



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN



Licenciatura en Ciencias Biológicas

"Efecto sobre la adhesión y migración de células tumorales de una fosfolipasa A₂ (PLA₂) aislada de *Bothrops diporus* (Cope, 1862)"

Autora: Sasovsky, Daniela Jaqueline

Directora: Dra. Bustillo Soledad

Co-Directora: Dra. Gómez Gabriela

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Nordeste, quien me aceptó y permitió formarme durante el transcurso de la carrera, y a todos los docentes que formaron parte, brindándome sus conocimientos viéndose reflejados en la culminación de mi paso por la Universidad.

Al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN), quien me otorgó una beca de investigación, la cual incentivó el comienzo de mi formación científica.

A mi Directora Bustillo Soledad y a mi Co directora Gabriela Gómez, por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo final de graduación junto a ellas, brindándome sus conocimientos, como así también dedicando su tiempo día a día para enseñarme lo que desconocía, teniendo toda la paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesina.

Al laboratorio de investigación de proteínas (LabInPro) a cargo de la dirección de la Dra. Laura Leiva y junto a su personal, por haberme abierto sus puertas y permitido ser parte del equipo, al laboratorio de Cultivos Celulares a cargo de la Dra. Soledad Bustillo, el cual me brindó todas las herramientas necesarias para poder llevar a cabo mi trabajo final.

Agradezco a mi familia, quienes me formaron como persona, permitiéndome llegar hasta la recta final estando siempre presentes, dándome el apoyo incondicional para poder formarme profesionalmente. Sin ellos nada hubiese sido posible.

Para finalizar, agradezco a mi grupo de amigas, que estuvieron presente desde los inicios de la carrera, acompañándonos unas a otras para que el transcurrir de los años sea maravilloso, con tantas risas y alegrías, estando en todos los momentos y siempre dándome fuerzas para llegar a la meta.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. <i>Bothrops diporus</i> (Cope, 1862). Descripción, taxonomía y distribución	5
1.2. Composición proteica del veneno de <i>B. diporus</i> . Fosfolipasas A ₂ (PLA ₂ s).....	6
1.3. Cáncer y metástasis. Efectos sobre la adhesión y migración celular.....	7
1.4. Uso potencial de componentes aislados de venenos de serpiente en el tratamiento del cáncer.....	8
1.5. Propuesta de Trabajo Final de Graduación.....	9
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo general.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. HIPÓTESIS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Veneno.....	10
4.2. Aislamiento y purificación de la enzima fosfolipasa A ₂ (PLA ₂).....	10
4.2.1. Actividad hemolítica indirecta – Actividad fosfolipásica.....	10
4.2.2. Ausencia de actividad proteolítica.....	10
4.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).....	10
4.3. Cultivo celular.....	10
4.3.1. Línea LM3.....	10
4.3.2. Mantenimiento de los cultivos.....	11
4.3.3. Subcultivos celulares.....	11
4.4. Ensayos de Citotoxicidad.....	11
4.5. Ensayo de Adhesión celular.....	11
4.6. Ensayos de Migración celular.....	12
4.6.1. Método de “Wound-healing”.....	12
4.6.2. Método de migración a través de insertos “transwell”.....	12
4.7. Análisis Estadístico.....	12
5. RESULTADOS.....	12
5.1. Aislamiento y purificación de la fosfolipasa A ₂ (PLA ₂) del veneno de <i>B. diporus</i>	12
5.2. Citotoxicidad de la PLA ₂ de <i>B. diporus</i>	13
5.3. Inhibición de la adhesión celular	15
5.4. Inhibición de la migración celular.....	16
6. DISCUSIÓN.....	18
7. CONCLUSIÓN.....	19
8. BIBLIOGRAFÍA.....	20

RESUMEN

La mayoría de los cánceres se caracterizan por procesos de múltiples pasos que involucran muchas anomalías genéticas, cada una de las cuales contribuye a la pérdida del control de la proliferación y diferenciación celulares, y a la adquisición de capacidades como la invasión hística, el potencial de metástasis y la angiogénesis. El proceso de metástasis comienza con el desprendimiento y migración de células a diferentes sitios a través de vasos sanguíneos/linfáticos para luego adherirse e invadir un sitio distal. Por lo tanto, comprender los mecanismos biológicos que impulsan la migración y adhesión de las células cancerosas y diseñar medicamentos para combatirlos constituyen las necesidades actuales en oncología.

La capacidad de algunas toxinas de veneno de serpiente para causar toxicidad se asocia con su alta especificidad y afinidad por células y tejidos. A pesar de sus efectos toxicológicos, varias proteínas y péptidos aislados de venenos ofídicos han demostrado tener aplicaciones prácticas como agentes farmacéuticos. En este sentido varias fosfolipasas A₂ (PLA₂s) han evidenciado poseer propiedades anti-tumorales. En el presente trabajo, se logró aislar y purificar por técnicas cromatográficas de intercambio iónico y exclusión molecular, una enzima del tipo PLA₂ del veneno *Bothrops diporus* de la región nordeste de Argentina. Se estudió su actividad citotóxica sobre células tumorales de la línea LM3 demostrando un efecto dosis dependiente. Por otro lado, se evaluó el potencial efecto de esta enzima sobre la adhesión y migración celular. Para ello, se utilizaron concentraciones que demostraron no ser citotóxicas para las células a las 3 y 24h de incubación.

Los resultados mostraron que la adhesión celular fue inhibida de forma proporcional al aumento de la concentración de la enzima al que fueron expuestas las células. Así, con 10 µg/mL de PLA₂, la adhesión se inhibió en un 60% y con la dosis más baja (1,25 µg/mL) en un 20%. De forma similar, a través de dos métodos diferentes (cierre de la herida e insertos transwell) se demostró que la migración de las células tumorales fue inhibida en presencia de la toxina ofídica. Nuevamente este proceso dependió de la dosis de la PLA₂ con la que se incubaron las células, siendo el efecto inhibitorio de aproximadamente un 56% para 0,25 µg/mL y de 13% para 0,125 µg/mL. Estos resultados sugieren que estas moléculas pueden ser un nuevo prototipo de agentes anticancerígenos y proporcionan nuevos conocimientos moleculares y biológicos sobre el desarrollo de fármacos contra el cáncer.

1. INTRODUCCION

1.1. *Bothrops diporus* (Cope, 1862). Descripción, taxonomía y distribución.

Las serpientes venenosas de mayor importancia médica en nuestro país pertenecen a tres géneros, *Crotalus*, *Micrurus* y *Bothrops*, siendo las especies *Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus* (de interés en este trabajo) responsables de alrededor del 98% de los accidentes por envenenamiento (de Titto *et al.*, 2017).

Bothrops diporus (Cope, 1862), comúnmente conocida como "yarára chica" es un vipérido considerado anteriormente una subespecie dentro del complejo *B. neuwiedi*. Sin embargo, luego de una revisión de la sistemática se elevó a *B. diporus* a nivel de especie (da Silva y Rodrigues, 2008).

Mide entre setenta centímetros y un metro de longitud. Posee coloración dorsal parduzco-rojiza, en la que se destacan usualmente grandes manchas regulares marrones, muy oscuras, de aspecto trapezoidal o semilunar bordeadas de blanco. En la cabeza hay dibujos característicos formados por estrías marrones dispuestas groseramente en herradura en la región posterior nuchal, prolongándose hacia el cuello y casi en forma de anillo sobre el hocico. La faz ventral es blanquecina con pigmentos, moderadamente oscura en las suturas de las escamas (Figura 1.1.) (Scrocchi, 2006).



Figura 1.1. *Bothrops diporus* (Cope, 1862)

Esta serpiente se encuentra distribuida desde el suroeste de Brasil a través de Paraguay hasta la región del nordeste y centro de la Argentina que incluye a Catamarca, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán llegando hasta el sur en el Norte de la Patagonia (Figura 1.2.) (de Oliveira *et al.*, 2011).



Figura 1.2. Distribución de las serpientes del género *B. diporus* en Argentina (de Oliveira *et al.* 2011).

