma creatine kinase (CK) activity was determined 3 h after the injection of 50 µg of each protein, in 50 µL of phosphate-buffered saline (PBS). PBS alone was injected in a control group. Bars represent mean $\pm$ SD ($n = 4$). The difference between PIIans-I and PIIans-II enzymes (***), is statistically significant ($p < 0.05$) by Student's *t*-test. Skeletal muscle sections from the injected areas were obtained 6 h after the i.m. injection of PBS (B), PIIans-I (C), or PIIans-II (D) and stained with hematoxylin-eosin for histological evaluation. In agreement with the CK activity data shown in (A), widespread necrosis of muscle fibers is observed for PIIans-I (C), whereas injection of PBS (B) or PIIans-II (D) did not induce histological alterations in the tissue.

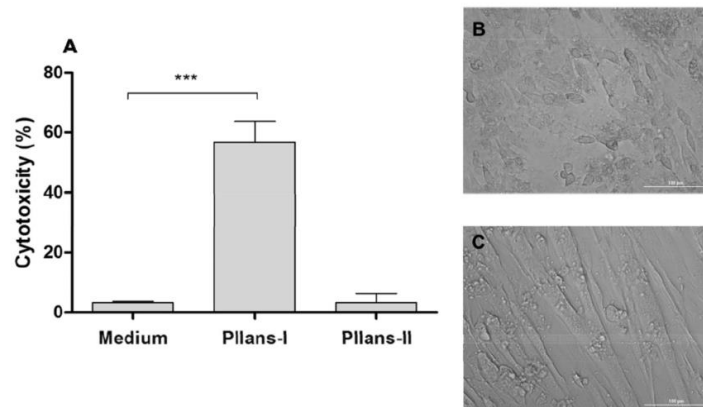


Fig. 9. Cytotoxic activity of Pllans-I and Pllans-II upon murine skeletal muscle C2C12 myotubes. (A) Cells were exposed to 20 μg of each enzyme in 150 μL of assay medium (8 μM final concentration), or to medium alone, and after 3 h the lactate dehydrogenase (LDH) released to the supernatants was determined, as described in Materials and Methods. Cytotoxicity is expressed as percentage, considering the LDH released by cells exposed to 0.1% Triton X-100 as 100%. Bars represent mean $\pm$ SD ($n = 3$). The difference between Pllans-I and medium (***) is statistically significant ($p < 0.05$). Microscopic assessment of morphological changes in myotubes exposed to Pllans-I (B) or Pllans-II (C). In agreement with the cytotoxicity data shown in (A), drastic alterations and loss of the elongated structure of myotubes is observed in (B), whereas no morphological alterations in myotubes are evidenced in (C).

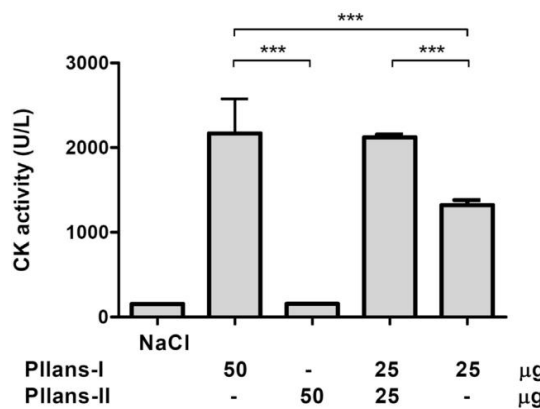


Fig. 10. Synergism in the myotoxic activity of Pllans-I when combined with Pllans-II before intramuscular injection in mice. The addition of 25 μg of Pllans-II to 25 μg of Pllans-I leads to a significantly higher level of creatine kinase (CK) activity in the plasma of mice 3 h after injection, as compared to the injection of 25 μg of Pllans-I alone, reaching a value similar to that induced by 50 μg of Pllans-I. Asterisks (***) indicate statistically significant ($p < 0.05$) differences between the bars. Each bar represents mean $\pm$ SD of four animals.

with Lys49 PLA₂-like variants (Cintra-Francischinelli et al., 2009; Mora-Obando et al., 2014b) or even with other types of venom components such as metalloproteinases (Bustillo et al., 2012, 2015). In the present study, it was found that the non-toxic Pllans-II enhanced by two-fold the myotoxic action of Pllans-I in mice, demonstrating a synergism between these two types of PLA₂. Although the mechanism underlying this enhancement remains to be investigated, such synergism may provide at least a partial explanation to rationalize the presence of a considerable amount (10.8% of the total proteins) of an apparently innocuous PLA₂s in the venom of *P. l. lansbergii*, Pllans-II, which is nearly three-fold more abundant than the myotoxic Pllans-I. Additionally, the possibility that Pllans-II might have antibacterial properties similar to those of

BthA-I-PLA₂ (Roberto et al., 2004) or PnPLA₂ (Vargas et al., 2012), an activity that was not explored in this work, remains to be studied.

The basic PLA₂ Pllans-I displayed typical characteristics and toxic activities of other Asp49 PLA₂ myotoxins of viperid venoms. Therefore, its possible antigenic relationship with the latter was evaluated, using antibodies to myotoxin II, a Lys49-PLA₂ homologue from *Bothrops asper*, as a probe. Previous studies have shown that polyclonal (Lomonte and Gutiérrez, 1989) and monoclonal (Lomonte and Kahan, 1988) antibodies raised against basic PLA₂ myotoxins from *B. asper* venom cross-recognize both Asp49 and Lys49 variants, as well as a large number of structurally related myotoxic PLA₂s present in venoms from different viperid species within the genera *Bothrops*, *Protobothrops* (*Trimeresurus*), *Atrypoides*, *Cerrophidion*, *Bothriechis*, and *Agkistrodon* (Lomonte et al., 1987, 1990), several of which have been isolated and characterized as myotoxins (Moura-da-Silva et al., 1990; Lomonte et al., 1990; Gutiérrez and Lomonte, 1995). The lack of immunoprecipitation of Pllans-II, when confronted against antibodies to myotoxin II could be expected, since it has been described that acidic PLA₂s from viperids form a different antigenic group from basic PLA₂s (Fernández et al., 2010; Van der Laat et al., 2013). However, the lack of recognition of Pllans-I by antibodies to myotoxin II is more surprising, given the functional similarities of these two proteins. This finding suggests that the basic venom PLA₂s of *Porthidium* species might represent a new antigenic group, different from the basic counterparts present in many viperid venoms that are readily cross-recognized by these antibodies, a hypothesis that will be addressed in future work.

In conclusion, the two most abundant PLA₂s of *P. l. lansbergii* venom were characterized. Pllans-I was shown to be a basic, Asp49 PLA₂ myotoxin, whereas Pllans-II was characterized as an acidic, Asp49 PLA₂ apparently devoid of toxic effects, but capable of enhancing the myotoxicity of Pllans-I. Altogether, results are consistent with the notion that acidic and basic PLA₂s of viperids display highly divergent functional profiles, with toxic activities being largely biased towards the basic enzyme variants. Additionally, these findings underscore the relevance of evaluating potential synergistic actions in the functional characterization of the

multiple PLA₂ variants that may coexist in the same venom, to better understand their roles within the context of the effects induced by whole venoms.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this study.

Acknowledgments

Financial support provided by COLCIENCIAS (Programa Nacional de Formación de Investigadores—Becas Colciencias No. 567–2012), The School of Basic Sciences, Faculty of Health (Universidad del Valle), and Vicerrectoría de Investigación (Universidad de Costa Rica; 741–B3–760) is gratefully acknowledged. We also thank Raul Charris Morales—MVZ and Eliécer Jiménez Vargas, for their help in the collection of venom samples, Beatriz De arco for her help in amino acid sequence alignments, Mauricio Arango for his help in mice manipulation, and the staff of Instituto Clodomiro Picado, especially Diana Mora, Daniela Solano, Juan Manuel Ureña, Gabriela Solano, and Drs. Julián Fernández and José María Gutiérrez for their collaboration. This study was performed as part of the Ph.D. thesis of E. Jiménez at Universidad del Valle (Calí, Colombia).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.006>.

