

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ANÁLISIS PRELIMINAR DE LOS COMPONENTES PROTEICOS DEL VENENO
DEL PEZ LEÓN *Pterois volitans* DE LA COSTA DE SANTA MARTA Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIÓLOGICA**

ÁNGEL ANANDA PÉREZ BRAVO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2018

**ANÁLISIS PRELIMINAR DE LOS COMPONENTES PROTEICOS DEL VENENO
DEL PEZ LEÓN *Pterois volitans* DE LA COSTA DE SANTA MARTA Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

ÁNGEL ANANDA PÉREZ BRAVO

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Bioquímica

Directora:

Nohora Angélica Vega Castro Dr. Sci.

Codirectora:

Mónica Puyana Hegedus Ph.D.

Línea de Investigación:

Diseño y síntesis de péptidos con actividad biológica

Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2018

*La vida es solo un vistazo momentáneo
de las maravillas de este asombroso universo...*

Carl Sagan.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de química, por la oportunidad de pertenecer al programa de Maestría en Ciencias-Bioquímica.

A mi directora de tesis la Dra. Nohora Angélica Vega Castro, por su orientación, colaboración, seguimiento y confianza en el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de investigación en proteínas, GRIP, de la Universidad Nacional de Colombia, al Dr. Edgar Reyes por su apoyo, colaboración y orientación en el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros en el grupo de investigación: Andrea Rincón, Nury Vargas, Zulma Casas, Nury Carreño, Tania Cortázar, Jessica Espinosa, Ariadna Rodríguez, Daniel Romero, Roberto García y compañeros de otros laboratorios en el Departamento de Química.

Al Dr. Adolfo Sanjuan Muñoz y la Dra. Mónica Puyana Hegedus del departamento de biología marina de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, sede El Rodadero, Santa Marta, por su asesoría, colaboración en la identificación de los especímenes y uso de los laboratorios.

Al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos: Dr. Gerardo Corzo por su aceptación, apoyo, colaboración y enseñanzas durante la pasantía y a su equipo por su acogida en el grupo, ayuda y asesoría:

Francia García, Herlinda Clement, Damaris Guadarrama, Félix Santana, Iván Arenas, Jesús Borrego, Raúl Sánchez, German Aguilar y Melisa Bernard.

A mis padres Mónica Bravo y José Pérez por sus consejos, paciencia y apoyo incondicional y a mi hermana Jahanavy Pérez por su apoyo y colaboración.

A mi esposa Jessica Espinosa por su apoyo incondicional, por impulsarme cada día a continuar, porque aquí también se encuentra gran parte de ella, por hacerme feliz...

A mis suegros Ana Velandia y Armando Espinosa y a mi cuñado Oscar Espinosa por todo el ánimo y compañía para seguir adelante.

A mis amigos Carolina Cortés, mis "sobrinitos" Esteban y Pipe, a Oscar Cadena, Laura Ripe, Erika Díaz, Camilo Mejía y Christian Sánchez.

Resumen

Los venenos de origen marino han sido poco estudiados debido a la complejidad de obtención de los individuos, extracción del veneno y al reducido contacto que tienen los humanos con estos organismos en comparación con animales venenosos terrestres. Dentro de los pocos estudios realizados en la caracterización del veneno en peces, se encuentra el pez león *Pterois volitans*, que se ha convertido en una especie invasora del Océano Atlántico, afectando la ecología de arrecifes, la pesca comercial, aumentando el contacto con seres humanos y por ello, los reportes de envenenamiento. La costa atlántica colombiana presenta esta problemática y, por lo tanto, el estudio bioquímico de los componentes del veneno de *P. volitans* como posible fuente de agentes terapéuticos favorecería el control de la invasión, además de ser usado como alimento. Por medio de técnicas bioquímicas de extracción y purificación del veneno de *P. volitans*, se determinó que posee compuestos proteicos en un amplio rango de masa molecular (8 a 175 kDa), actividad hemolítica contra eritrocitos de conejo, y actividad de hialuronidasa con una masa molecular de 75 kDa.

El extracto de veneno (EV) es citotóxico en cultivo primario de neuronas hipocampales (59 %), en la línea celular de cáncer de mama HBT-26 (52 %), en trofoblastos de placenta HTR8 (50 %) y carcinoma de cérvix HeLa (26 %). Sin embargo, la línea celular PC3 de cáncer de próstata no es afectada por el veneno.

Por otro lado, el EV no posee actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, ni insecticida en grillos de la especie *Acheta domesticus*, sin embargo, la actividad letal y tóxica en peces de la especie *Danio rerio* se encuentra presente en el extracto de veneno EV y en las fracciones purificadas por HPLC. Los estudios

de actividad enzimática permitieron detectar por primera vez la presencia de actividad fosfolipasa C y aglutinación a eritrocitos de conejo. Por lo tanto, el presente trabajo amplía el conocimiento actual del veneno de *P. volitans* y contribuye a la bioprospección de venenos marinos con compuestos proteicos que pueden ser usados como técnicas profilácticas en la medicina moderna.

Palabras clave: *Pterois volitans*, veneno, toxinas, proteasas, hialuronidasas, lectina, fosfolipasa C, líneas celulares cancerosas, citotoxicidad

Abstract

Marine venoms are poorly studied mainly because of the complexity for obtaining specimens and for venom extraction. Also, because of the few human casualties with venomous marine animals than that with terrestrial animals it makes even less interesting the scientific research in this field. Nevertheless, few studies concerning the characterization of the venom from the lionfish (*Pterois volitans*) were found. It is considered an invasive species of the Atlantic Ocean that affects the reefs ecology, commercial fishing, and contribute to human accidents. These aspects are a concern of the Colombian Atlantic Coast policies. As a result, it has been proposed fishing policies for using *P. volitans* as a source of food to control its Colombian coast dissemination, and also as a subject of biochemical studies to study its venom as a source of therapeutic agents. From the scientific point of view, *P. volitans* venom contains protein compounds with molecular masses from 8 to 175 kDa. Also, the venom has hemolytic activity and contains hyaluronidases with molecular masses around 75 kDa, which is quite active against rabbit erythrocytes. Also, the venom is cytotoxic to primary culture of hippocampal neurons (59%), breast cancer cell line HBT-26 (52%), placental trophoblast cell line HTR-8 (50%) and cervix carcinoma cell line HeLa (26%). However, the PC3 cell line of prostate cancer was not affected with this venom.

On the other hand, the EV does not possess antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* neither insecticidal activity to the house cricket *Acheta domesticus*. In contrast, it was lethal and toxic to fishes of the species *Danio rerio*. Furthermore, the venom showed phospholipase C and agglutination activity towards rabbit erythrocytes. So, the present work expands the current knowledge

of the *P. volitans* venom, and contributes to the bioprospecting of marine venoms with protein compounds that can be used as prophylactic techniques in modern medicine.