1.2. Composición proteica del veneno de *B. diporus*. Fosfolipasas A₂ (PLA₂s).

La mayoría de los componentes tóxicos y biológicamente activos de los venenos de serpiente, son proteínas. Trabajos previos han demostrado que aproximadamente el 90% del peso seco (~25%) de la mayoría de estos venenos consiste en material proteico. La porción no proteica del veneno es una cantidad mucho menor y, en general, biológicamente menos activa que incluye iones metálicos, aniones inorgánicos y algunas moléculas orgánicas pequeñas como péptidos, lípidos, nucleósidos, carbohidratos y aminas (Bieber, 1979).

Los estudios proteómicos de venenos de serpientes han revelado la existencia de una gran cantidad de proteínas que se pueden clasificar en un número limitado de familias (Calvete, 2011). En particular, el proteoma del veneno de *B. diporus* comprende toxinas que pertenecen a catorce familias de proteínas principalmente representadas por fosfolipasas A₂ (PLA₂), metaloproteasas del tipo PI y PIII (SVMP), péptidos potenciadores de bradiquinina (VAP), L-aminoácido oxidasas (LAO) y serino proteasas (SVSP) (Figura 1.3.) (Gay *et al.*, 2015).

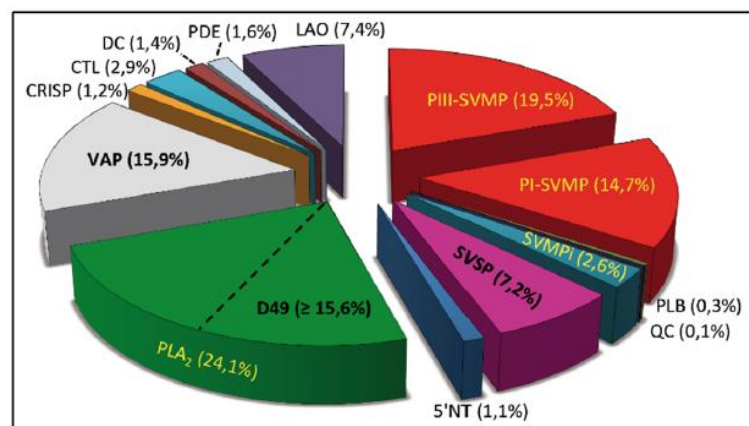


Figura 1.3. Composición proteica relativa del veneno de *B. diporus* (en % del total de proteínas del veneno) (Gay *et al.*, 2015).

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) son una familia de enzimas que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos (Pereanez *et al.*, 2009). Están ampliamente distribuidas en secreciones pancreáticas, exudados inflamatorios y venenos de artrópodos y serpientes (Dennis, 1994). Numerosas PLA₂ han sido aisladas de los venenos de serpientes (Gutiérrez y Lomonte, 2013). Estas enzimas pueden ser ácidas ó básicas, son variantes catalíticamente activas, cuando poseen el aminoácido ácido aspártico en la posición 49 de su secuencia aminoacídica (Asp-49) ó sus homólogas catalíticamente inactivas, cuando se encuentra una lisina en esa misma posición (Lys-49) (Gutiérrez y Lomonte, 1995).

A pesar de tener una estructura tridimensional similar, las PLA₂s ejercen una sorprendente variedad de actividades tóxicas y farmacológicas que incluyen efectos neurotóxicos, miotóxicos, hemolíticos, edematosos, hiperalgésicos, proinflamatorios, hipotensivos, inhibidores de la agregación plaquetaria, anticoagulantes y citotóxicos (Gutiérrez y Lomonte, 2013). Sin embargo, además de estos efectos fisiopatológicos, poseen potencial terapéutico debido a sus actividades antimicrobiana, anti-plaquetaria, anti-parasitaria e hipotensiva (Santos-Filho *et al.*, 2008; Chaisakul *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2016).

Los modelos de cultivo celular han sido ampliamente utilizados para dilucidar los mecanismos de daño citotóxico de los venenos de serpientes y sus principales componentes. En este sentido, las PLA₂s aisladas de diferentes especies ofídicas se han estudiado sobre una gran variedad de líneas celulares en cultivo demostrando un amplio espectro de citotoxicidad (Bruses *et al.*, 1993; Lomonte *et al.*, 1994a; Lomonte *et al.*, 1994b; Lomonte *et al.*, 1999; Andriao-Escarso *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2005; Damico *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2008; Perumal Samy *et al.*, 2008).

1.3. Cáncer y metástasis. Efectos sobre la adhesión y migración celular.

«Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina «metástasis» (WHO, 2018). Esta diseminación de células cancerosas desde el tumor primario es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer (Andrade Carvalho *et al.*, 2013) y constituye la segunda causa de mortalidad en nuestro país después de las enfermedades cardiovasculares según los datos del Instituto Nacional de Cáncer (INC, 2019).

La comprensión de los eventos que transforman una célula normal en una célula cancerosa ha provocado el desarrollo de nuevas terapias que están diseñadas para tratar un gen crítico o una ruta biológica determinada (Calderon *et al.*, 2014). Por lo tanto, la búsqueda de nuevos fármacos activos para la terapia del cáncer es uno de los objetivos principales en la investigación biotecnológica.

El proceso de metástasis comienza con el desprendimiento y desplazamiento de células a diferentes sitios a través de vasos sanguíneos/linfáticos para luego asentarse y crecer en un sitio distal. Durante este proceso, las células metastásicas pasan por cuatro procesos esenciales: desprendimiento, migración, invasión y adhesión (Lee *et al.*, 2003).

La **adhesión celular** juega un papel integral en la comunicación y regulación celular, y es de importancia fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos. Se la define como la capacidad de una sola célula para adherirse a otra célula o a la matriz extracelular. Además, permite que las células se puedan mover en o entre los tejidos, primero perdiendo la adhesión que las mantiene fijas y posteriormente exponiendo otras moléculas que permitan crear puntos de anclaje y arrastrar el citoplasma en la dirección del movimiento.

Hay diferentes tipos de moléculas que intervienen en la adhesión, aquellas que participan en la unión de la célula a la matriz extracelular y aquellas que establecen uniones directas entre dos células contiguas. Las integrinas son las moléculas más importantes en la adhesión de la célula a la matriz extracelular. Son una gran familia de proteínas transmembrana presentes en prácticamente todos los animales y estructuralmente están formadas por dos subunidades (alfa y beta). Por otro lado, las moléculas que intervienen en la adhesión entre células son de cuatro tipos: cadherinas, inmunoglobulinas, selectinas y algunos tipos de integrinas (Luo *et al.*, 2007).

El estudio de la adhesión celular ha sido ampliamente explorado en los campos de la biología celular y la biomédica. Los cambios en la adhesión celular pueden ser el evento definitorio en una amplia gama de enfermedades, incluido el cáncer. Las células tumorales se caracterizan por cambios en la adhesividad que pueden estar relacionadas con el potencial invasivo y metastásico (Figura 1.4.) (Khalili y Ahmad, 2015).

Como ya hemos mencionado previamente, el cáncer mata a los pacientes esencialmente debido a la naturaleza migratoria de sus células. De hecho, está bien establecido que la **migración celular** juega un papel fundamental en la dispersión, invasión de tejidos y la metástasis (Figura 1.4.) (Debeir *et al.*, 2008). Por lo tanto, comprender los mecanismos biológicos que impulsan la migración de las células cancerosas y diseñar medicamentos anti-migratorios para combatirlos constituyen las necesidades actuales en oncología.