References

- Angulo, Y., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D., Lomonte, B., 2000. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 63–71.
- Arni, R.K., Ward, R.J., 1996. Phospholipase A₂ — a structural review. *Toxicon* 34, 827–841.
- Bustillo, S., Gay, C.C., García Denegri, M.E., Ponce-Soto, L.A., Bal de Kier Joffe, E., Acosta, O., Leiva, L.C., 2012. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SP11 RP4 PLA₂ from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon* 59, 338–343.
- Bustillo, S., García-Denegri, M.E., Gay, C., Van de Velde, A.C., Acosta, O., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Leiva, L., 2015. Phospholipase A₂ enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chem-Biol. Interact.* 240, 30–36.
- Calvete, J.J., Juárez, P., Sanz, L., 2007. Snake venomomics. Strategies and applications. *J. Mass Spectrom.* 42, 1405–1414.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates, New York.
- Cintra-Francischini, M., Pizzo, P., Rodrigues-Simioni, L., Ponce-Soto, L., Rossetto, O., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Pozzan, T., Montecucco, C., 2009. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1718–1728.
- Cirino, G., Peers, S.H., Wallace, J.L., Flower, R.J., 1989. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.* 166, 505–510.
- de Araújo, A.L., Radvanyi, F., 1987. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25, 1181–1188.
- dos Santos, J.J., Cintra-Francischini, M., Borges, R.J., Fernandes, C.A.H., Pizzo, P., Cintra, A.C.O., Braz, A.S.K., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., 2011. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. *Proteins* 79, 61–78.
- Doley, R., Zhou, X., Kini, R.M., 2010. Snake venom phospholipase A₂ enzymes. In: Mackessy, S.P. (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 173–205.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Fernández, J., Gutiérrez, J.M., Angulo, Y., Sanz, L., Juárez, P., Calvete, J.J., Lomonte, B., 2010. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. *Biochimie* 92, 273–283.
- García Denegri, M.E., Acosta, O.C., Huancachuire-Vega, S., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., Maruñak, S.L., Teibler, G.P., Leica, L.C., Ponce-Soto, L.A., 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SP11 RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 56, 64–74.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A₂: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., Cerdas, L., 1986a. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C. Comp. Pharmacol.* 84, 159–164.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Cerdas, L., 1986b. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* 24, 885–894.
- Holzer, M., Mackessy, S.P., 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34, 1149–1155.
- Huancachuire-Vega, S., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., 2011. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A₂ isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 154, 108–119.
- Huancachuire-Vega, S., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., 2014. PhTX-II a basic myotoxic phospholipase A₂ from *Porthidium hyoprora* snake venom, pharmacological characterization and amino acid sequence by mass spectrometry. *Toxins* 6, 3077–3097.
- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F., Fierro-Pérez, L., Lomonte, B., 2015. Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hog-nose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *J. Proteomics* 114, 287–299.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275–282.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 42, 827–840.
- Kini, R.M., 2005. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. *Toxicon* 45, 1147–1161.
- Landucci, E.C.T., Toyama, M., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., de Nucci, G., 2000. Effect of crotoxin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 38, 199–208.
- Lloret, S., Moreno, J.J., 1993. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* 31, 949–956.
- Lomonte, B., Kahan, L., 1988. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. *Toxicon* 26, 675–689.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27, 725–733.
- Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520–530.
- Lomonte, B., Moreno, E., Gutiérrez, J.M., 1987. Detection of proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxin in crotaline snake venoms. *Toxicon* 25, 947–955.
- Lomonte, B., Furtado, M.F., Rovira, M.E., Carmona, E., Rojas, G., Aymerich, R., Gutiérrez, J.M., 1990. South American snake venom proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23, 427–435.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93–105.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P., Gutiérrez, J.M., 1999. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon* 37, 145–158.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotaline snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., 2009. The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein Pept. Lett.* 16, 860–876.
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W.C., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2012. Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: toxicological and taxonomical insights. *J. Proteomics* 75, 1675–1689.
- Lomonte, B., Tsai, W.C., Ureña-Díaz, J.M., Sanz, L., Mora-Obando, D., Sánchez, E.E., Fry, B.G., Gutiérrez, J.M., Gibbs, H.L., Sovic, M.G., Calvete, J.J., 2014. Venomomics of New World pit vipers: genus-wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. *J. Proteomics* 96, 103–116.
- Magro, A.J., Murakami, M.T., Marcussi, S., Soares, A.M., Arni, R.K., Fontes, M.R., 2004. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 323, 24–31.
- Marques, P.P., Esteves, A., Lancellotti, M., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., 2015. Novel acidic phospholipase A₂ from *Porthidium hyoprora* causes inflammation with mast cell rich infiltrate. *Biochem. Biophys. Res. Rep.* 1, 78–84.
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912.
- Mora-Obando, D., Díaz, C., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2014a. Role of enzymatic activity in muscle damage and cytotoxicity induced by *Bothrops asper* Asp49 phospholipase A₂ myotoxins: are there additional effector

- mechanisms involved? PeerJ 2, e569. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.569>.
- Mora-Obando, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2014b. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. PLoS One 9, e109846. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109846>.
- Moura-da-Silva, A.M., Cardoso, D.F., Tanizaki, M., 1990. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. Toxicon 28, 1293–1304.
- Otero, R., 2014. Envenenamiento ofídico. In: Correa, J.A., Gómez, J.F., Posada, R. (Eds.), Fundamentos de Pediatría. Medellín: Fondo Editorial CIB, pp. 73–119.
- Ouchterlony, Ö., Nilsson, L.A., 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M. (Ed.), Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 19.1–19.44.
- Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerdá, J., Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115–129)-peptide identifies its bactericidal region. Eur. J. Biochem. 253, 452–461.
- Paredes, A.E., 2012. Informe del evento accidente ofídico final año 2012. Vigilancia y Control en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud, Colombia.
- Roberto, P.G., Kashima, S., Marcussi, S., Pereira, J.O., Astolfi-Filho, S., Nomizo, A., Giglio, J.R., Fontes, M.R., Soares, A.M., França, S.C., 2004. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. Protein J. 23, 273–285.
- Rosenberg, P., 1986. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: Harris, J.B. (Ed.), Natural Toxins. Clarendon Press, Oxford, pp. 129–174.
- Rossetto, O., Montecucco, C., 2007. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. Handb. Exp. Pharmacol. 184, 129–170.
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. Science 250, 1541–1546.
- Silveira, L.B., Marchi-Salvador, D.P., Santos-Filho, N.A., Silva Jr., F.P., Marcussi, S., Fuly, A.L., Nomizo, A., da Silva, S.L., Stábeli, R.G., Arantes, E.C., Soares, A.M., 2013. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. J. Pharm. Biomed. Anal. 73, 35–43.
- Šribar, J., Krizaj, I., 2011. Secreted phospholipases A₂ – not just enzymes. Acta Chim. Slov 58, 678–688.
- Suzuki, A., Matsueda, E., Yamane, T., Ashida, T., Kihara, H., Ohno, M., 1995. Crystal structure analysis of phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake) venom at 1.5 resolution. J. Biochem. 117, 730–740.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729.
- Van der Laat, M., Fernández, J., Durban, J., Villalobos, E., Camacho, E., Calvete, J.J., Lomonte, B., 2013. Amino acid sequence and biological characterization of BlatPLA₂, a non-toxic acidic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis lateralis* from Costa Rica. Toxicon 73, 71–80.
- Vargas, L.J., Londoño, M., Quintana, J.C., Rua, C., Segura, C., Lomonte, B., Núñez, V., 2012. An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. Comp. Biochem. Physiol. B – Biochem. Mol. Biol. 161, 341–347.

***Paper 3: Antitumor potential of
Pllans-II, an acidic Asp49-PLA₂
from Porthidium lansbergii
lansbergii snake venom on
human cervical carcinoma HeLa
cells***



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Antitumor potential of *Pllans-II*, an acidic Asp49–PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells

Eliécer Jiménez-Charris^{a,*}, Daiana Silva Lopes^b, Sarah Natalie Cirilo Gimenes^b, Samuel Cota Teixeira^c, Leonel Montealegre-Sánchez^a, Luis Solano-Redondo^d, Leonardo Fierro-Pérez^e, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila^{b,**}

^a Grupo de Nutrición, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

^b Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brazil

^c Laboratório de Tripanosomatídeos, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brazil

^d Grupo Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle, Cali, Colombia

^e Grupo Farmacología Univalle, Universidad del Valle, Cali, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2018

Received in revised form 5 September 2018

Accepted 10 September 2018

Available online xxxx

Keywords:

Porthidium lansbergii lansbergii

Phospholipase A₂

Antitumor activity

ABSTRACT

This work shows for the first time the antitumoral and angiostatic potential effects of *Pllans-II*, an acidic monomeric Asp49–PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on HeLa cells. *Pllans-II* exhibited a predominant dose-dependent cytotoxicity on cervical carcinoma HeLa cells more than human breast cancer MCF7 and MDA–MB–231 cells. Interestingly, *Pllans-II* showed negligible effect *in vitro* on normal cells such as MCF 10A, a non-tumorigenic breast epithelial cell and endothelial cells–HUVEC. Besides, *Pllans-II* induced a significant cell cycle arrest in G1 phase of treated HeLa. Flow Cytometry analysis showed that *Pllans-II* induced both early and late apoptosis on HeLa cells, verified by the modulation of important genes mediators of apoptosis pathways such as CASP8, BCL2L1, BCL2, BAX, BAD and BIRC5, showing a possible apoptotic cell death triggered through extrinsic pathways. *Pllans-II* was also able to inhibit cell migration on HeLa cells by interfering with α5 and β1-containing integrins. In addition, *Pllans-II* inhibited *in vitro* angiogenesis on endothelial HUVEC cells through VEGF-independent pathway. Our results display that *Pllans-II* is able to be an anticancer target for the development of a new antitumoral prototype.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cervical cancer (CC) is the second most common cancer in less developed regions after breast cancer [1]. According to the Liga Contra el Cancer in Colombia, it is both the second most frequent cancer and cause of death in women. About 4.661 new cases are diagnosed each year, and 1.986 women die by this consequence. In 5 years a total of 15.104 new cases are estimated [2]. Therefore, CC continues to be a public health problem in Colombia, imposing a challenge for the health

system, in the generation of timely, effective and articulated interventions to reduce incidence and mortality, whose control must be prioritized through new and efficient treatments.

In all types of cancer and in particular, CC generates a set of alterations that induce a common effect, cell death resistance process by apoptosis. Thus, the reactivation of apoptosis has become a major target for cancer cells elimination. Although, it is true that the first-line treatment against CC is surgical treatment [3–5], and in more advanced stages, the treatment usually combines radiotherapy and chemotherapy [6,7]; unfortunately, this type of cancer can re-emerge after this treatment and patients often give up treatment in order to avoid the decrease of life quality. Therefore, with the need to explore new treatment strategies and drugs more effective against CC and harmless on normal cells, new molecules are being investigated that counteract the therapies side effects; and focus on the tumor microenvironment, particularly on the tumor angiogenesis inhibition and the cellular apoptosis induction. Some of these new discoveries are based on proteins from snake venoms [8,9]. Within the most used protein are found:

* Correspondence to: E. Jiménez-Charris, Grupo de Nutrición, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B # 36–00, Edificio 5002, Cali, Colombia.

** Corresponding author.

E-mail addresses: eliecer.jimenez@correounivalle.edu.co (E. Jiménez-Charris), veridiana@ufu.br (V.M. Rodrigues Ávila).

l amino acid oxidase, disintegrins, C-type lectins, metalloproteinases, PLA₂ inhibitor and phospholipases A₂ [10–15].

Secretory PLA₂s from snake venoms (svPLA₂s) have been quite effective in withholding the development of tumor cells of different origins [16]. Many studies have showed that the antitumoral, antimetastatic and antiangiogenic activity from svPLA₂s are independent on its catalytic activity where other mechanisms in which cell surface membrane proteins (e.g., M-Type PLA₂ receptors, or integrins) and intracellular signal transduction pathways take part [9,16–19]. The effects are so prominent that svPLA₂s could be seriously considered as anticancer prototype agents [20].