Keywords: *Pterois volitans*, venom, toxins, proteases, hyaluronidases, lectin, phospholipase C, cancer cell lines, cytotoxicity

Contenido

RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE DIAGRAMAS	XVIII
LISTA DE TABLAS	XIX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XX
INTRODUCCIÓN	1
1. PECES VENENOSOS DE ORIGEN MARINO	5
1.1. GENERALIDADES DE <i>PTEROIS VOLITANS</i>	7
1.2. OBJETIVOS	9
1.2.1. OBJETIVO GENERAL	9
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DEL VENENO DE <i>PTEROIS VOLITANS</i>	11
2.1. EL PEZ LEÓN, <i>PTEROIS VOLITANS</i>	11
2.2. DESARROLLO METODOLÓGICO	12
2.2.1. RECOLECCIÓN DE INDIVIDUOS <i>PTEROIS VOLITANS</i>	12
2.2.2. EXTRACCIÓN DEL APARATO VENENOSO	13
2.2.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DEL VENENO	14
2.2.3.1. METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN SEGÚN MICHAEL CHOROMANSKI	15
2.2.3.2. METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN SEGÚN CHURCH & HODGSON	16
2.2.3.3. METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN CON GLICEROL 10 % Y COCTEL DE INHIBIDORES PARA PROTEASAS (CIP)	17
2.2.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE VENENO (EV)	18
2.2.5. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS CRUDOS DE VENENO	18
2.2.5.1. CROMATOGRAFÍA HPLC-RP C18	18
2.2.5.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE	18
2.2.5.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	18
2.3. RESULTADOS	19

2.3.1.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE VENENO Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	20
2.3.2.	IDENTIFICACIÓN DE PERFIL DE PROTEÍNAS POR HPLC-RP C18	20
2.3.3.	SDS PAGE 1D Y 2D PARA LOS EV	22
2.4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	25

3. PURIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL VENENO DE *P. VOLITANS* **30**

3.1.	CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DEL VENENO DE <i>PTEROIS VOLITANS</i> EN DIFERENTES MODELOS	30
3.2.	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE <i>PTEROIS VOLITANS</i>	32
3.3.	DESARROLLO METODOLÓGICO	37
3.3.1.	PURIFICACIÓN DEL EV POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	37
3.3.1.1.	<i>CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR HPLC Y EN COLUMNA ABIERTA</i>	37
3.3.1.2.	<i>HPLC DE INTERCAMBIO ANIÓNICO</i>	38
3.3.1.3.	<i>HPLC-RP C4</i>	38
3.3.2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL VENENO Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS	39
3.3.2.1.	<i>ACTIVIDAD HEMOLÍTICA</i>	39
3.3.2.2.	<i>ACTIVIDAD AGLUTINANTE</i>	40
3.3.2.3.	<i>ACTIVIDAD FOSFOLIPASA</i>	40
3.3.2.4.	<i>ACTIVIDAD DE PROTEASAS</i>	41
3.3.2.5.	<i>ACTIVIDAD DE HIALURONIDASA</i>	41
3.3.2.6.	<i>ACTIVIDAD DE EV Y FRACCIONES PURIFICADAS IN VITRO E IN VIVO</i>	42
3.3.2.6.1.	<i>CITOTOXICIDAD</i>	42
3.3.2.6.2.	<i>ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	44
3.3.2.6.3.	<i>ACTIVIDAD INSECTICIDA EN GRILLOS DE LA ESPECIE ACHETA DOMESTICUS</i>	44
3.3.2.6.4.	<i>ACTIVIDAD TÓXICA EN RATAS WISTAR</i>	44
3.3.2.6.5.	<i>ACTIVIDAD TÓXICA EN PECES CEBRA, DANIO RERIO</i>	45
3.4.	RESULTADOS.	45
3.4.1.	PURIFICACIÓN DEL VENENO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	45
3.4.1.1.	<i>CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN EN COLUMNA ABIERTA</i>	45
3.4.1.2.	<i>CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN HPLC</i>	47
3.4.1.3.	<i>HPLC-RP C4</i>	49
3.4.2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EV Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS	52
3.4.2.1.	<i>ACTIVIDAD HEMOLÍTICA</i>	52
3.4.2.2.	<i>ACTIVIDAD AGLUTINANTE</i>	53
3.4.2.3.	<i>ACTIVIDAD FOSFOLIPASA</i>	55
3.4.2.4.	<i>ACTIVIDAD DE PROTEASAS GELATINOLÍTICAS</i>	56
3.4.2.5.	<i>ACTIVIDAD DE HIALURONIDASA</i>	60
3.4.2.6.	<i>ACTIVIDAD DE EV Y FRACCIONES PURIFICADAS IN VITRO E IN VIVO</i>	61
3.4.2.6.1.	<i>CITOTOXICIDAD</i>	61
3.4.2.6.2.	<i>ANTIMICROBIANO EN STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	66
3.4.2.6.3.	<i>ACTIVIDAD INSECTICIDA EN ACHETA DOMESTICUS</i>	67
3.4.2.6.4.	<i>MAMÍFEROS, RATAS WISTAR</i>	67
3.4.2.6.5.	<i>PECES DANIO RERIO</i>	68
3.5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	69

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES **82**

4.1.	CONCLUSIONES	82
4.2.	RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFÍA		85
<hr/>		
A.	ANEXO: DATOS DE CUANTIFICACIÓN EXTRACTOS DE VENENO	97
<hr/>		
B.	ANEXO: CROMATOGRAMAS INDIVIDUALES DE CADA UNO DE LOS EXTRACTOS DE VENENO OBTENIDOS	99
<hr/>		
C.	ANEXO: CROMATOGRAMA DE MICHAEL CHOROMANSKI	106
<hr/>		
D.	ANEXO: CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR HPLC	108
<hr/>		
E.	ANEXO: CALIBRACIÓN DE COLUMNA ABIERTA DE EXCLUSIÓN SEPHADEX G-75	109
<hr/>		
F.	ANEXO: CROMATOGRAFÍA INTERCAMBIO ANIÓNICO	110
<hr/>		
G.	ANEXO: INHIBIDOR DE PROTEASAS SIGMA®	111
<hr/>		
H.	ANEXO: INHIBIDOR DE PROTEASAS COMPLETE, EDTA-FREE®	112
<hr/>		
I.	ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
<hr/>		
J.	ANEXO: SPOTS DETERMINADOS EN ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DEL EV	120