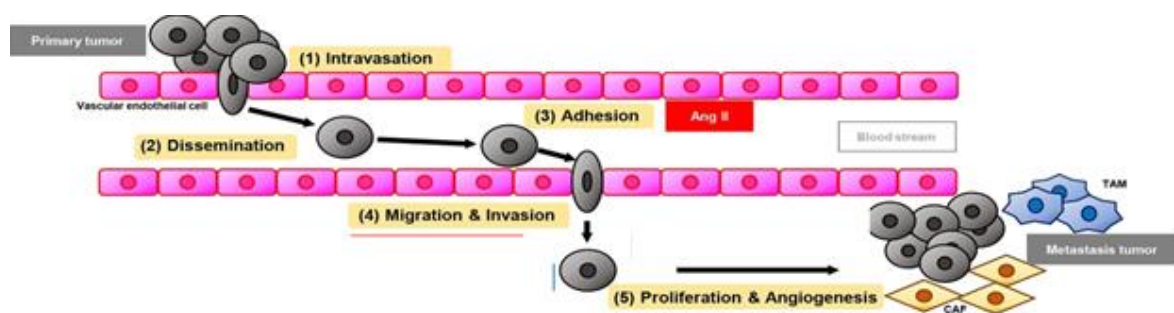


Figura 1.4. Metástasis tumoral: Las células de tumores primarios se separan, viajan por el torrente sanguíneo o linfático por intravasación, disseminación, adhesión, migración e invasión, proliferación y angiogénesis, formando metástasis tumorales en tejidos secundarios. (Ishikane y Takahashi-Yanaga, 2018).

1.4. Uso potencial de componentes aislados de venenos de serpiente en el tratamiento del cáncer.

Muchas de las drogas oncológicas derivan de la extracción y purificación de toxinas o metabolitos secundarios procedentes de microorganismos, plantas y animales.

La capacidad de algunas toxinas de veneno de serpiente para causar toxicidad se asocia con su alta especificidad y afinidad por células y tejidos. A pesar de sus efectos toxicológicos, varias proteínas y péptidos aislados de venenos ofídicos han demostrado aplicaciones prácticas como agentes farmacéuticos (Vyas *et al.*, 2013).

Se ha demostrado previamente sobre modelos *in vitro* que algunas PLA₂s ofídicas poseen propiedades anti-tumorales y anti-angiogénicas. Así, podemos mencionar como ejemplos, el potencial antitumoral de dos fosfolipasas aisladas del veneno de *Bothrops jararacussu*, una miotoxina básica (Prinholato da Silva *et al.*, 2015) y una PLA₂ ácida (Roberto *et al.*, 2004); una PLA₂ del tipo Lys49 (BnSP6) del veneno de *Bothrops pauloensis* (Azevedo *et al.*, 2016a) y una PLA₂ (Drs-PLA₂) del veneno de *Daboia russelii siamensis* (Khunsap *et al.*, 2011), entre otras.

Es interesante señalar el efecto antitumoral de una PLA₂ acídica del veneno de *Macrovipera lebetina transmediterranea* denominada MVL-PLA₂. Esta toxina resultó no ser citotóxica hasta concentraciones de 2 µM e inhibir completamente la adhesión y migración de varias líneas celulares tumorales humanas (Bazaa *et al.*, 2009). Del mismo modo, dos PLA₂s no tóxicas purificadas del veneno de *Cerastes cerastes* inhibieron la adhesión y migración celular de una línea de fibrosarcoma (HT1080) (Zouari-Kessentini *et al.*, 2009).

También se ha publicado sobre el efecto antitumoral de péptidos sintéticos derivados de PLA₂s, como los obtenidos de los venenos de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* y *Bothrops asper* (Araya y Lomonte, 2007).

Previamente, se ha estandarizado el aislamiento de una PLA₂ básica del veneno de *Bothrops diporus* del nordeste argentino (NEA) y se demostró su efecto citotóxico sobre la línea tumoral LM3 (Matzner Perfumo *et al.*, 2014; Matzner Perfumo *et al.*, 2016).

1.5. Propuesta de Trabajo Final de Graduación

Debido a todo lo expuesto, se propuso en este plan de trabajo el estudio del potencial efecto sobre la adhesión y migración de células tumorales de una fosfolipasa A₂ básica aislada del veneno de *B. diporus* de la región nordeste de Argentina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General:

- Estudiar el potencial efecto de una fosfolipasa A₂ (PLA₂) básica aislada del veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) (Cope, 1862), sobre la adhesión y migración de células tumorales de la línea celular LM3.

2.2. Objetivos Específicos:

- Evaluar los efectos sobre la adhesión celular de la PLA₂ básica aislada del veneno de *Bothrops diporus*, en células epiteliales mamarias murinas tumorales de la línea celular LM3.
- Estudiar la migración de las células de la línea LM3 al ser expuestas a una PLA₂ básica aislada del veneno de *Bothrops diporus*.

3. HIPOTESIS

La fosfolipasa A₂ básica aislada del veneno de *Bothrops diporus* (Cope, 1862), inhibe la adhesión y migración de células tumorales *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Veneno

Se trabajó con un pool de venenos de especímenes adultos de ambos sexos de *B. diporus* proporcionado por el Centro de Producción de Suero Antiofídico (CEPSAN) del Ministerio de Producción de la Provincia de Corrientes. El mismo fué desecado, homogeneizado y conservado en freezer a -20°C hasta el momento de ser utilizado en los ensayos.

4.2. Aislamiento y purificación de la enzima fosfolipasa A_2 (PLA₂)

El aislamiento y purificación de la enzima PLA₂ se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en una cromatografía de intercambio iónico (Sulfopropil-celulosa, 35 mg de veneno disueltos en 500 μL de buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8). Se recolectó la fracción proteica unida a la columna (básica/carga positiva) utilizando el mismo buffer con el agregado de NaCl 0,5M para aumentar la fuerza iónica, posteriormente se concentró hasta obtener un volumen de 800 μL y se sembró en una columna cromatográfica de exclusión molecular (Sephadex G75) equilibrada y eluída con buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7. El perfil proteico de elusión se determinó a través de la medida de la absorbancia a 280 nm y a cada fracción se le ensayó la actividad hemolítica indirecta y la actividad proteolítica. Los tubos que contenían la proteína de interés se mezclaron en un pool, se concentraron y se mantuvieron a -20°C .

4.2.1. Actividad hemolítica indirecta – Actividad fosfolipásica

La detección y cuantificación de la actividad fosfolipásica se llevó a cabo por hemólisis radial indirecta. Brevemente, los eritrocitos de carnero y la fosfatidilcolina se incorporaron en un gel de agar (22 mL), 10 μL de cada fracción se agregaron a pocillos abiertos en el gel, de manera que se produjo una difusión radial. Se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 20 horas. Al cabo de este tiempo, se leyó el diámetro del halo de hemólisis, el cual guardó relación con la actividad fosfolipasa A_2 (Gutiérrez *et al.*, 1988).

4.2.2. Ausencia de actividad proteolítica.

La actividad proteolítica se estudió usando azocaseína como sustrato, el cual fue incubado con las fracciones por 90 minutos a 37°C , seguida desproteinización (con ácido tricloroacético). Se realizó una segunda incubación por 30 minutos a 37°C y finalmente los tubos fueron centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante en medio alcalino a 450 nm, conteniendo los productos de la proteólisis. El incremento de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad proteolítica.

4.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Se realizó en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), usando 15% de gel de poliacrilamida en condiciones reducidas. Los geles fueron coloreados con Coomassie Blue (Laemmli, 1970).

4. 3. Cultivo celular

4.3.1. Línea LM3:

Se utilizó la línea celular LM3 (CVCL_D269) proveniente de un neoplasma maligno de glándula mamaria murina. Tejido: tumor epitelial mamario murino. Cepa: BALB/c. Tipo celular: células epiteliales tumorales (Urtreger *et al.*, 2001).

4.3.2. Mantenimiento de los cultivos

La línea celular se mantuvo en Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen) con el agregado de 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (GIBCO-Invitrogen), L-Glutamina (29,2 mg/mL), Penicilina (10,000 unidades/mL) y Estreptomicina (10,000 µg/mL) (GIBCO-Invitrogen) como antibióticos.

4.3.3. Subcultivos celulares

El subcultivo celular permitió controlar la densidad del inóculo inicial que asegura que se trabajó en condiciones de crecimiento óptimas. Para ello, se eliminó el medio de cultivo y se cubrió la monocapa con cantidad suficiente de Tripsina-EDTA 0.25% (GIBCO-Invitrogen) y se incubó durante 3-5 minutos a 37°C. Una vez que la monocapa se despegó, se agregó suero fetal bovino para inactivar la enzima. Luego del recuento celular con azul de tripan, entre 0,5 - 1×10^5 cél/mL se sembraron en placas o frascos estériles rotulando: línea, pasaje, medio y fecha correspondientes. Se incubó a 37 °C y 5% de CO₂.