Recently, a Lys49-PLA₂ isolated from *Bothrops pauloensis* venom, BnSP-6 caused a dose-dependent cytotoxicity and inhibited cell adhesion on human breast cancer MDA-MB-231 cells, along with a lower cytotoxic activity against MCF 10A, a nontumorigenic breast cell line [15]. An acidic svPLA₂ from *Bothrops jararacussu* (BthA-I-PLA₂), and Lys49-PLA₂ (MjTX-1I) from *Bothrops moojeni* showed antitumoral effects upon Human leukemia T, breast adenocarcinoma and Ehrlich ascites tumor [19,21]. Besides, antitumor effect has been shown for crotoxin, a svPLA₂ derived from the venom of *Crotalus durissus terrificus* [22]. Additionally, two svPLA₂ from *Cerastes cerastes* venom, CC-PLA₂-1 and CC-PLA₂-2, were able to inhibit cancerous cell adhesion and migration, along with angiogenesis, both *in vitro* and *in vivo* [23,24]. Despite these findings, there are few studies that have evaluated the svPLA₂ activity on CC cells. Recently, Erzurumlu et al. [25] observed that a phospholipase fraction from *Montivipera bulgardaghica* venom altered the cell cycle of a human cervix adenocarcinoma cell line – HeLa, without inducing apoptosis.

Therefore, in the search for new active drugs for cancer therapy, our research group described the first proteomic analysis of the *Porthidium lansbergii lansbergii* venom [26] and characterized two of the principal catalytically active svPLA₂s type Asp49: a basic (*Pllans-I*) and acidic (*Pllans-II*) phospholipases A₂ [27]. *Pllans-I* induced myonecrosis, edema, and was lethal by intracerebro-ventricular injection in mice, as well as cytolytic and anticoagulant *in vitro*. Interestingly, *Pllans-II* was devoid of these effects, and its cytotoxic activity was significantly lower against murine myoblast cell line C2C12 [27]. Due to the possibility that apparently acidic svPLA₂s such as *Pllans-II*, may be innocuous to rodent or human normal cells as we saw in this research, and since it has not yet been investigated in relation to its therapeutic potential; we evaluated the cytotoxic effects of *Pllans-II* against different cancer cell lines such as MDA-MB-231 and MCF7, both human breast cancer cell, and HeLa cell line, a human cervix adenocarcinoma. Besides, we assessed *Pllans-II* toxicity on MCF 10A, a non-tumorigenic breast epithelial cell line, and on human umbilical vein endothelial cells – HUVEC. As a result of that, herein we showed for the first time that *Pllans-II* displayed more cytotoxic affinity for HeLa cells than breast cancer and non-tumorigenic cell. Therefore, the study also assessed the cell death mechanism of *Pllans-II* on HeLa cells and the anti-metastatic capacity by evaluating its effect on neoplastic processes, such as cell migration and angiogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Venom

Porthidium lansbergii lansbergii venom was obtained from specimens collected in three municipalities of the Atlantic Department, Colombia: Juan de Acosta, Piojó and Baranoa. Snakes were released after collection of their samples, which were pooled, centrifuged to remove debris, dried in a vacuum centrifuge, and stored at –20 °C until their use. Collecting authorization for wild species of biological diversity for non-commercial scientific research purposes was provided by Corporación Autónoma Regional del Atlántico – C.R.A., Resolution No. 000187, 2015.

2.2. *Pllans-II* purification

Pllans-II isolation was performed according reverse-phase HPLC conditions described by Jiménez-Charris et al. [27] with some modifications. In brief, aliquots of venom (2 mg) were separated in a Zorbax SB-C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm particle diameter; Agilent) eluted at 1 mL/min with a gradient from H₂O/0.1% trifluoroacetic acid (TFA) to acetonitrile/0.1% TFA. The eluent was monitored at 215 nm in an Agilent 1260 Infinity chromatograph using the EZ CHROM ELITE software (Agilent Technologies, Inc. 2006). The target svPLA₂ fraction was collected manually, dried by vacuum centrifugation, and stored at –20 °C.

2.3. Cell culture

MDA-MB-231 and MCF7, both human breast cancer cell, HeLa cell line, a cervix adenocarcinoma, MCF 10A, a non-tumorigenic breast epithelial cell line, and the Human Umbilical Vein Endothelial Cells–HUVEC were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA), and maintained at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂. MDA-MB-231 and MCF7 cells were maintained as a monolayer culture in IMDM medium supplemented with 10% fetal bovine serum – FBS, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. MCF 10A cells were maintained in DMEM F12 medium, supplemented with EGF 100 µg/mL, hydrocortisone 1 mg/mL and insulin 10 mg/mL with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. HeLa and HUVEC cells were cultivated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin.

2.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity activity of cell cultures treated with *Pllans-II* was evaluated by the colorimetric MTT assay (3 (4, 5 dimethylthiazol 2 yl) 2, 5 diphenyl tetrazolium bromide). The cells (4 × 10⁴ cells/well) were seeded into a 96-well microplate. Adhering cells were incubated with complete medium in the absence (control cells) or presence of serial dilution concentrations of *Pllans-II* (100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 or 1.6 and 0.8 µg/mL) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After treatment the cells were incubated with MTT (5 mg/mL, 20 µL/well) for 3 h at 37 °C, and the formazan crystals were dissolved by 100 µL of phosphate buffered saline (PBS) containing 10% SDS and 0.01 M HCl. The absorbance was read after 18 h on a multi-well scanning spectrophotometer (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer–Thermo Scientific, USA) at 570 nm. The cytotoxic activity of our experimental protein was compared with Cisplatin® to determine the effectiveness of *Pllans-II* as a possible anti-tumor therapeutic agent.

2.5. Cell cycle analysis

The analysis of cell cycle arrest induced by *Pllans-II* on HeLa cells was analyzed by flow cytometry as previously described by Krishan [28]. Briefly, the HeLa cells (0.5 × 10⁶ cells/well) were treated with 100 µg/mL of *Pllans-II* or culture medium (control group) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Then, cells were collected and fixed in 70% ethanol overnight at 4 °C. For each group, cells were incubated with propidium iodide (PI) (10 µg/mL) and RNase A (100 µg/mL) for 45 min at 37 °C in the dark. Cell cycle was analyzed by quantifying the DNA content in a FACSCanto II (BD) and the data were obtained using FlowJo software (version 7.6.3).

2.6. Apoptosis analysis

Apoptosis assay was evaluated by staining with Annexin V–FITC and propidium iodide (PI) using the Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, Brazil), according to the manufacturer's protocol. HeLa cells

Please cite this article as: E. Jiménez-Charris, et al., Antitumor potential of *Pllans-II*, an acidic Asp49-PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells..., (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053>

(1×10^6 /well) were placed in 12-well culture plates and maintained at 37 °C, in 5% CO₂, for 24 h. After cells were incubated with medium in absence (control cells) or presence of *Pllans-II* (100 µg/mL). In the next step, cells were resuspended in 1× binding buffer, and stained with 2 µL of FITC annexin V and 2 µL of propidium iodide in the dark for 15 min. Apoptosis analysis was performed by flow cytometry (FACSCanto II – BD) and the percentages of apoptotic cells were determined using the FlowJo software (version 7.6.3).

2.7. Relative quantification of apoptosis pathway genes by real-time PCR

Pllans-II (50 µg/mL) or culture medium (non-treated group) were incubated with HeLa cells (0.3×10^6 cells/well) in 12-well culture plates for 24 h at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂. After incubation, TRIzol reagent (Invitrogen, Brazil) was used to extract total RNA according to the manufacturer's protocol. The RNA purity and concentration were estimated by optical density at 230 and 260 nm. The cDNAs construction were synthesized by a reverse transcription system using the GoScript® Reverse Transcription System Kit (PROMEGA, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The primers of different genes (BAD, BAX, BCL2, BCL2L1, BIRC5 and CASP8) were purchased from GO-GenOne, Brazil (<http://www.genone.com.br>). Real-time PCR experiments were performed in triplicate using SYBR Green PCR master mix (LGC Biotechnology, Brazil), cDNA (2 µL) and 0.1 µM of each primer, using a Thermal Cycler (ABI 7300—Applied Biosystem, USA). PCR reactions were carried out using 50 cycles at 95 °C for 10s and 58 °C for 45 s. The data obtained were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and analyzed by a comparative threshold cycle (CT) method, according to Livak and Schmittgen [29]. The results were expressed in fold changes of expression in *Pllans-II* treated groups compared with RPMI 1640 medium treated groups.

2.8. Wound healing assay

The inhibition of HeLa cells migration was measured by a wound healing assay as described by Yue et al. [30], with some modifications. Briefly, a total of 5×10^4 cells/well were seeded onto 24-well plates, until complete confluence was achieved. After 24 h, the medium was discarded and the confluent monolayer was scratched with a plastic 10 µL pipette tip. After this process, 50 µg/mL of *Pllans-II* or culture medium (control group) were added to each cell lines for 48 h. The cellular confluence was analyzed at 0, 24 and 48 h, using an inverted optical microscope (Nikon Eclipse TS100, Japan).

2.9. Integrin quantification

HeLa cells (2×10^5 cells/tube) were pre-incubated with *Pllans-II* (50 µg/mL) or culture medium (non-treated group) for 1 h at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂. The cells were incubated in blocking buffer containing 0.5% BSA, for 20 min on ice. Then, cells were centrifuged, washed and resuspended in 100 µL of PBS. Afterwards, the cells were incubated at 4 °C for 30 min with 2 µL at a concentration of $2 \mu\text{g}/10^6$ cells in PBS with 1% BSA of anti-human α_2 (CD49b) fluorescein, anti-human β_1 (CD29) phycoerythrin, anti-human $\alpha_V\beta_3$ (CD51/CD61) fluorescein and anti-human α_5 (CD49e) fluorescein monoclonal antibodies (Ambriex, Brazil). All the samples were also incubated with the respective fluorescein or phycoerythrin-labeled Isotype monoclonal antibodies as a negative control. Finally, cells were washed, resuspended in PBS, and analyzed in a FACScanto II BD – flow cytometer. The results were processed using FlowJo software (FlowJo v.7.6.3; Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

2.10. In vitro angiogenesis assay

The *Pllans-II* effect on vessel formation in HUVEC cells was evaluated by the Matrigel tube formation assay. For this assay,

HUVEC cells (5×10^5 cells/well) were pre-incubated with 50 µg/mL of *Pllans-II* for 30 min at 37 °C in RPMI medium supplemented with bFGF (10 ng/mL), and cells incubated with medium were used as control. After incubation, cells were seeded on a cell culture chamber slide coated with 50 µL of Matrigel 5.25 mg/mL (Corning® Matrigel® Matrix, USA) and incubated for 18 h at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂. Then, the cells were photographed using an inverted optical microscope (Nikon Eclipse TS100) at $\times 20$ magnification, and the number of vessels was quantified.