Lista de figuras

FIGURA 1-1: REPORTES DE AVISTAMIENTOS DE <i>P. VOLITANS</i> EN EL OCÉANO ATLÁNTICO.....	8
FIGURA 2-1: CARACTERIZACIÓN DEL APARATO VENENOSO DE <i>P. VOLITANS</i>	12
FIGURA 2-2: MAPA DE LA LOCALIZACIÓN DE TAGANGA Y EL RODADERO EN SANTA MARTA, COLOMBIA.....	13
FIGURA 2-3: EJEMPLAR DE <i>P. VOLITANS</i> Y APARATO VENENOSO EXTRAÍDO.....	14
FIGURA 2-4: EXTRACCIÓN DEL VENENO DE LAS ESPINAS DEL PEZ LEÓN.....	15
FIGURA 2-5: MULTICROMATOGRAMA HPLC-RP C ₁₈ DE CADA UNO DE LOS EXTRACTOS DEL VENENO DEL PEZ LEÓN.....	21
FIGURA 2-6: SDS-PAGE EXTRACTOS DE VENENO DIALIZADOS DE <i>P. VOLITANS</i>	22
FIGURA 2-7: SDS-PAGE-TRICINA DE LOS EXTRACTOS DIALIZADOS DE <i>P. VOLITANS</i>	24
FIGURA 2-8: ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE EV DE <i>P. VOLITANS</i>	24
FIGURA 3-1: ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA STONUSTOXINA.....	33
FIGURA 3-2: MODELAMIENTO MOLECULAR DE LA NATTECTINA.....	36
FIGURA 3-3: CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN CON SEPHADEX® G-75.....	46
FIGURA 3-4: SDS-PAGE SCHÄGGER DE LAS FRACCIONES DE EXCLUSIÓN MOLECULAR POR COLUMNA ABIERTA.....	47
FIGURA 3-5: CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR HPLC DEL SOB EVT DE <i>P. VOLITANS</i>	48
FIGURA 3-6: CROMATOGRAMA DE HPLC-RP C ₄ DE LA REPURIFICACIÓN DE FRACCIONES SOB EVT OBTENIDAS POR EXCLUSIÓN MOLECULAR HPLC.....	49
FIGURA 3-7: PERFIL CROMATOGRÁFICO DE SOB EVT POR HPLC-RP C ₄	50
FIGURA 3-8: SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DE SOB EVT DEL VENENO DE <i>P. VOLITANS</i> POR HPLC-RP C ₄	51
FIGURA 3-9: ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO FRENTE A ERITROCITOS DE CONEJO Y HUMANO TIPO A+.....	52
FIGURA 3-10: ERITROAGLUTINACIÓN DE LA FRACCIÓN 3 RESULTANTE DE LA SEPARACIÓN DEL VENENO POR EXCLUSIÓN MOLECULAR EN COLUMNA ABIERTA.....	53
FIGURA 3-11: CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE MANOSA-AGAROSA CON EV DE <i>P. VOLITANS</i>	54
FIGURA 3-12: CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE SEPHAROSE-4B MAN.....	55
FIGURA 3-13: ENSAYO ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA DE FRACCIONES OBTENIDAS POR HPLC-RP C ₄	56
FIGURA 3-14: ZIMOGRAMA DE PROTEASAS GELATINOLÍTICAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR HPLC-RP C ₄	57
FIGURA 3-15: CROMATOGRAFÍA DE F7 DE <i>P. VOLITANS</i> POR INTERCAMBIO ANIÓNICO DEAE HPLC.....	58
FIGURA 3-16: CROMATOGRAMA DE HPLC-RP C ₄ DE LA REPURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES DE F7 OBTENIDAS POR INTERCAMBIO ANIÓNICO HPLC.....	59
FIGURA 3-17: ZIMOGRAMA DE HIALURONIDASA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR HPLC-RP C ₄	60
FIGURA 3-18: PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE CÉLULAS HTR8 TRATADAS CON EV OBTENIDO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	62
FIGURA 3-19: PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS HeLa TRATADAS CON EV.....	63
FIGURA 3-20: PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS HT-29 TRATADAS CON EV.....	64
FIGURA 3-21: PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS HBT26 TRATADAS CON EV.....	64
FIGURA 3-22: PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS PC3 TRATADAS CON VENENO DE <i>P. VOLITANS</i>	65
FIGURA 3-23: PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS HIPOCAMPALES DE RATA TRATADAS CON EV...65	65
FIGURA 3-24: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EV Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS FRENTE A <i>S. AUREUS</i>	66
FIGURA B-1: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL EXTRACTO DE VENENO REALIZADO CON PBS 1X CIP.....	99

FIGURA B-2: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL BLANCO DE PBS 1X CIP.....	100
FIGURA B-3: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL EXTRACTO DE VENENO REALIZADO CON PBS 1X SIGMA®	100
FIGURA B-4: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL BLANCO PBS 1X SIGMA®	101
FIGURA B-5: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL EXTRACTO DE VENENO REALIZADO CON PBS 1X COMPLETE®	101
FIGURA B-6: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL BLANCO DE PBS 1X COMPLETE®	102
FIGURA B-7: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL EXTRACTO DE VENENO REALIZADO CON GLICEROL 10 %	102
FIGURA B-8: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL BLANCO GLICEROL 10 %	103
FIGURA B-9: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL EXTRACTO DE VENENO REALIZADO CON GLICEROL 10 % CIP	103
FIGURA B-10: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL BLANCO GLICEROL 10 % CIP	104
FIGURA B-11: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL EXTRACTO DE VENENO REALIZADO CON GLICEROL 10% SIGMA®	104
FIGURA B-12: CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DEL BLANCO GLICEROL 10% SIGMA®	105
FIGURA C-1: CROMATOGRAFÍA DE HPLC-RP C18 DEL VENENO DE <i>P. VOLITANS</i> EXTRAÍDA CON PBS 1X Y COCTEL DE INHIBIDORES POR CHOROMANSKI (82).	106
FIGURA C-2: SDS-PAGE EXTRACTO DE VENENO DE CHOROMANSKI 1985	107
FIGURA D-1: CALIBRACIÓN CON PATRONES MOLECULARES DE LA COLUMNA DE EXCLUSIÓN HPLC.....	108
FIGURA E-1: CALIBRACIÓN CON PATRONES MOLECULARES DE LA COLUMNA ABIERTA DE EXCLUSIÓN SEPHADEX G-75.....	109
FIGURA F-1: CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO DE SOB EVT DE <i>P. VOLITANS</i>	110
FIGURA J-1: ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EV DE <i>P. VOLITANS</i> SSP	120
FIGURA J-2: PESOS MOLECULARES Y PI DE SPOTS IDENTIFICADOS EN ELECTROFORESIS 2D	121

Lista de diagramas

DIAGRAMA 2-1: EXTRACCIÓN DEL VENENO DE P. VOLITANS SEGÚN LA METODOLOGÍA DESCRITA POR CHOROMANSKI (82).	16
DIAGRAMA 2-2: EXTRACCIÓN DEL VENENO DE P. VOLITANS SEGÚN CHURCH (83).	17
DIAGRAMA 2-3: EXTRACCIÓN DEL VENENO DE P. VOLITANS CON GLICEROL 10 % Y COCTEL INHIBIDOR DE PROTEASAS.....	17