4.4. Ensayos de Citotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron las células obtenidas de monocapas subconfluentes. Las células resuspendidas se sembraron en placas de 96 pocillos, 2,0-2,5x10⁴ células por pocillo, en el mismo medio de crecimiento (DMEM-SFB 5%). Al alcanzar la monocapa un 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y diferentes concentraciones (1,5-500 o 0,125-5 µg/mL) de PLA₂ diluidas en el medio de cultivo suplementado con 5% de SFB fueron adicionadas a las células en cultivo (200 µL/pocillo). Luego de 3 o 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda, la viabilidad celular se cuantificó por tinción con el colorante Cristal violeta. La citotoxicidad se evaluó por comparación de las absorbancias resultantes de los pocillos con tratamiento, con la absorbancia promedio de los pocillos utilizados como control (sin tratamiento, considerados como 100% de viabilidad) y fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular. Los cambios morfológicos inducidos se observaron por microscopía de contraste de fases y se capturaron imágenes con cámara digital. Los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres ensayos independientes (Bustillo *et al.*, 2012).

4.5. Ensayo de Adhesión celular

Brevemente, se incubó una mezcla (1:1) de suspensión de células de la línea LM3 (3x10⁴ cel/mL, DMEM-SFB 5%) y la PLA₂ a ensayar en concentraciones no-citotóxicas (según ítem 4.4.), durante 30 minutos a 37°C. Estas mezclas se sembraron en la placa de 96 pocillos (100µL/pocillo) y se incubaron 90 minutos a 37 °C y 5% de CO₂. Se eliminaron las células no adheridas por lavado suave con PBS y se evaluó la adhesión utilizando el método de Cristal violeta. Se consideró como 100% de adherencia, los ensayos en los que las células se incubaron solo con el medio de cultivo (Paludo *et al.*, 2006).

4.6. Ensayos de Migración celular.

4.6.1. Método de “Wound-healing”.

La migración celular se evaluó utilizando el ensayo de cicatrización de la herida o “wound healing”. Se cultivaron las células de la línea LM3 en placas de 6 pocillos (1×10^6 cél/well) durante 24 horas. Una vez obtenida la monocapa celular en aproximadamente 90% de confluencia, se realizaron heridas con la punta de un tip estéril y las células flotantes se eliminaron lavando dos veces con PBS. Luego se adicionaron concentraciones sub-citotóxicas de la toxina aislada (0,125 y 0,25 $\mu\text{g/mL}$) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO_2 . La migración celular hacia la superficie de la herida fue determinada bajo un microscopio invertido. Se realizaron registros fotográficos y se calcularon los porcentajes de cierre de la herida (ancho de la herida en tiempo 0 h - ancho de la herida en el momento 24h) / (ancho del tiempo de la herida 0 h) x 100 (Bustillo *et al.*, 2019).

4.6.2. Método de migración a través de insertos “transwell”.

Este método se realizó también para evaluar la capacidad de migración de las células de la línea LM3 frente a la PLA_2 . Las células se sembraron dentro de insertos Biofil™ (8 μm) para 24 wells junto con la enzima (0,125 y 0,25 $\mu\text{g/mL}$) en medio de cultivo sin suplemento de SFB. En el pocillo inferior se colocó medio de cultivo suplementado con 5% SFB. Luego se incubó por 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%. Al final de la incubación, las células que migraron se fijaron y cuantificaron a través del método con el colorante Cristal violeta. Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados se reportaron como el índice de migración en comparación al control de células cultivadas únicamente en presencia de medio de cultivo (Debeir *et al.*, 2008).

4.7. Análisis Estadístico

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Los resultados de las diferentes determinaciones se expresaron como la media $\pm$ DS. Las diferencias entre grupos se valoraron mediante Anova univariado (One way ANOVA) de una vía seguido por la prueba de Tuckey (HSD) para comparar múltiples grupos frente a un grupo control utilizando el software Statistix (Version 3.5). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento y purificación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) del veneno de *B. diporus*.

La primera etapa cromatográfica de intercambio iónico (Sulfopropil-celulosa) permitió separar y concentrar la fracción proteica con carga positiva o básica del veneno de *B. diporus* para una posterior etapa de la purificación (Figura 5.1.). Este segundo paso consistió en una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) que mostró el perfil que se observa en la Figura 5.2. Si bien todas las fracciones obtenidas presentaron actividad hemolítica indirecta (Figura 5.2. –flecha doble), se seleccionó el último pico proteico por ser el único con ausencia de actividad proteolítica, indicando que no había proteasas presentes. Estas fracciones fueron concentradas y se evaluó la pureza de la enzima por SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras, observándose una sola banda homogénea con un peso molecular de ~ 14 kDa.

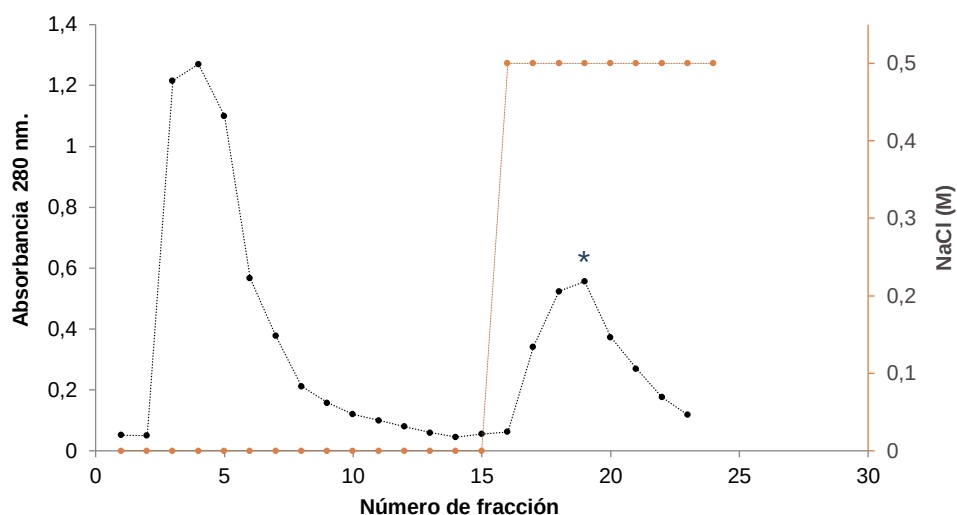


Figura 5.1. Cromatografía de Intercambio Iónico (SP) del veneno de *B. diporus* (35 mg/mL), equilibrada con Buffer Tris HCl 20mM y luego eluido por aumento de la concentración de NaCl (0,5M). Todos los picos mostraron actividad hemolítica y proteolítica. (*) Fracción proteica básica, con carga positiva al pH del trabajo.

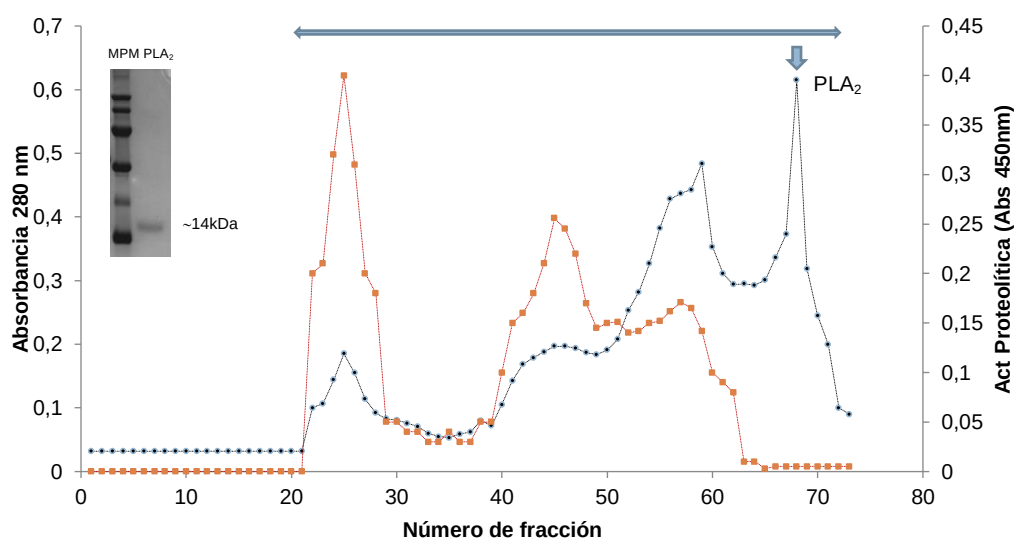


Figura 5.2. Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) de la fracción obtenida por intercambio iónico (*). Elución con Buffer Tris HCl 20 mM. La doble flecha indica fracciones con actividad hemolítica. El eje secundario indica actividad proteolítica. El pico de PLA₂ escogido posee actividad hemolítica y no posee actividad proteolítica (flecha). Inserto: SDS-PAGE: calle 1: MPM, calle2: PLA₂ (~14kDa) condiciones reductoras.