2.11. VEGF quantification

The VEGF levels were quantified in HUVEC supernatants acquired from the *in vitro* angiogenesis assay and evaluated using a BD Cytometric Bead Array (CBA), Human VEGF Flex Set kit to cell culture supernatant samples (BD–USA), according to the manufacturer's procedure. The samples were analyzed by the software BD Accuri C6 (BD Accuri C6–Biosciences, CA, USA).

2.12. Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate, and the results were expressed as mean $\pm$ SD. The difference significance between the means of treatment and control was determined by Student's *t*-test or one-way ANOVA, whereas the comparison of two or more variables was assessed by the Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test using the software GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA), where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ was considered significant.

3. Results

3.1. *Pllans-II* induces cytotoxicity in cancer cell lines

We investigated the effects of *Pllans-II* on the viability of cancer cells using the MTT assay. It was detected that *Pllans-II* alters the viability of both types of cells: HeLa and MCF7, cells in a concentration dependent manner (Fig. 1A). The most potent inhibitory effect was observed against HeLa cells. After 24 h of treatment with 100 µg/mL of *Pllans-II*, the HeLa cells decreased the cellular viability to 45%. However, on breast cancer cells, *Pllans-II* only reduced the viability of MCF7 cells to about 80%, and it slightly reduced the viability of MDA-MB-231 cells. In contrast, when we observed the cytotoxic response at different concentration against HeLa cells, *Pllans-II* did not significantly affect the viability of HUVEC and non-tumorigenic MCF 10A cells (Fig. 1A). The cytotoxicity activity of *Pllans-II* was compared with Cisplatin®, a chemotherapy medication used to treat a number of cancers that includes CC. At different doses used, Cisplatin® showed greater cytotoxicity than our protein (Fig. 1B), but *Pllans-II* is harmless on human normal cells than control drug (Fig. 1C). These results suggest that *Pllans-II* is more cytotoxic to cervix adenocarcinoma (HeLa) than breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF7) and almost harmless to non-tumorigenic cells. Therefore, HeLa cells were used to evaluate the induction of apoptosis, cell cycle arrest and metastatic inhibition effect of *Pllans-II*.

3.2. *Pllans-II* induced cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis in HeLa cells

In order to validate whether the reduction in HeLa cell viability also involved cell cycle changes, the effect of *Pllans-II* on cell cycle progression were evaluated (Fig. 2). *Pllans-II* induced cell cycle arrest on HeLa cells by increasing significantly the number of cells in G1 phase from 54.8% to 59.3% (* $p < 0.05$), and a reduction from 34.0% to 28.2% in S stage (** $p < 0.01$). The percentage of cells in the G2/M phase did not changed significantly (from 11.2% to 12.5%; $p > 0.05$) (Fig. 2). Flow cytometry using Annexin V–FITC and PI indicated that after treatment

Please cite this article as: E. Jiménez-Charris, et al., Antitumor potential of *Pllans-II*, an acidic Asp49–PLA2 from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells..., (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053>

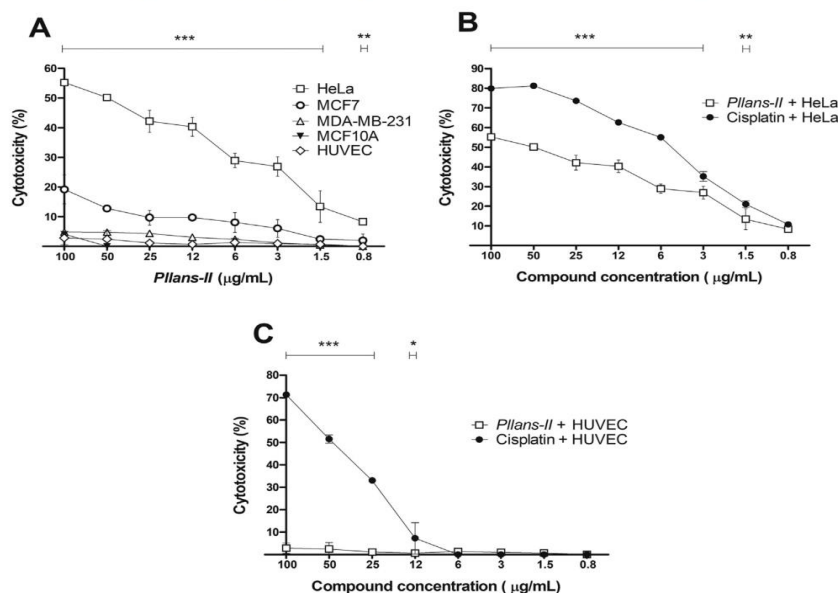


Fig. 1. Cytotoxicity activity of *Pllans-II* and Cisplatin® on different cancer and non-tumorigenic cells by MTT cytotoxicity assay. (A) Breast cancer cell (MCF7 and MDA-MB-231), cervix adenocarcinoma (HeLa), the non-tumorigenic breast cells (MCF 10A), and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were seeded in 96-well plates at density of 4×10^5 cells/well and treated with serial dilution concentrations (100–0.8 µg/mL) of *Pllans-II* for 24 h. The effectiveness of *Pllans-II* as a possible model of antitumor therapeutic agent was compared with Cisplatin® to determine their cytotoxic activity, using a (B) HeLa and (C) HUVEC cellular density of 4×10^4 cells/well. At the end of the incubation time, cell viability was determined by the MTT reduction assay as described in methods section, and the formazan crystal formed was dissolved in SDS. Data show the mean $\pm$ SD ($n = 3$). (A) Statistically significant at *** $p < 0.001$ when was compared to non-tumorigenic cell lines (MCF 10A and HUVEC). (B, C) Significant differences were compared between them at *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

with *Pllans-II* at 100 µg/mL, the percentage of annexin V-positive cells increased when compared to control cells (Fig. 3A). The proportion of early apoptotic cells (Annexin V-positive and PI-negative) was significantly increased from 4.47% in the control cells to 20.52% at 24 h (Fig. 3B). Besides, increase late apoptotic cells and a low necrotic cells percentage were observed when were treated with *Pllans-II*. Interestingly, although it is not a control obtained from the same tissue region; no significant early or late apoptosis, and necrosis was observed in the MCF 10A cells pretreated with *Pllans-II* (Fig. 3C, D). These data indicate

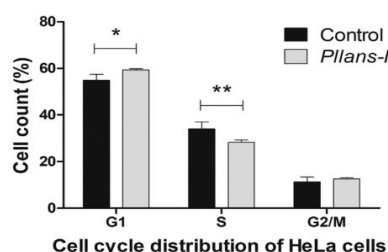


Fig. 2. The effect of *Pllans-II* on the cell cycle in HeLa cells. (A) The DNA content in each cell cycle phase against HeLa cells was analyzed by flow cytometry GraphPad Prism program. The representative histograms represent the cells incubation with 100 µg/mL of *Pllans-II* for 24 h and incubated with PI (10 µg/mL) and RNase A (100 µg/mL) for 45 min at 37 °C. (B) *Pllans-II* treatment induced a significant decrease in the 2N cell number in S phase and an increase in the number of cells in G1 phase compared to the control. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of a triplicate assays. Statistically significant difference with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with control.

that *Pllans-II* is a bioactive component that can induce mainly apoptosis in HeLa cells and avoid the cell death induction on non-tumorigenic cell line.

3.3. Relative mRNA level of apoptosis genes on HeLa cells induced by *Pllans-II*

In order to determine the effect of *Pllans-II* on gene expression of apoptosis-inducing signaling genes, HeLa cells were incubated with 50 µg/mL of the protein for 24 h. Some typical genes of these biological responses such as BIRC5, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1 and CASP8 were selected for this analysis. As Fig. 4 shown, *Pllans-II* treatment modulated the expression of genes involved in both, the intrinsic (BAX, BCL2, and BCL2L1), and the extrinsic apoptosis pathways (CASP8). Both BAX and BCL2 genes were down-regulated by *Pllans-II* while BCL2L1 and CASP8 genes were up-regulated. The BAD gene, a cell death promoter, it showed not significant changes in HeLa cells. Besides, *Pllans-II* was able to significantly decrease the expression of BIRC5 (*** $p < 0.001$), a member of the inhibitor of apoptosis gene family.