Lista de tablas

TABLA 1-1: TOXINAS PROTEICAS IDENTIFICADAS EN EL VENENO DE PECES ACANTÓXICOS HASTA LA FECHA*	6
TABLA 2-1: CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS EV	20
TABLA 2-2: TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LAS SEÑALES OBTENIDAS PARA LOS EV DE <i>P. VOLITANS</i>	22
TABLA 2-3: RESUMEN PESOS MOLECULARES OBSERVADOS EN SDS-PAGE	23
TABLA 2-4: PESOS MOLECULARES OBSERVADOS EN SDS-PAGE-TRICINA	23
TABLA 3-1: EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL VENENO DE <i>P. VOLITANS</i> EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES	31
TABLA 3-2: COMPUESTOS PRESENTES EN EL VENENO DE <i>P. VOLITANS</i>	34
TABLA 3-3: LECTINAS PRESENTES EN EL VENENO DE PECES ACANTÓXICOS	35
TABLA 3-4: PROTEÍNA OBTENIDA DE LAS FRACCIONES DE EXCLUSIÓN POR SEPHADEX G-75 EN COLUMNA ABIERTA Y PESOS MOLECULARES DE SUS COMPONENTES PROTEICOS	46
TABLA 3-5: PROTEÍNA TOTAL DE FRACCIONES OBTENIDAS POR EXCLUSIÓN HPLC	48
TABLA 3-6: TIEMPOS DE RETENCIÓN Y μg DE PROTEÍNA DE LAS SEÑALES OBTENIDAS DE LAS FRACCIONES PROVENIENTES DE SOB EVT DEL VENENO DE <i>P. VOLITANS</i>	50
TABLA 3-7: ENSAYO DE AGLUTINACIÓN CON ERITROCITOS DE CONEJO 2 %	53
TABLA 3-8: MASA MOLECULAR DE LAS PROTEASAS DE LAS FRACCIONES DE SOB EVT PURIFICADAS POR HPLC-RP C4	57
TABLA 3-9: PROTEÍNA TOTAL DE LAS FRACCIONES REPURIFICADAS POR HPLC-RP C4 DE FNRI Y FNRII	60
TABLA 3-10: CANTIDAD DE PROTEÍNA INYECTADA A LOS GRILLOS <i>A. DOMESTICUS</i>	67
TABLA 3-11: TOXICIDAD DEL VENENO DE <i>P. VOLITANS</i> , Y SUS FRACCIONES DE HPLC-RP C4 EN RATAS WISTAR	68
TABLA 3-12: TOXICIDAD DEL EV Y SUS FRACCIONES EN PECES <i>DANIO RERIO</i>	68
TABLA A-1: CURVA DE CALIBRACIÓN DE DILUCIONES DOBLES SERIADAS DE BSA	97
TABLA I-1: ANOVA DE DOS VÍAS HTR8	113
TABLA I-2: ESTADÍSTICA HTR8, TEST DE DUNNET MÚLTIPLES COMPARACIONES TRATAMIENTOS VS. CONTROLES	113
TABLA I-3: ESTADÍSTICA HTR8, TEST DE TUKEY MÚLTIPLES COMPARACIONES TRATAMIENTOS VS. TRATAMIENTOS	114
TABLA I-4: ANOVA DE UNA VÍA LÍNEA HELA	115
TABLA I-5: ESTADÍSTICA HELA, TEST DE DUNNET MÚLTIPLES COMPARACIONES CONTROL VS. TRATAMIENTOS	115
TABLA I-6: ANOVA DE UNA VÍA LÍNEA HT-29	116
TABLA I-7: ESTADÍSTICA HT-29, TEST DE DUNNET MÚLTIPLES COMPARACIONES CONTROL VS. TRATAMIENTOS	116
TABLA I-8: ANOVA DE UNA VÍA NEURONAS HIPOCAMPALES RATAS WISTAR	116
TABLA I-9: ESTADÍSTICA NEURONAS HIPOCAMPALES, TEST DE DUNNET MÚLTIPLES COMPARACIONES CONTROL VS. TRATAMIENTOS	117
TABLA I-10: ANOVA DE UNA VÍA HTB-26	117
TABLA I-11: ESTADÍSTICA HTB-26, TEST DE DUNNET MÚLTIPLES COMPARACIONES CONTROL VS. TRATAMIENTOS	118
TABLA I-12: ANOVA DE UNA VÍA PC3	118
TABLA I-13: ESTADÍSTICA PC3, TEST DE DUNNET MÚLTIPLES COMPARACIONES CONTROL VS. TRATAMIENTOS	119

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
°C	Temperatura	°C	$^{\circ}C = ^{\circ}K - 273$
Da	Masa	Da	$1,66 \times 10^{-27} \text{ Kg}$
M	Concentración	mM	10^{-3}
M	Longitud	cm	10^{-2}
Mg	Masa	mg	10^{-3}
Min	Tiempo	min	60min = 1Hora
mL	Volumen	mL	10^{-3}
Nm	Longitud	nm	10^{-9}
pH	Ácido-base	pH	$pH = -\log[H]$
pI	Ácido-base	pI	$pI = pKa + pKb / 2$
Psi	Presión	psi	1Atmosfera = 14,7psi
UV	Radiación Ultravioleta	UV	4×10^{-7} a $1,5 \times 10^{-8} \text{m}$
v/v	Volumen	mL	mL/mL

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
M	Masa	μg	10^{-6}
M	Volumen	μL	10^{-6}

Abreviaturas

Abreviatura	Término
%C	Concentración del reticulador Bisacrilamida
%T	Concentración total de monómeros de acrilamida y bisacrilamida
aa	Aminoácidos
ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CIP	Coctel Inhibidor de proteasas (EGTA 2 mM-inhibidor de metaloproteasas, leupeptina 10 µg/mL-inhibidor de cisteína, serina y treonina proteasas) y PMSF 1 mM (inhibidor de serina proteasas)
C-Terminal	Carboxilo- Terminal
DEAE	Dietilaminoetil
DIV	Día <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
EGTA	ácido etilenglicol
EV	Extracto crudo de veneno en Glicerol 10 % (Church 2002)
FI	Fracción I
FII	Fracción II
FIII	Fracción III
FIV	Fracción IV
FNR	Fracción no retenida
FR	Fracción retenida
FV	Fracción V
FVI	Fracción VI
HA	Ácido hialurónico

Abreviatura	Término
HAasa	Hialuronidasa
HPLC-RP	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
LD50	Dosis letal media
Man	Manosa
MTT	Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico (Sal de tetrazolio)
neoVTX	Neoverrucotoxina
NL	No Lineal
NSF-1	Neural Survival Factor-1
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PLA2	Fosfolipasas de tipo A2
PLB	Fosfolipasas de tipo B
PLC	Fosfolipasas de tipo C
PM	Peso molecular (masa molecular)
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNGM	Medio Neurobasal primario
P1	Precipitado (disuelto en PBS 1X pH 7.4) resultado de la diálisis, liofilización del EV y reconstitución en 50:50 de 0,1 % TFA; ACN-TFA 0,1 %, luego de ser centrifugado a 13,000 rpm durante 5 min
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SAFV	Suero anti-veneno pez
SA-HT	toxina proteínica hemorrágica <i>Scatophagus argus</i>
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SNTX	Stonustoxina
SP-CL 1-5	1 – 5 Isoformas de letinas tipo-C de <i>Scorpaena plumieri</i>
Sp—CTx	Citolicina de <i>Scorpaena plumieri</i>
Sp-GP	<i>Scorpaena plumieri</i> proteasa gelatinolítica

Abreviatura	Término
SobEVT	Sobrenadante resultado de la diálisis, liofilización del EV y reconstitución en 50:50 de 0,1 % TFA; ACN-TFA 0,1 %, luego de ser centrifugado a 13,000 rpm durante 5 min
TFA	Ácido Trifluoroacético
TLY	Traquinilisina
TmC4-47.2	Miotoxina <i>de Thalassophryne maculosa</i>
tR	Tiempo de retención HPLC
UA	Unidades de Absorbancia
USGS	Servicio Geológico de los Estados Unidos
VTX	Verrucotoxina

Introducción

Los venenos y secreciones de algunos organismos poco complejos como bacterias y hongos, hasta formas de vida mucho más diversas como serpientes, escorpiones y peces, entre otros, contienen sales, neurotransmisores, aminoácidos, enzimas, proteínas y péptidos bioactivos generalmente tóxicos, que les sirven para adaptarse a entornos específicos y para garantizar su supervivencia, así como medio de defensa de depredadores, inmovilización y hasta para la digestión de la presa (1,2).

El estudio de los venenos, inicialmente se realiza con el fin de identificar tratamientos contra los efectos nocivos en seres humanos, sin embargo, al estudiar las propiedades bioquímicas de las toxinas que lo componen, también se han reconocido como fuentes potenciales de compuestos con actividad farmacológica, y por esa razón son moléculas promisorias para el estudio de diferentes patologías y en el control de enfermedades (3,4).