5.2. Citotoxicidad de la PLA₂ de *B. diporus*.

La PLA₂ básica aislada del veneno de *Bothrops diporus* evidenció un efecto citotóxico dosis dependiente sobre la línea LM3 luego de 3 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂. La viabilidad celular disminuyó aproximadamente un 10% cuando las células fueron expuestas a la mayor concentración ensayada (500µg/mL) (Figura 5.3.). Dosis intermedias de la enzima, 15,625 a 250 µg/mL, inhibieron la viabilidad de las células entre un 10 a un 30%, y, por último, expuestas a 10 µg/mL ya no mostraron diferencias significativas con respecto al control (100% de viabilidad celular). Estos resultados permitieron definir que la enzima PLA₂ de *B. diporus* no resulta citotóxica en dosis menores a 10 µg/mL sobre las células de la línea LM3 cuando son expuestas durante 3 horas.

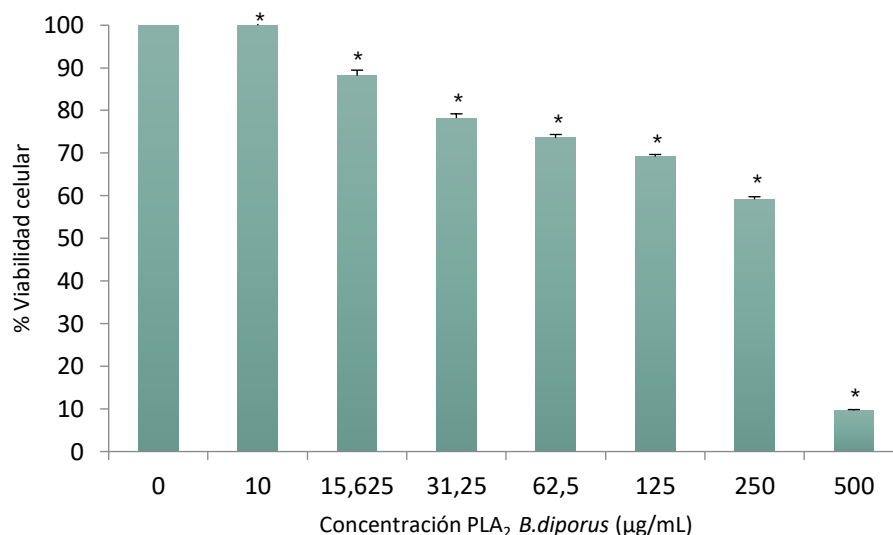


Figura 5.3. Actividad citotóxica de PLA₂ de *Bothrops diporus* (10-500 µg/mL) sobre la línea celular tumoral LM3 luego de 3 horas de exposición. La media del grupo de control, tratado con medio solo, se tomó como el 100% de la viabilidad celular. Los datos (media ±SD) son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * p <0,05: PLA₂ vs grupo control.

Los cambios morfológicos inducidos por las diferentes concentraciones de la enzima se muestran en la Figura 5.4. En los pocillos correspondientes al control y a la menor dosis ensayada (10 µg/mL), las células que no muestran efectos citotóxicos, se observan con morfología poliédrica normal y cubriendo en un 95-100% la superficie de cultivo. Sin embargo, a dosis más altas (como por ej. 31,25 y 250 µg/mL), las células empiezan a redondearse y desprenderse observándose áreas libres en la monocapa celular (Figura 5.4.)

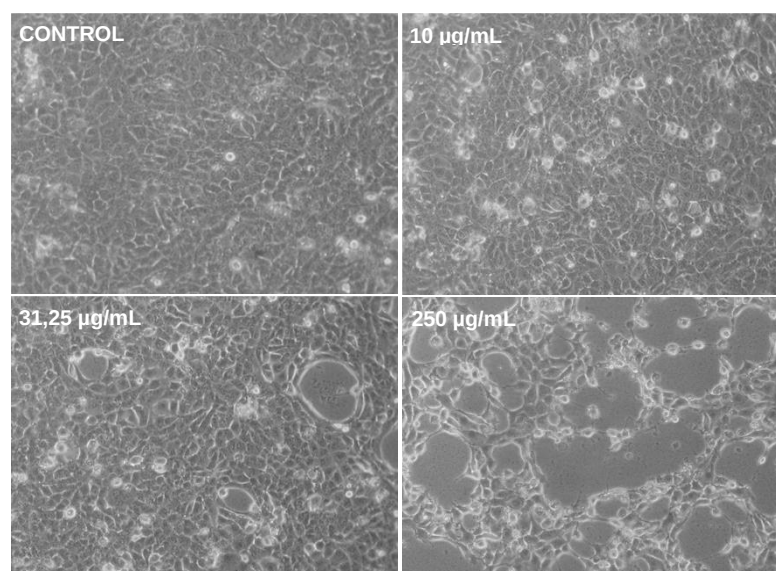


Figura 5.4. Observación morfológica por microscopía de contraste de fases de los cambios inducidos por la enzima PLA₂ del veneno de *B. diporus* sobre la línea LM3

Para la selección de las dosis apropiadas para la realización de los ensayos de migración celular, se determinó además la citotoxicidad incubando las células en presencia de la PLA₂ por 24 horas.

Se evaluaron concentraciones de la enzima desde 0,125 a 5 µg/mL. Las dosis que no mostraron actividad citotóxica fueron aquellas menores a 0,25 µg/mL.

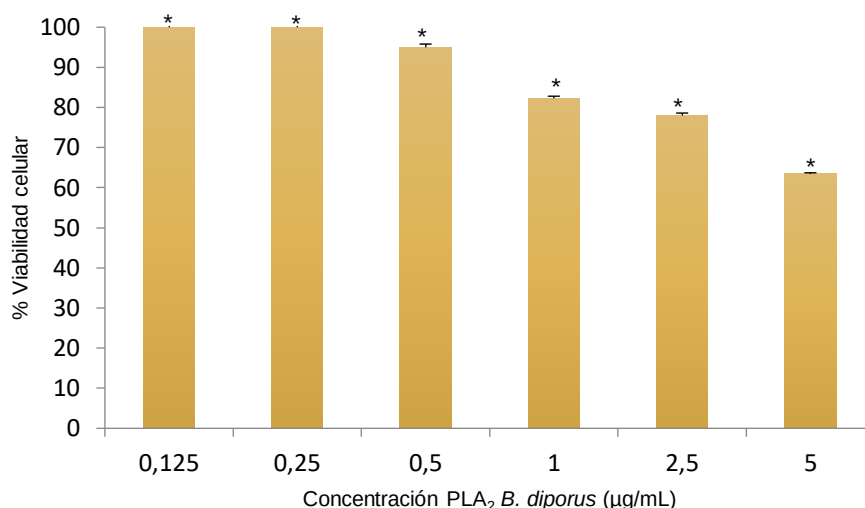


Figura 5.4. Actividad citotóxica de PLA₂ de *Bothrops diporus* (0,125-5 µg/mL) sobre la línea celular tumoral LM3 luego de 24 horas de exposición. La media del grupo de control, tratado con medio solo, se tomó como el 100% de la viabilidad celular. Los datos (media ±SD) son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * p <0,05: PLA₂ vs grupo control.