3.4. *Pllans-II* effect on HeLa cell migration

We investigated the *Pllans-II* role on inhibition of HeLa cells migration using the wound healing assay, since the migratory ability is one of the clue steps to gain metastatic potential for cervix adenocarcinoma cells. As shown in Fig. 5A–D, microscope images of wounds were taken at 0, 24 (image of this time was not shown) and 48 h post-treatment with *Pllans-II* or RPMI medium. The wound scratch in control cells was completely closed after 48 h of incubation (Fig. 5B). Nevertheless, treatment with *Pllans-II* reduced the HeLa cell migration *in vitro* after

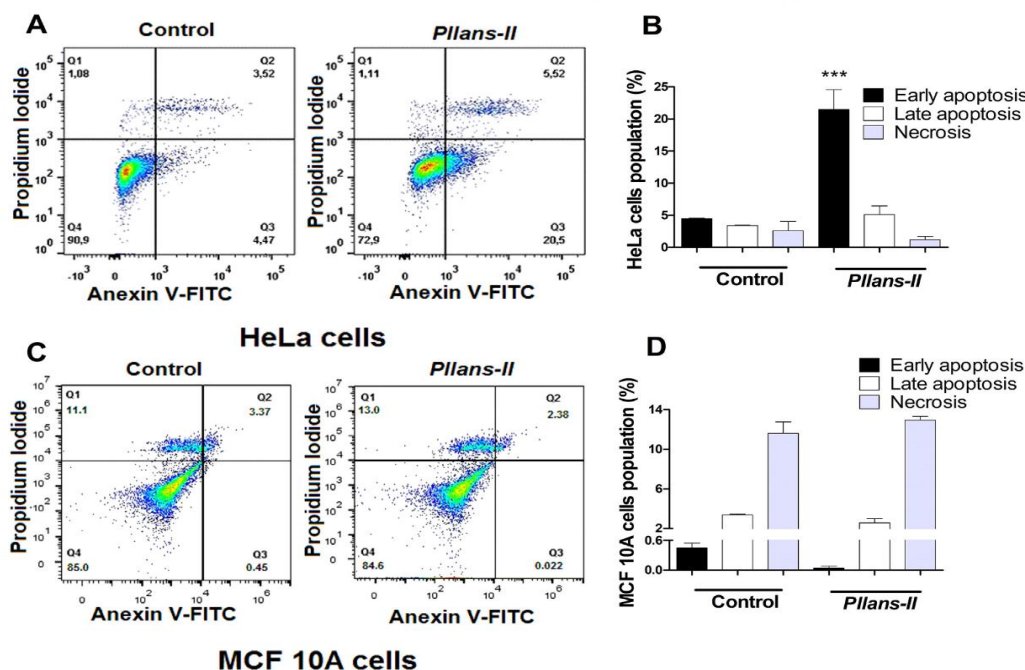


Fig. 3. Induction of apoptosis by *Pllans-II* treatment on cervix cancer HeLa (A, B) and non-tumorigenic breast cancer MCF 10A cells (C, D). Cells were incubated with 100 $\mu\text{g/mL}$ of *Pllans-II* or RPMI 1640 medium as control for 24 h. Afterward, the cells were collected and subjected to Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) double staining, and the distribution of apoptotic cells was analyzed by flow cytometry. (A, C) The representative dot plot acquisitions revealed early apoptosis (lower right quadrant), late apoptosis (upper right quadrant) and necrosis (upper left quadrant) area. (B, D) The bar diagram showed the apoptotic cell percentages shown in A and C. Each bar represents mean $\pm$ SD of triplicate assays. Statistically significant (***) $p < 0.001$ treatment compared to control.

24 and 48 h (Fig. 5D). HeLa cell migration was inhibited by 50 $\mu\text{g/mL}$ of *Pllans-II* from 54.6% at 24 h to 19.6% at 48 h after treatment when compared to the control (27.7% of inhibition at 24 h) (Fig. 5E).

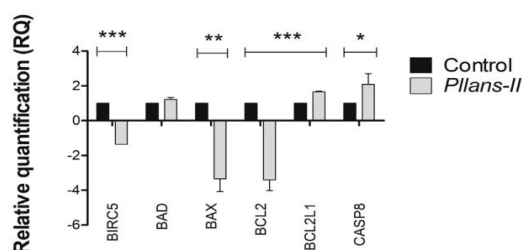


Fig. 4. Relative quantification of apoptosis genes by real-time PCR in HeLa cells, after *Pllans-II* treatment (50 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified incubator containing 5% CO_2 . The results were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and analyzed by a comparative threshold cycle method. BAD, BCL2L1, CASP8 were up-regulated while BIRC5, BAX and BCL2 were down regulated. Bars represent mean $\pm$ SD of triplicate experiments. A * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ were considered as statistically significant for real-time experiments.

Please cite this article as: E. Jiménez-Charris, et al., Antitumor potential of *Pllans-II*, an acidic Asp49-PLA2 from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells..., (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2018.09.053>

3.5. Integrin measurement in HeLa cells

Cellular invasion during tissue remodeling morphogenesis and metastasis depends on cell adhesion and migration, associated with the interaction of its integrins with the extracellular matrix and the different ligands. Therefore, in order to support these findings, we assessed some integrins by flow cytometry such as $\alpha 2$ (CD49b), $\beta 1$ (CD29), $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61) and $\alpha 5$ (CD49e) (Fig. 6). The expression of integrin $\beta 1$ and $\alpha 5$ were significantly down-regulated on the cell surface of HeLa cells when was exposed to 50 $\mu\text{g/mL}$ of *Pllans-II*, indicating that these integrins could be functionally inhibited in cancer cell invasion. Nonetheless, the integrin expression of $\alpha 2$ and $\alpha V\beta 3$ were not affect on HeLa cells when was pre-incubated with *Pllans-II*.

3.6. Effect of *Pllans-II* on tube formation in Matrigel assay

In order to investigate the *Pllans-II* ability to inhibit tube formation, its effect on HUVEC cells was investigated by a Matrigel angiogenesis assay. A significantly decreased number of newly formed vessels induced by bFGF were observed in the presence of 50 $\mu\text{g/mL}$ of *Pllans-II*, when compared to control (Fig. 7A, B). The number of vessels during tube formation in presence or absence of *Pllans-II* were showed in Fig. 7C. *Pllans-II* significantly reduced the vessel number in an 85.4% (** $p < 0.001$) in comparison with non-treated cells. However, *Pllans-II* stimulated the production of VEGF detected in HUVEC supernatants

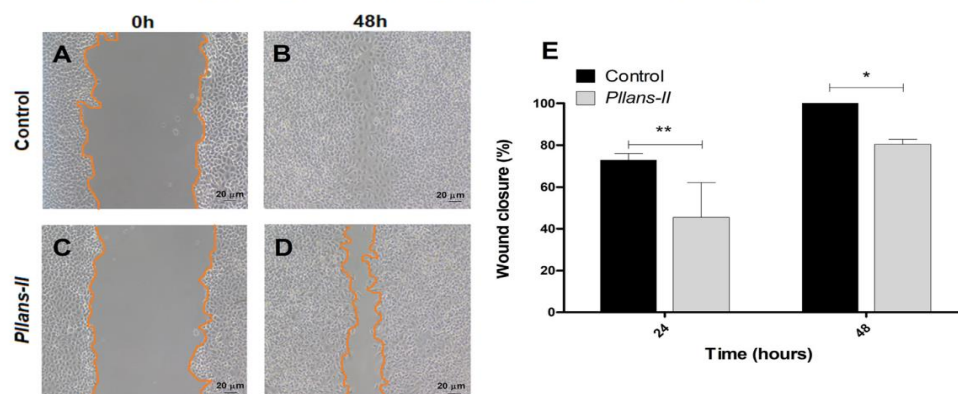


Fig. 5. Migration effect of *Pllans-II* on HeLa cells by Wound healing Assay. Cells were seeded at 5×10^4 cells/well in 24-well plates until obtaining complete confluence. After 24 h, the medium was discarded and the confluent monolayer was scratched with a 10 μ L pipette tip to create an area devoid of cells (0 h) (A and C). After this process, cells were treated in the absence (A and B) or presence of *Pllans-II* at 100 μ g/mL (C and D), monitoring the confluence of cells each 24 (image not shown) or 48 h until 100% of confluence in control groups. Analysis were performed in an inverted optical microscope (Nikon Eclipse TS100). (E) Bar graph display the cells percent migration after 24 and 48 h. The results represent the mean $\pm$ S.D. from four experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control.

from the *in vitro* angiogenesis assay (Fig. 7D). The concentration of VEGF released in the non-treated HUVEC supernatants was 695.7 ± 17.3 pg/mL in contrast to their respective increase in *Pllans-II* cell treatment of 1039 ± 2.4 pg/mL (** $p < 0.0001$).

4. Discussion

Various local surgical treatments are enough to cure the CC in early stages [3–5], and in advanced stages, the treatment usually combines radiotherapy and chemotherapy [6,7,31]. Unfortunately, patients eventually become resistant to the therapy, due to toxicity in normal tissues that limits the quantity of drugs that can be administered systematically, reducing the amount of drug that effectively reaches the tumor [32]. Besides, these kinds of non-surgical treatments may cause very serious, life-threatening side effects. Therefore, CC constitutes a disease

with a broad impact on public health, whose control must be prioritized through new and effective treatments based on a more selective suppression of the tumor cell growth.

The search for anticancer agents especially from natural products are increasing, and snake venom toxins has been shown to have a wide spectrum of biological activities. Many types of svPLA₂ such as basic and acidic PLA₂s have been shown to possess antitumor, cell adhesion and migration inhibition, as well as anti-integrin and antiangiogenic properties [15,16,21,23,24,33,34]. Here, we report the first acidic and enzymatically active Asp49-PLA₂ isolated from *Porthidium lansbergii lansbergii* venom as a prominent anticancer activity against human cervix adenocarcinoma HeLa cells in a dose-dependent pattern; while it showed minimal effects *in vitro* on non-tumorigenic cells (MCF 10A and HUVEC) as it is shown in this research (Fig. 1A), and previously reported *in vivo* by Jiménez-Charris et al. [27]. Although Cisplatin® showed greater cytotoxicity against HeLa cells than *Pllans-II* at higher doses (Fig. 1B), this protein seems to be harmless on human normal cells (HUVEC) (Fig. 1C), contrary to the many non-desired secondary effects displayed by most of the widely used chemotherapeutic agents, including Cisplatin® [35,36]. It is important to know that the ideal cancer chemotherapeutic drug would have minimal adverse effects on normal cells [37].

This anti-tumoral activity of svPLA₂s type Asp49 may be mediated by interaction with acceptors for PLA₂s or other endogenous receptors (such as integrins) on the plasma membrane of the target cell through 'pharmacological sites' distinct from the svPLA₂ catalytic site [16,20,24,33]. Some authors propose that the enzymatic activity of svPLA₂s is not absolutely necessary for cytotoxic activity on tumor cell lines or apoptosis induction [16,18,38,39]. Cell cycle regulation and apoptosis are two major regulatory mechanisms for cell survival and growth. Apoptotic cell death occurs when induction of specific checkpoints during the cell cycle are detained [40,41]. In our study, we found that *Pllans-II* induced cell cycle arrest (Fig. 2) and stimulated cell death by apoptosis on HeLa cells (Fig. 3) as shown by PI staining and Annexin V-FITC, respectively.