La investigación en venenos se ha enfocado principalmente en el estudio de animales terrestres, tanto por la facilidad de recolección de individuos, como en la obtención de sus venenos. Además, son los causantes del mayor número de casos de envenenamiento a seres humanos; el contacto con estos animales es más frecuente en comparación con los de origen marino. A pesar de que hay más de 2000 especies de peces que se presumen venenosas constituyendo más del 50 % de los vertebrados venenosos (5,6), los estudios relacionados con la composición del veneno son reducidos debido a la dificultad de colección de especímenes y la inestabilidad de los componentes del veneno cuando es sometido a liofilización,

cambios de pH, temperatura, almacenamiento y repetidos ciclos de congelación-descongelación, además, de la contaminación con componentes de material biológico externo (“moco”) que recubren las espinas, dificultan su estudio (4,6,7).

Hay poca literatura relacionada con el estudio de veneno en peces, esto lo demuestra el bajo número de especies estudiadas, p.ej. *Arius thalassinus* (8), *Trachinus draco* (9), *Scatophagus argus* (10), *Scorpaena guttata* (11), *Scorpaena plumieri* (12,13), *Gymnapistes marmoratus* (14), *Synanceia horrida* (15,16), *Pterois lunulata* (17), *Dendrochirus zebra* (18), *Hypodytes rubripinnis* (19,20), *Notesthes robusta* (21), *Inimicus japonicus* (17), *Thalassophryne maculosa* (22), *Thalassophryne nattereri* (23), *Potamotrygon falkneri* (24), *Synanceia verrucosa* (25), entre otros, pero al igual que sus contrapartes terrestres, los estudios de venómica han permitido direccionar los efectos a nivel cardiovascular, neuromuscular, de aglutinación, antibacteriano, inflamatorio, hemolítico, enzimáticos y citotóxicos, hacia el descubrimiento de compuestos totalmente naturales orientados a la producción de medicinas (3,26).

En el caso de los peces pertenecientes a la familia Scorpaenidae, se han identificado componentes en el veneno como la stonustoxina (SNTX), verrucotoxina (VTX), y Sp-CTx, (aislados de *S. horrida*, *S. verrucosa* y *S. plumieri* respectivamente) que tienen efecto citotóxico, cardiovascular y afectan el sistema nervioso central (6,13,16,25). En esta familia se encuentra el pez león, *P. volitans*, el cual es endémico del Océano Indo-pacífico (27,28) y se ha convertido en una amenaza en el Océano Atlántico puesto que ha llegado a invadir las costas de Estados Unidos, México, Colombia y Panamá entre otros, disminuyendo la población de peces jóvenes comercial y ecológicamente importantes como el pez barbero, el camarón, pez loro, cangrejo, pez serránido y el pez pargo (29).

Además del impacto ecosistémico por la presencia del *P. volitans* en el Caribe colombiano, en la actualidad no se ha identificado un depredador natural (30), el contacto de esta especie con seres humanos también se hace peligrosa, aunque

no mortal; la picadura generalmente ocurre en buzos que se cruzan con el pez y llegan a tocarlo; sus espinas venenosas rompen el tejido, y debido a la presión que se produce al contacto, la cubierta tegumentaria de la espina se rompe para liberar el veneno que se encuentra almacenado en las vesículas tipo apocrinas, produciendo un dolor extremo, náuseas, mareos, debilidad muscular y efectos cardiovasculares como hipertensión, cefalea y en casos extremos se llega a presentar necrosis (31). El veneno ha sido poco estudiado y no se han identificado completamente las toxinas que lo componen, pero se ha observado que presenta las mismas características toxicológicas de los peces de la familia *Scorpaenidae* en diferentes modelos animales y, por lo tanto, pueden identificarse compuestos proteicos de gran importancia biológica (6).

Dado que los estudios referentes a la identificación de los componentes activos en el veneno son escasos, es necesario realizar la caracterización de nuevos compuestos con actividad citotóxica hacia células cancerígenas, o la detección de nuevas lectinas; que en el veneno de esta especie no se ha reportado.

Las lectinas pueden ser aisladas de todos los organismos, desde virus hasta seres humanos, aunque, las más estudiadas han sido en plantas superiores. También se han hecho estudios en organismos marinos como algas, esponjas moluscos, equinodermos (pepinos de mar) y peces como *Epinephelus coioides*, *Lampetra japónica* y *Rachycentron canadum* (32). Su amplia distribución en los diferentes grupos de organismos habla de su importancia en procesos biológicos como las interacciones célula-célula, hospedero-patógeno, planta-simbionte, entre otras. En este trabajo de investigación se hicieron ensayos enfocados a obtener el extracto de veneno activo, se estudiaron sus componentes proteicos y se realizó la evaluación de su actividad biológica.

1. PECES VENENOSOS DE ORIGEN MARINO

Los seres humanos siempre se han beneficiado de los océanos aprovechando todos los recursos que este ofrece, principalmente, como fuente de alimento. El pescado es uno de los productos alimenticios más comercializados a nivel mundial, que también se destina a la producción de agentes industriales, agrícolas y farmacéuticos (33), este último se ha impuesto en la investigación con peces tóxicos y venenosos que constituyen 1200 especies y forman dos tercios de la población de vertebrados con esta característica. En los peces, su veneno es de tipo defensivo pues usualmente son organismos sedentarios, sus movimientos son lentos y viven en aguas poco profundas (34,35).

Los peces *tóxicos* se caracterizan por presentar algunas sustancias en su cuerpo que afectan la salud humana al ser ingeridos. Estos peces pueden ser ictiosarcotóxicos, ya que tienen veneno en músculo, piel, vísceras o “moco” que los recubre; por ejemplo, se encuentran toxinas como la carchatoxina en tiburones, la ciguatoxina presente en tejidos ictícos de variedad de peces, la clupeotoxina y la tetrodotoxina; esta última es una de las toxinas marinas más potentes y que usualmente la poseen peces del orden de los Tetraodontiformes (36–39); también se puede presentar veneno en las gónadas, en este caso se clasifican como ictiotóxicos y se caracterizan por contener altas cantidades de ácidos grasos insaturados que pueden llegar a ser tóxicos (39,40); finalmente, los peces ictiohematóxicos contienen veneno en su sangre. Generalmente los peces de las anteriores clasificaciones poseen su capacidad venenosa al consumir organismos menores que sintetizan las toxinas. Existen también los peces ictiocrinotóxicos que

tienen glándulas independientes especializadas en la producción de veneno, sin tener un aparato venenoso que les permita inyectarlo (39).

Tabla 1-1: Toxinas proteicas identificadas en el veneno de peces acantóxicos hasta la fecha*