5.3. Inhibición de la adhesión celular

En este ensayo, al pre-incubar las células con la PLA₂ (1,25-10 µg/mL; dosis no citotóxicas), se pudo comprobar un efecto inhibitorio en la adhesión celular dependiente de la concentración. Al exponer las células a 10 µg/mL de la enzima, la inhibición fue de aproximadamente un 60% con respecto a las células no tratadas. Incluso con la dosis más baja ensayada (1,25 µg/mL) se observó un efecto inhibitorio del 20% (Figura 5.5).

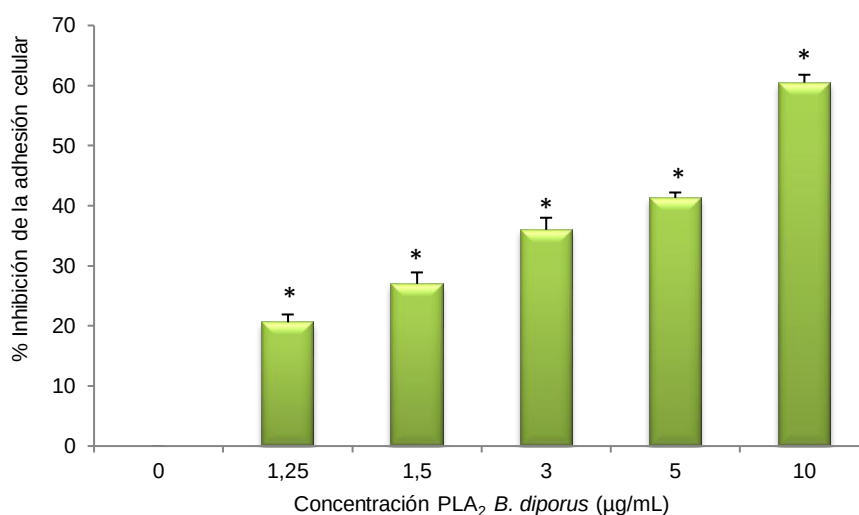


Figura 5.5. Inhibición de la adhesión celular inducido por la enzima PLA₂ de *Bothrops diporus* (1,25-10 µg/mL). Las barras representan el porcentaje de inhibición de la adhesión con respecto al control (células incubadas solo con medio de cultivo, se considerado como 100 % de adhesión). Cada punto representa la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * p <0,05 diferencias significativas con respecto al control.

5.4. Inhibición de la migración celular

El efecto de la PLA₂ de *B. diporus* sobre la migración de las células tumorales de la línea LM3 fue evaluado por dos metodologías diferentes. Los resultados obtenidos por ambos métodos mostraron un efecto

inhibitorio de la enzima dosis dependiente sobre la migración de las células tumorales. En primer lugar, a través del método de cierre de la herida o “Wound-healing”, se pudo comprobar que la concentración más alta (0,25 $\mu\text{g/mL}$) inhibió la migración en aproximadamente un 55% con respecto al control. Por otro lado, la menor dosis (0,125 $\mu\text{g/mL}$) sólo logró disminuir la migración en un 8% (Figura 5.6. y 5.7.).

Utilizando los insertos Biofil™ (8 μm) para 24 wells y evaluando las mismas concentraciones de PLA₂, se obtuvieron resultados similares. La inhibición de la migración celular sobre las células tumorales fue de 58 y 18 % con respecto al control para las dosis de 0,25 y 0,125 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Figura 5.8.).

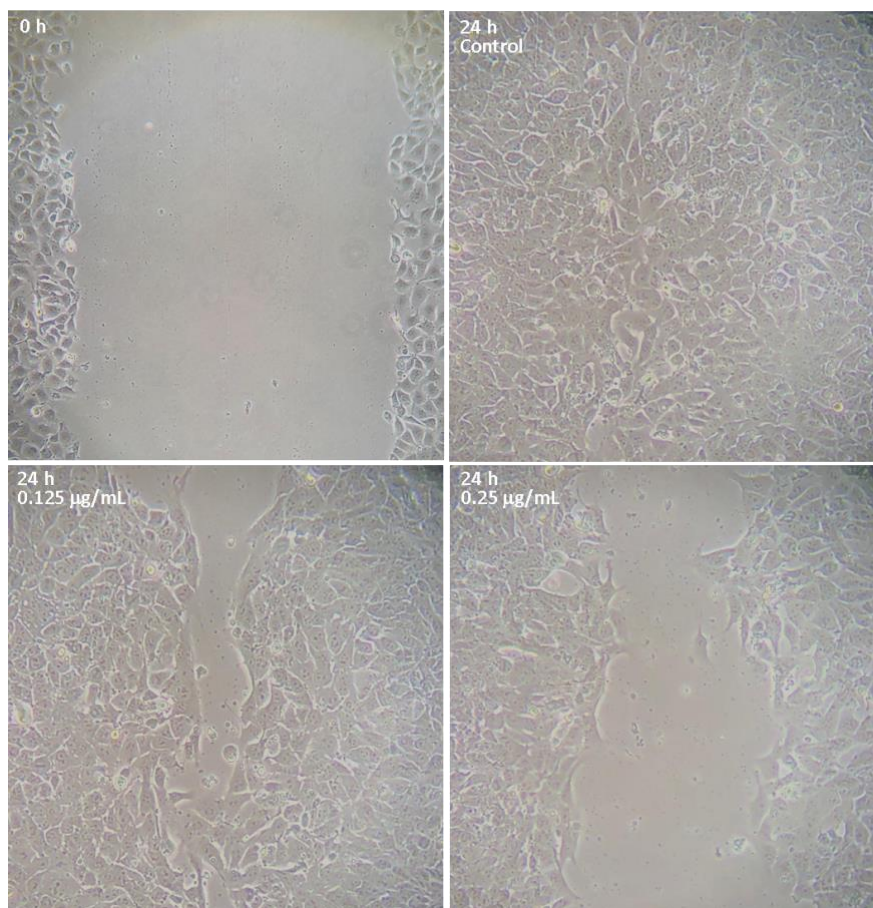


Figura 5.6. Ensayo de cierre de la herida o “Wound healing”. El diámetro de la herida se evaluó a través de registros fotográficos.

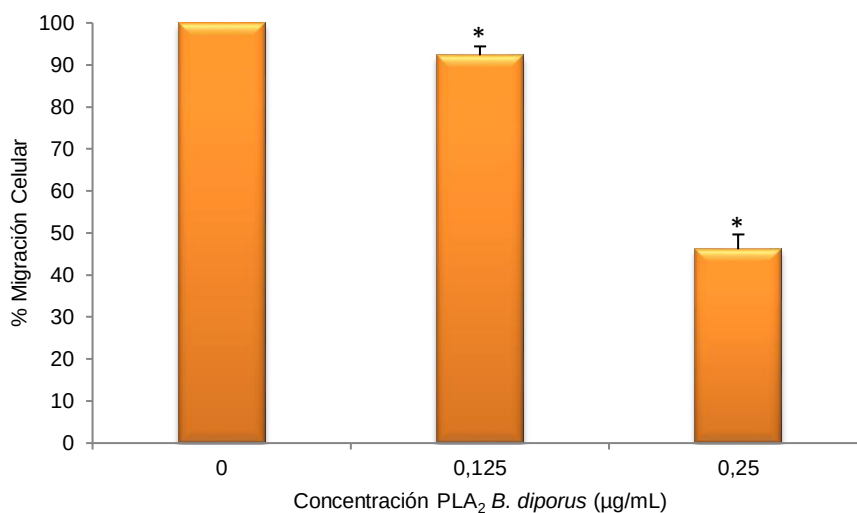


Figura 5.7. Efecto de PLA₂ de *Bothrops diporus* sobre la migración celular por el método de cierre de la herida o "Wound healing". Se calculó el porcentaje de migración de las células considerando a los controles como 100% de migración celular. Cada barra representa la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * p < 0,05 diferencias con respecto al control.