Apoptosis is a programmed cellular process that occurs in physiological and pathological conditions [42]. However, the programmed cell death is interrupted in cancer, which leads to the overgrowth of malignant cells [43]. Induction of tumor cell apoptosis is the final goal of many cancer therapies [44]. A hallmark of early phase apoptosis such as phosphatidylserine (PS) externalization was analyzed using annexin V

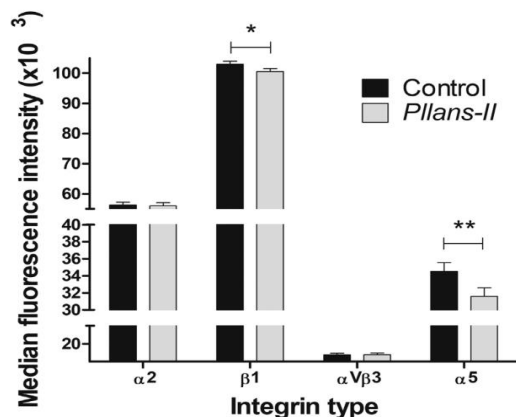


Fig. 6. Integrin expression on HeLa cells after *Pllans-II* treatment. Integrin expression in HeLa cells ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ and $\alpha 5$) treated with *Pllans-II* 50 μ g/mL. Data are expressed as mean $\pm$ S.D., and experiment was carried out in triplicate. Differences between treatments and controls were analyzed by Two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. Statistically significant: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Please cite this article as: E. Jiménez-Charris, et al., Antitumor potential of *Pllans-II*, an acidic Asp49-PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells..., (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053>

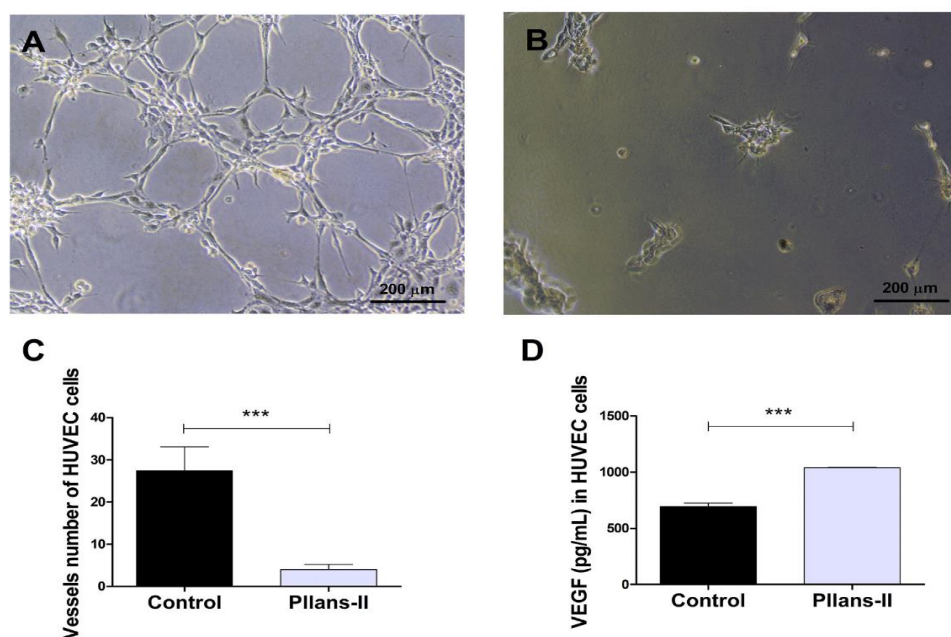


Fig. 7. Analysis of *in vitro* anti-angiogenic effect of *Pllans-II* on HUVEC cells. For the angiogenesis assay, the HUVEC cells were pre-incubated in absence (A) or (B) presence of *Pllans-II* (50 μ g/mL) for 30 min at 37 °C in RPMI medium supplemented with bFGF (10 ng/mL). Afterward, the cells were seeded on a cell culture chamber slide coated with 50 μ L of Matrigel 5.25 mg/mL and maintained at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂. After seeding on Matrigel, photographs were taken after 18 h, and the number of vessels (C), and VEGF concentration in HUVEC cell supernatants was quantified (D). Data are shown as mean $\pm$ S.D. and all experiments were carried out in triplicate. Differences between treatments and controls were analyzed by Unpaired *t*-test. Statistically significant: ****p* < 0.0001.

and PI labeling. Early apoptosis was the main cell death stage detected on HeLa cells after treatment with *Pllans-II* (Fig. 3B), which suggest this process as the predominant cell death mechanism induced by *Pllans-II* on these human cervical adenocarcinoma cells. This PS externalization on the cell surface, stimulate the macrophage PS–receptor that allows the recognition of apoptotic bodies and stimulate the phagocytosis of dying cells [45]. Interestingly, neither significant early/late apoptosis nor necrosis were observed in the non-tumorigenic MCF 10A cells pretreated with *Pllans-II* (Fig. 3D), and the possible innocuousness of our experimental protein has been tested on other non-tumorigenic cells; as it was demonstrated by Jiménez-Charris et al. [27]. Therefore, the antitumoral effect comparison of anticancer agents on tumor and normal cells is one of the first steps in discovering a potential drug in cancer therapy. Cell cycle distribution was furthered investigated to support the occurrence of apoptosis in the cancer cells through RNase A and propidium iodide staining [28,46]. Based on flow cytometric analysis, the HeLa cells were observed to be arrested at the G1 stage, inhibiting cell growth or cancer progression (Fig. 2). This G1 stage arrest of the cell cycle could trigger cell death by apoptosis, since both process tend to share a common set of regulatory proteins [47]. Checkpoint proteins (CHK, CDK's and CKI's) could prevent the cells from cell cycle progress and remain in the G1 phase. At any sight of DNA damage, CKI proteins have the ability to suspend the cell cycle and activate repair systems. In case that repair systems are incapable to correct the damage, cell death processes are induced [48]. Additionally, apoptosis was verified by a significant reduction in the expression of BIRC5 (Fig. 4), a gene member of the inhibitor of apoptosis gene family, which encode negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death.

The major anticancer mechanism activated by snake venom toxins is by mitochondria-dependent cell death pathway [49]. Proteins of the Bcl-2 family are key components in the mitochondrial apoptosis “death-signal transduction” pathway and can indirectly regulate the activity of caspases in related apoptotic pathways [50,51]. Activity of *Pllans-II* on HeLa cells showed an induction of apoptotic cell death, suggesting a possibly triggered through extrinsic pathways (Fig. 4). Extrinsic pathway is activated by death receptors located on the cellular membrane, such as those of the tumor necrosis factor receptor family [50,51]. After ligand binding, death receptors activate some initiator caspases such as caspase-8 [50], whose gene CASP8 was verified in our research as upregulated. This caspase is sufficient to induce apoptosis in absence of mitochondrial outer membrane permeabilization–MOMP [52]. The use of the extrinsic death pathway was corroborated by a remarkable regulation increase expression of the anti-apoptotic BCL2L1 gene, which counteract the down-regulation of the anti-apoptotic gene BCL2. The proteins encoded by these two genes are related to the regulation of MOMP that release several proteins from the mitochondrial intermembrane space, contributing effector caspase activation and apoptosis [51]. In addition, the preference by this death receptor pathway was confirmed by a significant reduction in pro-apoptotic BAX gene expression. A gene where its protein promotes the apoptosis by increase the opening of the mitochondrial voltage-dependent anion channel, which leads to the loss in membrane potential and the release of cytochrome *c* [50,52].

Besides programmed cell death, cancer metastasis is one of the most important events responsible for tumor malignancy. It comprises a complex cascade of biological events which includes cellular adhesion, invasion across vessel walls and migration within the extracellular

Please cite this article as: E. Jiménez-Charris, et al., Antitumor potential of *Pllans-II*, an acidic Asp49–PLA2 from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells..., (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053>

matrix to remote sites with establishment of a new focus of growth [53]. The integrins overexpressed on tumor cells have been recognized as key regulator of this neoplastic process [54]. Disruption in such process retards the metastatic progression, preventing the spread of cancer. In this work, *Pllans-II* displayed the ability to disrupt the migration of HeLa cells (Fig. 5) by interfering with $\alpha 5$ and $\beta 1$ -containing integrins (Fig. 6). These results are in agreement with the action of other svPLA₂s such as an acidic Asp49-PLA₂ isolated from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom that inhibited migration of various human tumor cells mediated by $\alpha 5\beta 1$ and αv integrins [33]. Two acidic svPLA₂s purified from *Cerastes cerastes* venom, CC-PLA₂-1 and CC-PLA₂-2, also inhibited HT-1080 cell migration towards fibrinogen and fibronectin [23].

Tumor angiogenesis is another of the most important process involved in the metastasis progression, in which new blood vessels are formed from a pre-existing vessels and thus represents a vital step in changing benign tumors into malignant ones through endothelial cells [55,56]. Based on its importance, angiogenesis has been considered an attractive target for the development of new therapeutic molecules [57]. In our investigation, angiogenesis was inhibited by *Pllans-II* on tube formation by HUVECs induced by bFGF (Fig. 7). Interestingly, the anti-angiogenic activity of *Pllans-II* is likely not due to any cytotoxic effect on HUVEC cells (Fig. 1A). Indeed, endothelial cells growth was not affected by *Pllans-II* treatment over a 24 h of exposition at different concentrations assayed, cells did not detach from the substrate during the test and no cell debris could be observed. VEGF is an essential regulator for neoplastic process and is involved at the same time in the proliferation, migration and tubular formation of vascular endothelial cells [58]. We found that *Pllans-II* stimulated the VEGF synthesis (Fig. 7D) in HUVEC cells, so the mechanism by which this protein blocks angiogenesis could involve on other pro-angiogenic factors that inhibit the formation of new vessels through other anti-angiogenic pathways independent of VEGF signaling. Therefore, high levels of VEGF could be related to an attempt to counteract the anti-angiogenic effect of *Pllans-II* leading HUVEC cells to stimulate the tube formation by overexpression of VEGF-signaling in the surrounding environment. Inducement of an VEGF-independent anti-angiogenic pathway have been reported by Yamauchi et al. [58], where thrombospondin-1 induced expression of p21 and an unphosphorylated form of Rb, resulting in cell growth arrest and inhibition of angiogenesis in HUVECs cells by a novel anti-angiogenic pathway. Raimondi et al. [59], also described a VEGF-independent inhibition of angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent tyrosine kinase ABL1 activation in endothelial cells by the Imatinib action, a commercial medication used to treat cancer.