Especie	Toxina	MW	Referencia
<i>Synanceia horrida</i>	Traquinilina (TLY)	158 kDa Dímero	Colasante et al. (41) y Tay et al. (42)
	Stonustoxina (SNTX)	148 kDa Dímero	Poh et al. (43)
	Verrucotoxina (VTX)	322 kDa Tetrámero	Garnier et al. (44)
<i>Synanceia verrucosa</i>	Neoverrucotoxina (neoVTX)	166 kDa Dímero	Ueda et al. (45)
	Lectina	45 kDa	Kato et al. (46)
	Cardioleputina	46 kDa	Abe et al. (47)
<i>Notesthes robusta</i>	Nocitoxina	169.8–174.5 kDa	Hahn y O'Connor (21)
<i>Pterois volitans</i>	Pvtoxina- α , Pvtoxina- β	Dímero, monómeros de ~75 kDa	Kiriake y Shiomi (48)
	Pterocidina- α	2.4 kDa	Houyvet et al. (49)
	*	7.6 kDa	Sri Balasubashini et al. (50)
<i>Pterois antennata</i>	Patoxina- α , Patoxina- β	Dímero, monómeros de ~75 kDa	Kiriake and Shiomi (48)
<i>Pterois lunulata</i>	*	160 kDa Dímero	Kiriake et al. (17)
<i>Pterois russelli</i>	Fosfolipasa A2	No determinado	Memar et al. (51)
<i>Inimicus japonicus</i>	*	160 kDa Dímero	Kiriake et al. (17)
	Lectina	97 kDa	Nakagawa et al. (52)
<i>Hypodytes rubripinnis</i>	*	160 kDa Dímero	Kiriake et al. (17)
	Karatoxina	110 kDa Dímero	Nagasaka et al. (20)
<i>Sebastapistes strongia</i>	*	No determinado	
<i>Scorpaenopsis oxycephala</i>	*	No determinado	Chuang y Shiao (18)
<i>Sebasticus marmoratus</i>	*	No determinado	
<i>Dendrochirus zebra</i>	*	No determinado	
<i>Scorpaena plumieri</i>	Sp-CTx	121 kDa Dímero	Andrich et al (53)
	Plumieribetina	14 kDa	Evangelista et al. (54)
	SP-CL 1-5	16.8–17 kDa	Andrich et al. (55)
<i>Trachinus draco</i>	Dracotoxina	105 kDa	Chhatwal y Dreyer (9)
<i>Trachinus vipera</i>	Traquinina	324 kDa Tetrámero	Perriere et al. (56)
<i>Scatophagus argus</i>	SA-HT	18 kDa	Karmakar et al. (57)
<i>Thalassophryne maculosa</i>	TmC4-47.2	No determinado	Sosa-Rosales et al. (22)
<i>Thalassophryne nattereri</i>	Nattectina	15 kDa	Lopes-Ferreira et al. (58)
	Natterinas 1-4	43-38 kDa	Lopes-Ferreira et al. (59)
<i>Plotosus canius</i>	Toxina-PC	15 kDa	Auddy et al. (60)
<i>Cathrops spixii</i>	Wap65	54 kDa	Ramos et al. (61)
<i>Platosus lineatus</i>	Toxina I	35 kDa	Shiomi et al., Tamura et al. (62,63)
	Toxina II	37 kDa	
<i>Siganus fuscescens</i>	*	~ 77 kDa, Dímero	Kiriake et al. (64)

*Sin nombre asignado. Tabla modificada de (6)

Los peces *venenosos* o acantóxicos presentan glándulas productoras de veneno integradas a un aparato venenoso que les permite infundir daño en el tejido de su víctima y seguidamente diseminar el veneno (39). Se ha estudiado el veneno en peces como mantarrayas *Neotrygon kuhlii* y *Himantura toshi*, encontrando efectos cardiovasculares y neurotóxicos (35); en bagres, tal como *Plotosus lineatus* se han

estudiado toxinas con actividad letal y hemolítica (63). En el pez conejo *Siganus fuscescens*, se demostró que posee una toxina análoga a la presente en el pez piedra, con una subunidad alfa (α) de 703 aminoácidos (aa) y otra beta (β) de 699 aa. Además de características tóxicas similares a los peces Scorpaeniformes como la especificidad hemolítica hacia eritrocitos de conejo, actividad letal en ratones y formación de edemas (64). *Thalassophyryne maculosa* y *Thalassophyryne nattereri*, son peces sapo en los que se ha identificado una toxina denominada TmC4-47.2 con actividad miotóxica (65) y una lectina, Nattectina, de 15 kDa que reconoce galactosa y aglutina eritrocitos humanos (58) (Tabla 1-1).

El orden de los Scorpaeniformes son considerados entre los más peligrosos y se dividen en la familia Synanceiidae para los peces piedra *Synanceia horrida* y *Synanceia verrucosa*, las especies más representativas de esta familia se han caracterizado por su alta toxicidad y la identificación y caracterización de sus toxinas, además de la producción del único antiveneno comercial hasta la fecha (66–68). En la familia Scorpaenidae se encuentran los peces escorpión, y el pez león *Pterois volitans*, que se ha hecho notorio por su presencia invasora en el Océano Atlántico, al ser una especie que afecta negativamente los peces nativos y la economía basada en la pesca; su veneno altera la actividad del sistema cardiovascular, respiratorio, neuromuscular, posee actividad citolítica, enzimática y antinociceptiva (6).

1.1. GENERALIDADES DE *Pterois volitans*

El pez león pertenece al género *Pterois*, de la familia Scorpaenidae de la especie *volitans* (Linnaeus 1758); los peces de esta familia usualmente tienen colores en su piel que les permiten camuflarse en el medio que se encuentre, poseen espinas venenosas (dorsal, anal y pélvica) que van de 7 a 13 en su aleta dorsal. El pez, *P. volitans*, es característico por su morfología con aletas en forma de abanico, franjas marrones y blancas a lo largo de toda la cabeza y cuerpo. Sus espinas venenosas

se localizan en la aleta dorsal, anal y pectoral; estas espinas contienen tejido glandular venenoso holocrino, localizado en los surcos de las espinas que se encuentran recubiertas por tejido conectivo (69).

Este pez es endémico del Océano Indo-pacífico, desde el sur de Japón y Corea a la costa este de Australia, Indonesia, Micronesia, Polinesia y del sur oeste pacifico de Australia a islas Marquesas (27,28); sin embargo fue reportado por primera vez en el Océano Atlántico de Estados Unidos en 1985. Teorías sugieren que el inicio de la invasión de este pez se debe a su liberación de los acuarios que los contenían como especie ornamental (27,29). Este pez se ha dispersado por toda la costa de Estados Unidos y gradualmente se han empezado a reportar avistamientos y capturas en América Central, el sur de México, Belice, Honduras, San Andrés, Providencia, Costa Rica, Panamá y la costa norte colombiana (Figura 1-1), a lo largo de Cartagena, Barranquilla, Santa Marta y la Guajira; lo que genera un gran impacto en el equilibrio del ecosistema (70,71).

Figura 1-1: Reportes de avistamientos de *P. volitans* en el Océano Atlántico



Puntos rojos: avistamientos acumulativos reportados al servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS), desde 1985 al 30 de enero de 2018. Tomada y modificada de (72).

La reproducción del pez león puede ocurrir durante todo el año, sin ser interrumpida por las estaciones. A temperaturas entre 10 °C y 16 °C deja de alimentarse y muere (73,74). Otros de los problemas que genera su invasión es que una vez su llegada,

las poblaciones de peces nativos disminuyen casi un 80 % en 5 semanas lo que significa que el pez puede consumir del 2,5 % al 6 % de su peso corporal (75).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Identificar en el veneno del pez león, *P. volitans* proteína (s) y/o péptido (s) biológicamente activos.