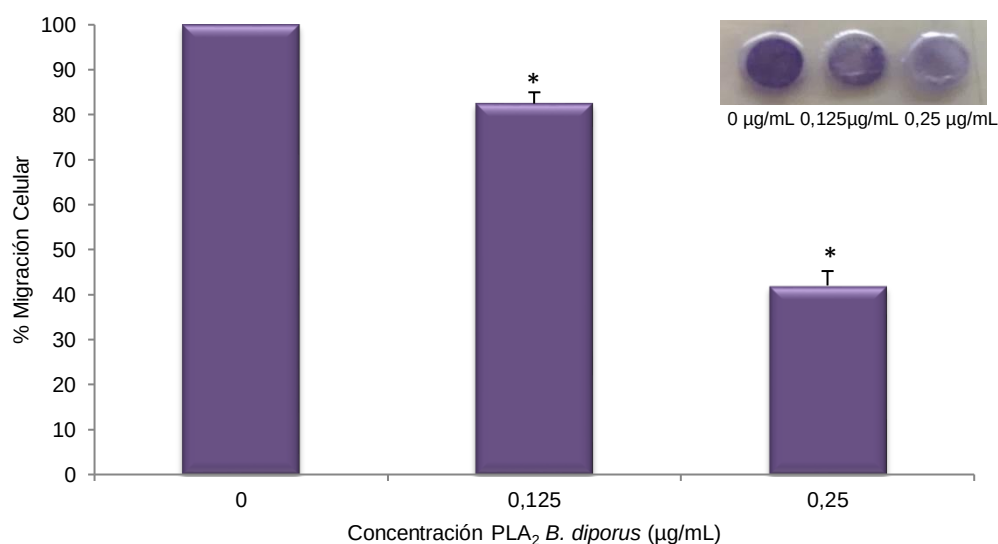


Figura 5.8. Efecto de la PLA₂ de *Bothrops diporus* sobre la migración celular por el método de los insertos transwell. Cada barra representa la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * p < 0,05 diferencias con respecto al control. Inserto: imagen de las células que migraron a través de las membranas de 8 µm fijadas y coloreadas con cristal violeta.

6. DISCUSIÓN

Actualmente, las terapias anticancerígenas están dirigidas a la proliferación clonal incontrolada de células cancerosas con fármacos citostáticos, que son una estrategia terapéutica efectiva para ciertos tipos de cáncer como las neoplasias hematológicas. Sin embargo, en los cánceres sólidos, la proliferación se acompaña de la capacidad de invadir y ejecutar metástasis, que implica diferentes mecanismos moleculares que no son inhibidos o afectados por los fármacos anticancerígenos convencionales. Por lo tanto, buscar y diseñar medicamentos específicos para inhibir la invasión y metástasis para el tratamiento de cánceres sólidos es un tema muy relevante (Urra y Araya-Maturana, 2017).

Específicamente en el proceso de metástasis, se busca que las drogas actúen sobre los pasos esenciales por los que pasan las células: desprendimiento, migración, invasión y adhesión (Lee *et al.*, 2003).

Se ha demostrado previamente que toxinas aisladas de venenos de serpientes o recombinantes, exhiben efectos anticancerígenos en modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo*. Las metaloproteasas (SVMP), desintegrinas, fosfolipasas A₂ (PLA₂s), lectinas de tipo C (CLP), proteínas inductoras de apoptosis vascular y oxidasas de L-aminoácidos han demostrado ser capaces de inhibir la angiogénesis (Dhananjaya y Sivashankari, 2015; Azevedo *et al.*, 2016a; Guimaraes *et al.*, 2017).

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son componentes abundantes de los venenos de serpiente que se han estudiado ampliamente debido a sus efectos farmacológicos y fisiopatológicos en los organismos vivos. En los últimos años, las PLA₂s se han investigado como herramientas para comprender mejor los mecanismos relacionados con el cáncer. En este trabajo, la PLA₂ aislada del veneno de *B. diporus* demostró ser citotóxica sobre la línea de células tumorales LM3 de manera dosis dependiente. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por otros autores como por ejemplo lo evidenciado para BnSP-6, una PLA₂ del tipo Lys-49 aislada del veneno de *Bothrops pauloensis*, que demostró tener efecto citotóxico sobre una línea celular de cáncer de mama (Azevedo *et al.*, 2016b). Así como también, BthTX-I, una miotoxina básica purificada del veneno de *Bothrops jararacussu* que demostró ser citotóxica sobre varias líneas tumorales: HL-60 (leucemia promielocítica), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), PC-12 (feocromocitoma murino) y B16F10 (melanoma murino) (Prinholato da Silva *et al.*, 2015). Del mismo veneno de *B. jararacussu*, una PLA₂ ácida ha demostrado poseer potencial antitumoral actuando sobre adenocarcinoma de mama, leucemia humana de células T y tumor ascítico de Erlich (Roberto *et al.*, 2004).

Si bien, como mencionamos previamente, existe evidencia sobre cómo estas toxinas actúan induciendo la muerte de células tumorales, hay información muy reducida sobre la inhibición de los mecanismos de adhesión, migración e invasión de células metastásicas.

En este sentido, podemos mencionar lo reportado para una PLA₂ del tipo Lys49 (BnSP-6) del veneno de *Bothrops pauloensis* capaz de inhibir la adhesión y migración de células tumorales (Azevedo *et al.*, 2016a), una PLA₂ (Drs-PLA₂) del veneno de *Daboia russellii siamensis* que inhibe la migración celular (Khunsap *et al.*, 2011), una PLA₂ ácida no citotóxica del veneno de *Macrovipera lebetina transmediterranea* (MVL-PLA₂) que ha demostrado inhibir completamente la adhesión y migración de varias líneas celulares tumorales humanas (Bazaa *et al.*, 2009) y del mismo modo, dos PLA₂s no tóxicas purificadas del veneno de *Cerastes cerastes* con efectos sobre la adhesión y migración celular de una línea de fibrosarcoma (HT1080) (Zouari-Kessentini *et al.*, 2009).

En el marco de este plan de trabajo se logró demostrar que la enzima PLA₂ purificada del veneno de *B. diporus*, en concentraciones no citotóxicas, también fue capaz de inhibir tanto la adhesión como la migración de las células tumorales de la línea LM3. Si bien no se determinó el mecanismo por el cual esta enzima inhibe ambos procesos celulares, estudios teóricos de modelado molecular sugieren que estaría mediado por la unión de estas toxinas a las integrinas de tipo $\alpha\beta3$ (Angelina *et al.*, 2019).

Así, de manera similar, Bazaa y colaboradores demostraron que la mencionada MVL-PLA₂ del veneno de *Macrovipera lebentina* es capaz de inhibir tanto la adhesión como de la migración celular bajo un mecanismo dependiente de una actividad del tipo anti-integrina, debido a que, tanto el citoesqueleto de actina como la distribución de las integrinas $\alpha\beta3$ en las células evidenciaron estar alterados (Bazaa *et al.*, 2009).

De forma general, Urrea y Araya-Maturana (2017), mencionan que es posible distinguir tres mecanismos anti-metastásicos exhibidos por al menos seis clases de toxinas ofídicas diferentes: 1) inhibición de los componentes de la matriz extracelular de los que dependen la adhesión y migración, 2) inhibición de la transición epitelial-mesenquimal y 3) inhibición de la migración por alteraciones del citoesqueleto de actina. Futuros estudios permitirán definir el mecanismo por el cual la PLA₂ del veneno de *B. diporus* inhibe la adhesión y migración de células tumorales.