5. Conclusion

In summary, this research showed for the first time that an acidic and enzymatically active Asp49-PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* venom was able of exerting a cytotoxicity on human cervix adenocarcinoma cells through induction of apoptotic extrinsic pathway and cell cycle arrest at G1 phase. Moreover, *Pllans-II* has the ability to reduce the migration potential of HeLa cells by $\alpha 5$ and $\beta 1$ -containing integrins blocking and inhibits angiogenesis through a VEGF-independent pathway on HUVEC cells. Interestingly, *Pllans-II* showed more specific cytotoxic activity on adenocarcinoma cells, significantly lower against non-tumorigenic MCF 10A and HUVEC cell lines. Taking together, our results remark the ability of *Pllans-II* not only stopping proliferation of HeLa cells, but also to control the spread of cervix adenocarcinoma cells; showing a promising potential in the treatment of cervix cancer. Nevertheless, it could be interesting to evaluate the *Pllans-II* effect on *in vivo* tumorigenesis, without despising a better understanding of the underlying mechanism involved in the apoptosis pathway, metastasis disruption potential, and structural and functional studies to clarify how *Pllans-II* interacts with integrin receptors in cancer cells.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Eliecer was responsible for project development, designed the experimental approaches, performed experimental manipulations, interpreted the data and drafted the manuscript. Daiana, Sarah and Samuel designed the experimental approaches, performed experimental manipulations, interpreted the data and critical review of the manuscript. Leonel Purified the phospholipase "*Pllans-II*", designed experiments, interpreted the data and participated in writing the manuscript. Luis collected the snake venoms and reviewed the manuscript. Leonardo participated in the review and editing of the manuscript. Veridiana coordinated and designed the biological experiments, analyzed and interpreted the data and edited the manuscript. Finally, all authors have reviewed and approved the final submitted manuscript.

Acknowledgements

The authors thank "Federal University of Uberlandia" (UFU), Brazil and the Brazilian funding agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG, for providing financial support to this study: FAPEMIG (CBB-APQ-01637-15); FAPEMIG (CBB - APQ-01401-17) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology - INCT-TeraNano (CNPq/CAPES/FAPEMIG, Grant numbers CNPq-465669/2014-0). We also thanks to the financial support provided by COLCIENCIAS (Programa Nacional de Formación de Investigadores-Becas Colciencias N° 567-2012) and The School of Basic Sciences, Faculty of Health (Universidad del Valle). This study was performed as part of the PhD thesis of E. Jiménez at Universidad del Valle (Cali, Colombia).

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer* 136 (5) (2015) E359–E386, <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- [2] Liga contra el cáncer, Cáncer de cuello uterino, <https://www.ligacontraelcancer.com.co/cancer-de-cuello-uterino/>, 2018, Accessed date: 18 May 2018.
- [3] O. Oberlin, H. Martelli, Enfermedades benignas del ovario y tumores malignos de ovario, útero y vagina en la niña y en la adolescente, *EMC-Ginecol-Obstet.* 47 (1) (2011) 1–8, [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(11\)70989-4](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(11)70989-4).
- [4] L. Echeverri, C. López, G.J. Rendón, G. Ángel, R. Pareja, Traquelectomía radical laparoscópica en pacientes con cáncer de cuello uterino en estado IB1 en el Instituto de Cancerología-Las Américas, Medellín, Colombia, *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 81 (1) (2016) 38–43, <https://doi.org/10.4067/S0717-75262016000100007>.
- [5] G.F. Sawaya, K. Smith-McCune, Detección de Cáncer de Cuello Uterino, *Obstet. Gynecol.* 127 (2016) 459–467, <https://doi.org/10.1097/aog.0000000000001136>.
- [6] ESMO, Cáncer de cuello uterino: una guía para pacientes – Basada en la Guía de Práctica Clínica de la ESMO – v. 2012.1, ESMO/ACF Patient Guide Series, 2012.
- [7] M.O. Miranda, D.F. Pinho, Z. Wardak, K. Albuquerque, I. Pedrosa, Resonancia magnética en la planificación de la braquiterapia intracavitaria para el tratamiento del cáncer de cervix localmente avanzado, *Radiology* 58 (1) (2016) 16–25, <https://doi.org/10.1016/j.rx.2015.09.005>.
- [8] S. Sarraj, J. Luis, M. El Ayeb, N. Marrakchi, Snake venom peptides: Promising molecules with anti-tumor effects, *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, IntechOpen, London 2013, pp. 219–238, <https://doi.org/10.5772/51263>.
- [9] L.A. Calderon, J.C. Sobrinho, K.D. Zaquero, A. de Moura, A.N. Grabner, M.V. Mazzi, S. Marcussi, A. Nomizo, C.F.C. Fernandes, J.P. Zulliani, B.M.A. Carvalho, S.L. da Silva, R.G. Stábili, A.M. Soares, Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 1–19, <https://doi.org/10.1155/2014/203639>.
- [10] R.S. Rodrigues, J.F. da Silva, J.B. França, F.P. Fonseca, A.R. Otaviano, F.H. Silva, A. Hamaguchi, A.J. Magro, A.S. Braz, J.L. dos Santos, M.I. Homsí-Brandeburgo, M. Fontes, A.L. Fuly, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pauloensis snake venom, *Biochimie* 91 (4) (2009) 490–501, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.004>.
- [11] E.E. Sánchez, A. Rodríguez-Acosta, R. Palomar, S.E. Lucena, S. Bashir, J.G. Soto, J.C. Pérez, Colomistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South

Please cite this article as: E. Jiménez-Charris, et al., Antitumor potential of *Pllans-II*, an acidic Asp49-PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells..., (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053>