1.2.2. Objetivos Específicos

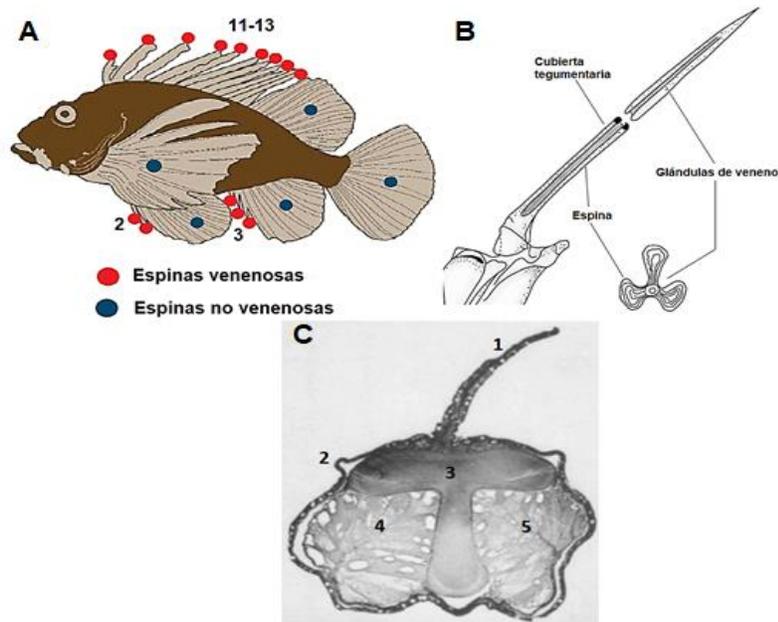
- Determinar las mejores condiciones de extracción del veneno que preserven la actividad biológica de proteínas y/o péptidos.
- Evaluar la actividad citotóxica del veneno con diferentes líneas celulares tumorales y normales.
- Evaluar la actividad hemolítica del veneno empleando eritrocitos de diferentes fuentes animales.
- Separar los componentes del extracto de veneno mediante técnicas cromatográficas.
- Caracterizar bioquímicamente la(s) proteína(s) y/o péptido(s) que presente(n) actividad biológica.

2.OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DEL VENENO DE *Pterois volitans*

2.1. EL PEZ LEÓN, *Pterois volitans*

El pez león como especie invasora en el océano atlántico ha generado un impacto ecológico por la disminución de peces pequeños nativos de arrecife ecológicamente importantes, y económico por ser predador de peces y moluscos comercialmente importantes (75–77); además de ser un depredador voraz, la reproducción de este tipo de pez se puede llevar a cabo durante todo el año (74) llegando a su madurez sexual en el primer año de vida (70), liberando en promedio 25000 huevos por cada desove y pudiendo reproducirse cada 3,6 - 4,1 días (78). Su contacto directo con humanos es altamente doloroso y puede llevar a afecciones cardiovasculares y neuromusculares importantes (31,79).

El contacto con esta especie se hace peligrosa, aunque no mortal; la picadura generalmente es para buzos que se cruzan con el pez y llegan a tocarlo. Sus espinas venenosas rompen el tejido y debido a la presión que se produce al contacto, la cubierta tegumentaria de la espina se rompe para liberar el veneno que se encuentra almacenado en glándulas tipo apocrinas (80) (Figura 2-1), produciendo un dolor extremo, náuseas, mareos, debilidad muscular y efectos cardiovasculares como hipertensión, cefalea y en casos extremos, se puede presentar necrosis (31).

Figura 2-1: Caracterización del aparato venenoso de *P. volitans*

A. Espinas venenosas del aparato venenoso del pez león que fueron extraídas para obtención del veneno. **B.** Morfología de las espinas dorsales venenosas. **C.** Micrografía de la espina y la localización de las glándulas venenosas. 1,membrana interespinosa; 2, cubierta tegumentaria; 3, espina; 4 y 5 glándulas venenosas. Las figuras se tomaron y modificaron de (81), (39) y (69) respectivamente.

2.2. DESARROLLO METODOLÓGICO

2.2.1.Recolección de individuos *Pterois volitans*

Se realizó la socialización con pescadores de la zona de Taganga (Santa Marta - Colombia), para la búsqueda del pez león, debido a que ellos reportaron que seguidamente se realizan avistamientos del pez en sus jornadas de trabajo.

El muestreo de peces se realizó mediante pesca submarina de pescadores locales durante los años 2016 y 2017 recolectándose 25 peces vivos (3 especímenes el 26 abril de 2016, 9 peces el 18 noviembre de 2016 y 13 el 11 noviembre de 2017) entre 8,8 y 23,5 cm de diámetro. Como el pez león está catalogado como una especie invasora, el gobierno colombiano promueve su aprovechamiento para la investigación médica y/o química o en el tratamiento de enfermedades a partir de

las toxinas de su veneno para así contribuir con la erradicación de esta especie invasora (67).

Figura 2-2: Mapa de la localización de Taganga y El Rodadero en Santa Marta, Colombia



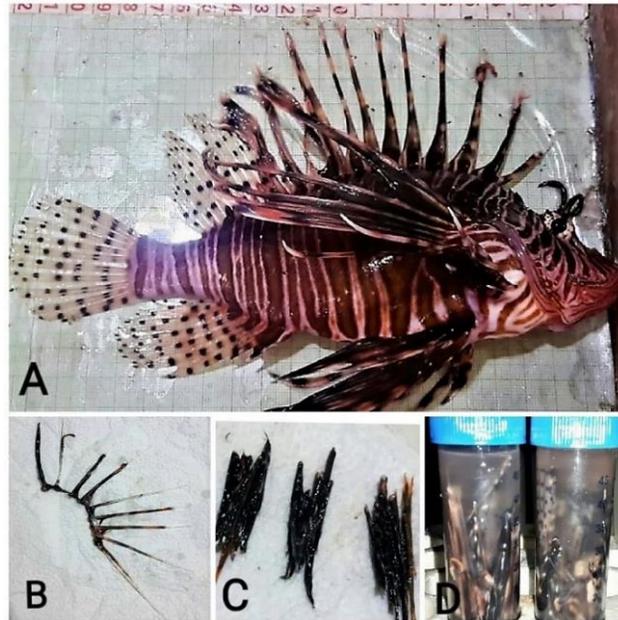
Tomado y modificado de Shadowxfox - Trabajo propio, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=41155127>

Los ejemplares fueron trasladados en baldes de plástico en agua de mar fresca de la playa, hasta los laboratorios de biología marina de la Universidad Jorge Tadeo Lozano en El Rodadero, Santa Marta. La identificación de la especie fue realizada por el Dr. San Juan Alfonso López y la Dra. Mónica Puyana Hegedus (Figura 2-3).

2.2.2.Extracción del aparato venenoso

Los peces fueron sumergidos y sedados en una solución que contenía 10 mL de solución 50:50 de eugenol: etanol 75 %, por cada 5 L de agua de mar. Una vez anestesiados se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Luego se midieron con un ictiómetro, y fueron decapitados. El aparato venenoso fue extraído (espinas dorsales, anales y pélvicas), pesado y almacenado en glicerol 10 % en un recipiente con hielo seco hasta su procesamiento.

Figura 2-3: Ejemplar de *P. volitans* y aparato venenoso extraído



A. espécimen *P. volitans* siendo medido en ictiómetro; **B.** aletas dorsales venenosas; **C.** aletas pelvicas y anales venenosas; **D.** almacenamiento del aparato venenoso en tubos con solución de extracción.

2.2.3. Obtención del extracto crudo del veneno

El extracto crudo de veneno se obtuvo macerando el aparato venenoso con cada una de las soluciones de homogenización respectivas (ver 2.2.3.1, 2.2.3.2, 2.2.3.3), posterior centrifugación a 1000 o 7000 gravedades según el método (a 1000 g se sedimentan células, núcleos y citoesqueleto, a 7000 g se obtiene además compuestos subcelulares como mitocondrias); obteniéndose un sobrenadante (extracto crudo de veneno, EV) color naranja y un precipitado color negro, en el que se encontraban los restos de material perteneciente al aparato venenoso como tegumento y hueso (Figura 2-4).