7. CONCLUSIÓN

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) aislada del veneno de *Bothrops diporus* ha demostrado ser citotóxica sobre las células de la línea LM3 de manera dosis dependiente. Además, en concentraciones no citotóxicas, evidenció inhibir la adhesión como la migración de células tumorales *in vitro*. Estos resultados sugieren que estas moléculas pueden ser un nuevo prototipo de agentes anticancerígenos y proporcionar nuevos conocimientos moleculares y biológicos sobre el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Dilucidar el mecanismo por el cual estos procesos se ven afectados abre la posibilidad de continuar sobre esta línea de investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, J.R., Lancellotti, M., Soares, A.M., Calderon, L.A., Ramirez, D., Gonzalez, W., Marangoni, S., Da Silva, S.L., 2016. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus* abyssus snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. *Toxicon* 120, 147-158.
- Andrade Carvalho, A., da Costa, P.M., Da Silva Souza, L.G., Lemos, T.L., Alves, A.P., Pessoa, C., de Moraes, M.O., 2013. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. *Life Sci* 93, 201-207.
- Angelina, E., Bustillo, S., Bogado, L., García Denegri, E., Peruchena, N., Leiva de Vila, L., 2019. Binding of acidic PLA₂ Ba SpII RP4 from *Bothrops alternatus* snake venom to integrin $\alpha\beta$ 3: an in silico study. 20th World Congress of the International Society on Toxinology. Elsevier, Buenos Aires Argentina.
- Azevedo, F.V., Lopes, D.S., Cirilo Gimenes, S.N., Ache, D.C., Vecchi, L., Alves, P.T., Guimaraes Dde, O., Rodrigues, R.S., Goulart, L.R., Rodrigues Vde, M., Yoneyama, K.A., 2016a. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. *Int J Biol Macromol* 82, 671-677.
- Azevedo, F.V., Lopes, D.S., Gimenes, S.N., Ache, D.C., Vecchi, L., Alves, P.T., Guimaraes, D.O., Rodrigues, R.S., Goulart, L.R., Rodrigues, V.M., Yoneyama, K.A., 2016b. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. *Int J Biol Macromol* 82, 671-677.
- 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 : journal of the International Society for Matrix Biology* 28, 188-193.
- Bieber, A.L., 1979. Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. In: Lee, C.-Y. (Ed.), *Snake Venoms*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 295-306.
- Borges, I.P., Castanheira, L.E., Barbosa, B.F., de Souza, D.L., da Silva, R.J., Mineo, J.R., Tudini, K.A., Rodrigues, R.S., Ferro, E.A., de Melo Rodrigues, V., 2016. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. *Toxicon* 119, 84-91.
- Bustillo, S., Fernandez, J., Chaves-Araya, S., Angulo, Y., Leiva, L.C., Lomonte, B., 2019. Isolation of two basic phospholipases A₂ from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants. *Toxicon* 168, 113-121.
- 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.
- Calderon, L.A., Sobrinho, J.C., Zaqueo, K.D., de Moura, A.A., Grabner, A.N., Mazzi, M.V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C.F., Zuliani, J.P., Carvalho, B.M., da Silva, S.L., Stabeli, R.G., Soares, A.M., 2014. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *BioMed research international* 2014, 203639.
- Calvete, J.J., 2011. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics* 8, 739-758.
- Chaisakul, J., Isbister, G.K., Tare, M., Parkington, H.C., Hodgson, W.C., 2014. Hypotensive and vascular relaxant effects of phospholipase A₂ toxins from Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus*) venom. *Eur J Pharmacol* 723, 227-233.
- da Silva, V., Rodrigues, T.M., 2008. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedii* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phyllomedusa* 7, 45-90.
- de Oliveira, V.C., Lanari, L.C., Hajos, S.E., de Roodt, A.R., 2011. Toxicity of *Bothrops neuwiedi* complex ("yarara chica") venom from different regions of Argentina (Serpentes, Viperidae). *Toxicon* 57, 680-685.
- de Titto, E., De Roodt, A., Lanari, L., Casas, N., García, S., Oliveira, V., Damin, C., 2017. Accidentes y muertes por animales venenosos en Argentina durante el período 2000- 2011. <http://www.msal.gov.ar/1>.
- Debeir, O., Adanja, I., Kiss, R., Decaestecker, C., 2008. Models of cancer cell migration and cellular imaging and analysis. Transworld Research Network, Kerala, India.

- Dennis, E.A., 1994. Diversity of groups types, regulation and function of phospholipases A₂. J. Biol. Chem. 269, 13057–13060.
- Dhananjaya, B.L., Sivashankari, P.R., 2015. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. Curr Top Med Chem 15, 649-657.
- Gay, C., Sanz, L., Calvete, J.J., Pla, D., 2015. Snake Venomics and Antivenomics of *Bothrops diporus*, a Medically Important Pitviper in Northeastern Argentina. Toxins 8.
- Guimaraes, D.O., Lopes, D.S., Azevedo, F.V., Gimenes, S.N., Silva, M.A., Ache, D.C., Gomes, M.S., Vecchi, L., Goulart, L.R., Yoneyama, K.A., Rodrigues, R.S., Rodrigues, V.M., 2017. In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. Int J Biol Macromol 97, 770-777.
- Gutiérrez, J.M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. Toxicon 26, 411-413.
- Gutierrez, 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., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 33, 1405-1424.
- INC, I.N.d.C., 2019.
- Ishikane, S., Takahashi-Yanaga, F., 2018. The role of angiotensin II in cancer metastasis: Potential of renin-angiotensin system blockade as a treatment for cancer metastasis. Biochem Pharmacol 151, 96-103.
- Khalili, A.A., Ahmad, M.R., 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. International journal of molecular sciences 16, 18149-18184.
- Khunsap, S., Pakmanee, N., Khaw, O., Chanhom, L., Sitprijia, V., Suntravat, M., Lucena, S.E., Perez, J.C., Sanchez, E.E., 2011. Purification of a phospholipase A₂ from *Daboia russelii siamensis* venom with anticancer effects. Journal of venom research 2, 42-51.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lee, S.J., Sakurai, H., Oshima, K., Kim, S.H., Saiki, I., 2003. Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of a new matrix metalloproteinase inhibitor, TN-6b. Eur J Cancer 39, 1632-1641.
- Luo, B.H., Carman, C.V., Springer, T.A., 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. Annu Rev Immunol 25, 619-647.
- Matzner Perfumo, V., Fusco, L., Leiva de Vila, L., Bustillo, S., 2016. Potential antitumor activity of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops diporus* venom. Biocell 40, 30.
- Matzner Perfumo, V., Pibernus, D., Cano, G., Nuñez, S., Leiva de Vila, L., Bustillo, S., 2014. Isolation and cytotoxic activity of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops diporus* venom. Biocell 39, 20.
- Paludo, K.S., Gremski, L.H., Veiga, S.S., Chaim, O.M., Gremski, W., de Freitas Buchi, D., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Franco, C.R., 2006. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. Toxicon 47, 844-853.
- Pereanez, J.A., Nunez, V., Huancahuire-Vega, S., Marangoni, S., Ponce-Soto, L.A., 2009. Biochemical and biological characterization of a PLA₂ from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. Toxicon 53, 534-542.
- Prinholato da Silva, C., Costa, T.R., Paiva, R.M., Cintra, A.C., Menaldo, D.L., Antunes, L.M., Sampaio, S.V., 2015. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases 21, 44.
- Roberto, P.G., Kashima, S., Marcussi, S., Pereira, J.O., Astolfi-Filho, S., Nomizo, A., Giglio, J.R., Fontes, M.R., Soares, A.M., Franca, 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.
- Santos-Filho, N.A., Silveira, L.B., Oliveira, C.Z., Bernardes, C.P., Menaldo, D.L., Fuly, A.L., Arantes, E.C., Sampaio, S.V., Mamede, C.C., Beletti, M.E., de Oliveira, F., Soares, A.M., 2008. A new acidic myotoxic,

anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 52, 908-917.

- Scrocchi, G.J. (Ed), 2006. Serpientes del Noroeste Argentino. Fundación Mario Lillo, Tucumán, Argentina.
- Urra, F.A., Araya-Maturana, R., 2017. Targeting Metastasis with Snake Toxins: Molecular Mechanisms. *Toxins* 9.
- Urtreger, A.J., Diament, M.J., Ranuncolo, S.M., Del, C.V.M., Puricelli, L.I., Klein, S.M., De Kier Joffe, E.D., 2001. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. *Int J Oncol* 18, 639-647.
- Vyas, V.K., Brahmbhatt, K., Bhatt, H., Parmar, U., 2013. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 3, 156-162.
- WHO, 2018. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer.
- 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, 444-453.