- American snake (*Bothrops colubiniensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion, *Arch. Toxicol.* 83 (3) (2009) 271–279, <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0358-y>.
- [12] D.D. de Carvalho, S. Schmitmeier, J.C. Novello, F.S. Markland, Effect of Bjucl (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells, *Toxicol.* 39 (10) (2001) 1471–1476, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00106-4).
 - [13] D. de Oliveira Guimarães, D.S. Lopes, F.V.P.V. Azevedo, S.N.C. Gimenes, M.A. Silva, D.C. Aché, M.S. Rocha Gomes, L. Vecchi, L.R. Goulart, K.A.G. Yoneyama, R. Santos Rodrigues, V. Rodrigues De Melo, In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom, *Int. J. Biol. Macromol.* 97 (2017) 770–777, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.01.064>.
 - [14] S.N. Gimenes, D.S. Lopes, P.T. Alves, F.V. Azevedo, L. Vecchi, L.R. Goulart, T.C.S. Rodrigues, A.L. Santos, V. Brites, T.L. Teixeira, C.V. Silva, M.H. Dias, S.C. Teixeira, R. Santos Rodrigues, K.A.G. Yoneyama, R.A. Oliveira, V. Rodrigues de Melo, Antitumor effects of γ CdPLI, a PLA₂ inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell, *Sci. Rep.* 7 (2017) 7077, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07082-2>.
 - [15] F.V.P.V. Azevedo, D.S. Lopes, S.N.C. Gimenes, D.C. Aché, L. Vecchi, P.T. Alves, S.N. Gimenes, R. Santos Rodrigues, L.R. Goulart, V. Rodrigues De Melo, K.A.G. Yoneyama, Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 671–677, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2015.10.080>.
 - [16] A.V. Osipov, Y.N. Utkin, Antiproliferative effects of snake venom phospholipases A₂ and their perspectives for cancer treatment, in: L. Cruz, S. Luo (Eds.), *Toxins and Drug Discovery*, Springer, Dordrecht 2015, pp. 1–15, https://doi.org/10.1007/978-94-007-6726-3_13-1.
 - [17] V. Brglez, G. Lambeau, T. Petan, Secreted phospholipases A₂ in cancer: diverse mechanisms of action, *Biochimie* 107 (2014) 114–123, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.023>.
 - [18] L.C. Gebrim, S. Marcussi, D.L. Menaldo, C.S. de Menezes, A. Nomizo, A. Hamaguchi, E.P. Silveira-Lacerda, M.I. Homs-Brandeburgo, S.V. Sampaio, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A₂-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region, *Biologicals* 37 (4) (2009) 222–229, <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2009.01.010>.
 - [19] R.G. Stábili, S.F. Amui, C.D. Sant'Ana, M.G. Pires, A. Nomizo, M.C. Monteiro, P.R.T. Romão, R. Guerra-Sá, C.A. Vieira, J.R. Giglio, M.R. Fontes, A.M. Soares, *Bothrops romoi* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins, *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 142 (3–4) (2006) 371–381, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.020>.
 - [20] R.S. Rodrigues, L.F.M. Izidoro, J. de Oliveira, J. Robson, S.V. Sampaio, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, Snake venom phospholipases A₂: a new class of antitumor agents, *Protein Pept. Lett.* 16 (8) (2009) 894–898, <https://doi.org/10.2174/092986609788923266>.
 - [21] P.G. Roberto, S. Kashima, S. Marcussi, J.O. Pereira, S. Astolfi-Filho, A. Nomizo, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, A.M. Soares, S.C. França, Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom, *Protein J.* 23 (4) (2004) 273–285, <https://doi.org/10.1023/B:JOPC.0000027852.92208.60>.
 - [22] J.E. Cura, D.P. Blanzaco, C. Brisson, M.A. Cura, R. Cabrol, L. Larrateguy, C. Mendez, J.C. Sechi, J.S. Silveira, E. Theiller, A.R. de Roodt, Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in patients with advanced cancer, *Clin. Cancer Res.* 8 (4) (2002) 1033–1041.
 - [23] R. Zouari-Kessentini, J. Luis, A. Karray, O. Kallech-Ziri, N. Srairi-Abid, A. Bazaa, E. Loret, S. Bezzine, M. El Ayebe, N. Marrakchi, Two purified and characterized phospholipases A₂ from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration, *Toxicol.* 53 (4) (2009) 444–453, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.01.003>.
 - [24] R. Kessentini-Zouari, J. Jebali, S. Taboubi, N. Srairi-Abid, M. Morjen, O. Kallech-Ziri, S. Bezzine, J. Marvaldi, M. El Ayebe, N. Marrakchi, J. Luis, CC-PLA₂-1 and CC-PLA₂-2, two *Cerastes cerastes* venom-derived phospholipases A₂, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo, *Lab. Invest.* 90 (4) (2010) 510–519, <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.137>.
 - [25] Y. Erzurumlu, D. Petras, B. Goçmen, B.F. Hempel, P. Heiss, M.Z. Yıldız, R.D. Süsmuth, A. Nalbantsoy, Apoptotic effects of mount Bulgar viper (*Montivipera bulgaragdica*) PLA₂ and SVMPs venom peptide fractions on HeLa and A549 cancer cells, *PRO 1* (10) (2017) 1049, <https://doi.org/10.3390/proceedings1101049>.
 - [26] E. Jiménez-Charris, L. Montealegre-Sánchez, L. Solano-Redondo, D. Mora-Obando, E. Camacho, F. Castro-Herrera, L. Fierro, B. Lomonte, Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognoose viper) from the Atlantic Department of Colombia, *J. Proteome* 114 (2015) 287–299, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.016>.
 - [27] E. Jiménez-Charris, L. Montealegre-Sánchez, L. Solano-Redondo, F. Castro-Herrera, L. Fierro-Pérez, B. Lomonte, Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A₂ in the venom of the snake *Porthidium lansbergii lansbergii*, *Toxicol.* 119 (2016) 289–298, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2016.07.006>.
 - [28] A. Krishnan, Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining, *J. Cell Biol.* 66 (1) (1975) 188–193, <https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.188>.
 - [29] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
 - [30] P.Y. Yue, E.P. Leung, N.K. Mak, R.N. Wong, A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates, *J. Biomol. Screen.* 15 (4) (2010) 427–433, <https://doi.org/10.1177/1087057110361772>.
 - [31] R. Baskar, K.A. Lee, R. Yeo, K.W. Yeoh, Cancer and radiation therapy: current advances and future directions, *Int. J. Med. Sci.* 9 (3) (2012) 193, <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>.
 - [32] C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D.B. Longley, P.G. Johnston, Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat. Rev. Cancer* 13 (10) (2013) 714–726, <https://doi.org/10.1038/nrc3599>.
 - [33] A. Bazaa, J. Luis, N. Srairi-Abid, O. Kallech-Ziri, R. Kessentini-Zouari, C. Defilles, J.C. Lissitzky, M. El Ayebe, N. Marrakchi, MVL-PLA₂, a phospholipase A₂ from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration, *Matrix Biol.* 28 (4) (2009) 188–193, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.03.007>.
 - [34] S. Khunsap, N. Pakmanee, O. Khow, L. Chanhome, V. Sitprija, M. Suntravat, S.E. Lucena, J.C. Pérez, E.E. Sánchez, Purification of a phospholipase A₂ from *Daboia russelii siamensis* venom with anticancer effects, *J. Venom Res.* 2 (2011) 42–51.
 - [35] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene* 22 (47) (2003) 7265–7279, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.
 - [36] V. Cepeda, M.A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, J.M. Pérez, Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 7 (1) (2007) 3–18, <https://doi.org/10.2174/187152007779314044>.
 - [37] N. Pabla, G. Dong, M. Jiang, S. Huang, M.V. Kumar, R.O. Messing, Z. Dong, Inhibition of PKC α reduces cisplatin-induced nephrotoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy in mouse models of cancer, *J. Clin. Invest.* 121 (7) (2011) 2709–2722, <https://doi.org/10.1172/JCI45586>.
 - [38] A. de Moura, A.M. Kayano, G.A. Oliveira, S.S. Setúbal, J.G. Ribeiro, N.B. Barros, R. Nicolet, L.A. Moura, A.L. Fuly, A. Nomizo, S.L. da Silva, C.F. Fernandes, J.P. Zuiliani, R.G. Stábili, A.M. Soares, L.A. Calderon, Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattoensis* snake venom with toxicity against Leishmania and tumor cells, *Biomed. Res. Int.* (2014) 1–13, <https://doi.org/10.1155/2014/195356>.
 - [39] M. Samel, H. Vija, I. Kurvet, K. Künnis-Beres, K. Trummel, J. Subbi, A. Kahru, J. Siigur, Interactions of PLA₂s from *Vipera lebetina*, *Vipera berus berus* and *Naja naja oxiana* venom with platelets, bacterial and cancer cells, *Toxins* 5 (2) (2013) 203–223, <https://doi.org/10.3390/toxins5020203>.
 - [40] A.W. Murray, Recycling the cell cycle: cyclins revisited, *Cell* 116 (2) (2004) 221–234, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01080-8).
 - [41] Y.J. Lu, S.H. Yang, C.M. Chien, Y.H. Lin, X.W. Hu, Z.Z. Wu, M.J. Wu, S.R. Lin, Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a novel edine derivative, THDB, in chronic myeloid leukemia (HL-60) cells, *Toxicol.* in Vitro 21 (1) (2007) 90–98, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.008>.
 - [42] S. Rodríguez-Nieto, B. Zhivotovskiy, Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment, *Curr. Pharm. Des.* 12 (34) (2006) 4411–4425, <https://doi.org/10.2174/138161206779010495>.
 - [43] K. Takeda, J. Stagg, H. Yagita, K. Okumura, M.J. Smyth, Targeting death-inducing receptors in cancer therapy, *Oncogene* 26 (25) (2007) 3745–3757, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210374>.
 - [44] P. Hastay, B.A. Christy, p53 as an intervention target for cancer and aging, *Pathobiol. Aging Age Relat. Dis.* 3 (1) (2013), 22702, <https://doi.org/10.3402/pba.v3i0.22702>.
 - [45] V.A. Fadok, D.L. Bratton, D.M. Rose, A. Pearson, R.A.B. Ezekewitz, P.M. Henson, A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells, *Nature* 405 (2000) 85–90, <https://doi.org/10.1038/35011084>.
 - [46] S.C. Teixeira, D.S. Lopes, S.N.C. Gimenes, T.L. Teixeira, M.S. Da Silva, R.T. Silva, F.A.C. da Luz, A.A. da Silva, M. Almeida, P.V. Florentino, P.C. Brígido, M.A. dos Santos, V.M. Rodrigues, M.J. Barbosa, M.C. Elias, R. Arruda, C.V. da Silva, Mechanistic insights into the anti-angiogenic activity of *Trypanosoma cruzi* protein 21 and its potential impact on the onset of chagasic cardiomyopathy, *Sci. Rep.* 7 (2017) 44978, <https://doi.org/10.1038/srep44978>.
 - [47] B. Pucci, M. Kasten, A. Giordano, Cell cycle and apoptosis, *Neoplasia* 2 (4) (2000) 291–299, <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900101>.
 - [48] R.M. Douglas, G.G. Haddad, Invited review: effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest, *J. Appl. Physiol.* 94 (5) (2003) 2068–2083, <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01029.2002>.
 - [49] S.S. Attarde, S.V. Pandit, Cytotoxic activity of NN-32 toxin from Indian spectacled cobra venom on human breast cancer cell lines, *BMC Complement. Altern. Med.* 17 (1) (2017) 503, <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2018-3>.
 - [50] G. Ichim, S.W. Tait, A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process, *Nat. Rev. Cancer* 16 (8) (2016) 539–548, <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>.
 - [51] J.M. Adams, S. Cory, The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets, *Cell Death Differ.* 25 (1) (2018) 27–36, <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.161>.
 - [52] S.W. Tait, D.R. Green, Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (9) (2010) 621–632, <https://doi.org/10.1038/nrm2952>.
 - [53] K.W. Hunter, N.P. Crawford, J. Alsaaraj, Mechanisms of metastasis, *Breast Cancer Res.* 10 (1) (2008) S2, <https://doi.org/10.1186/bcr1988>.
 - [54] W. Guo, F.G. Giancotti, Integrin signalling during tumour progression, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (10) (2004) 816–826, <https://doi.org/10.1038/nrm1490>.
 - [55] R.S. Kerbel, Tumor angiogenesis, *N. Engl. J. Med.* 358 (19) (2008) 2039–2049, <https://doi.org/10.1056/NEJMa0706596>.
 - [56] S.M.V. Weis, D.A. Cheresh, Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets, *Nat. Med.* 17 (11) (2011) 1359–1370, <https://doi.org/10.1038/nm.2537>.
 - [57] J. Dong, D. Saunders, R. Silasi-Mansat, L. Yu, H. Zhu, F. Lupu, R. Towner, Y. Dong, H. Chen, Therapeutic efficacy of a synthetic eptin mimetic peptide in glioma tumor model: uncovering multiple mechanisms beyond the VEGF-associated tumor angiogenesis, *J. Neuro-Oncol.* 138 (1) (2018) 17–27, <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2766-z>.
 - [58] M. Yamauchi, S. Imajoh-Ohmi, M. Shibuya, Novel antiangiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle, *Cancer Sci.* 98 (9) (2007) 1491–1497, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00534.x>.
 - [59] C. Raimondi, A. Fantin, A. Lampropoulou, L. Denti, A. Chikh, C. Ruhrberg, Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells, *J. Exp. Med.* 211 (6) (2014) 1167–1183, <https://doi.org/10.1084/jem.20132330>.

Please cite this article as: E. Jiménez-Charris, et al., Antitumor potential of *Pillans-II*, an acidic Asp49-PLA₂ from *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells., (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2018.09.053>