Dependiendo del experimento a realizar y como se indica en el capítulo 3, el veneno fue dializado con una membrana Spectra/Por® Dialysis Tubing MWCO: 3,5 kDa, realizando 3 cambios de 1 L (agua-bicarbonato de amonio 20 mM y bicarbonato de amonio 20 mM), cada uno de 8 horas. Todos los procedimientos se hicieron a 4 °C.

Figura 2-4: Extracción del veneno de las espinas del pez león



A, B. maceración de las espinas en solución de homogenizado; C. homogenizado de las espinas; D. sobrenadante -extracto crudo de veneno (EV).

2.2.3.1. Metodología de extracción según Michael Choromanski

El tejido glandular de las espinas fue homogenizado, pesado y transferido a tubos falcón con 3,0 mL de la solución de homogenización, por cada gramo de tejido. La solución de extracción contiene PBS 1X y Coctel Inhibidor de Proteasas (CIP); de este coctel se emplearon tres preparaciones diferentes:

1. Inhibidores de proteasas mezclados en el momento de la preparación del buffer, CIP (EGTA 2 mM (inhibidor de metaloproteasas), leupeptina 10 µg/mL (inhibición de cisteín, serín, y treonín proteasas) y PMSF 1 mM (inhibidor de serín proteasas).
2. Mezcla de inhibidores marca Sigma® (Anexo G) que contienen : AEBSF – 4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato – inhibe serinproteasas, Aprotinina – inhibe serinproteasas, Clorhidrato de pestatina – inhibe aminopeptidasas, E-64 – N- (trans-Epoxy succinyl) -L-leucine 4-

guanidinobutylamide, Sal de leupeptina hemisulfato – inhibe serin y cistein proteasas, Pepstatina A – inhibe proteasas ácidas.

3. Pastilla de inhibidores marca c0mplete® (Anexo H): En general la mezcla inhibe serín y cisteín proteasas.

Los homogenizados se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4 °C y los sobrenadantes fueron aislados como extracto de veneno crudo (EV); posteriormente, se hicieron alícuotas del 1 mL y se almacenaron a -20 °C (82).

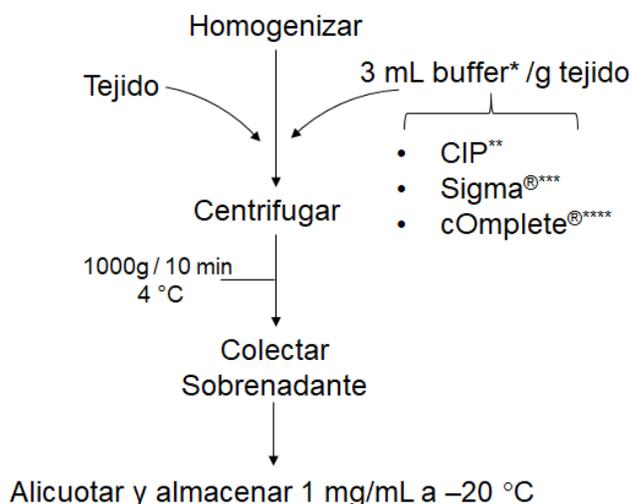


Diagrama 2-1: Extracción del veneno de *P. volitans* según la metodología descrita por Choromanski (82).

2.2.3.2. Metodología de extracción según Church & Hodgson

Se removieron las espinas y se almacenaron en solución de glicerol al 10 % en H₂O MiliQ. Las espinas se homogenizaron en un mortero, y la suspensión fue centrifugada a 7000 g durante 10 minutos (sobrenadante No.1). El pellet se resuspendió una vez más en 1 mL de la solución de glicerol al 10 % y el sobrenadante (No.2) se recuperó y realizó un pool con el sobrenadante No.1. Con el pool de sobrenadantes (No 1 y No 2) se hicieron alícuotas del 1 mL y se almacenaron a -20 °C (83).

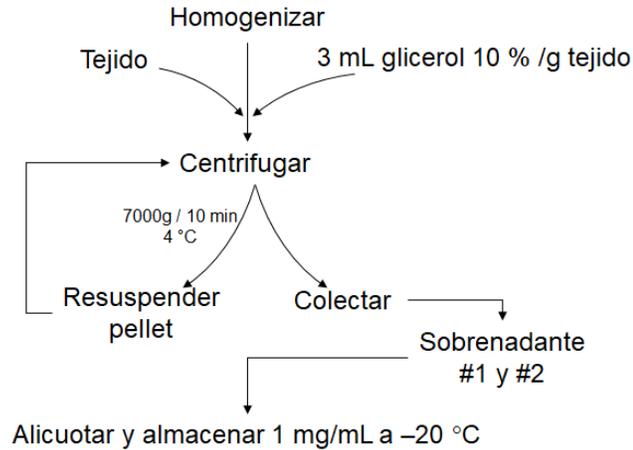


Diagrama 2-2: Extracción del veneno de *P. volitans* según Church (83).

2.2.3.3. Metodología de extracción con glicerol 10 % y coctel de inhibidores para proteasas (CIP)

Se homogenizaron las espinas en un mortero con una solución de glicerol 10 % y las tres clases de cocteles de inhibidores de proteasas CIP, marca Sigma® y marca c0mplete®. La suspensión fue centrifugada a 7000 g durante 10 min, el sobrenadante No.1 se recuperó y se almacenó. El pellet se resuspendió en 1 mL de glicerol al 10 % con CIP y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante No.2 se recuperó y realizó un “pool” con el sobrenadante No.1. Se almacenaron alícuotas de 1 mL a -20 °C.

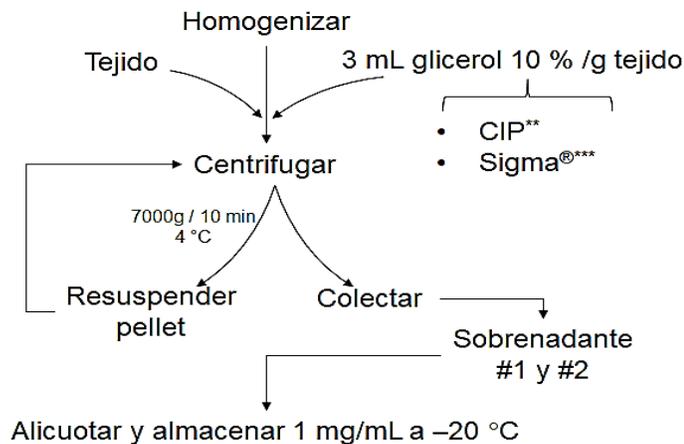


Diagrama 2-3: Extracción del veneno de *P. volitans* con glicerol 10 % y coctel inhibidor de proteasas

2.2.4. Cuantificación de proteína de los extractos crudos de veneno (EV)

Se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA) descrito por Smith (1985) y en microplaca (84). La determinación se hizo empleando como patrón una solución de Albúmina sérica bovina (BSA) con diluciones en serie, a partir de una concentración inicial de 1,31 mg/mL.

2.2.5. Análisis e identificación del perfil proteico de los diferentes extractos crudos de veneno

2.2.5.1. Cromatografía HPLC-RP C18

Se inyectaron 20 μ L de cada uno de los extractos obtenidos en 2.2.3 (~50 μ g de proteína total) y se empleó una columna analítica Chromolith RP-18e, dimensiones de 4,6x150 mm, con gradiente lineal de 5 % de solvente A, (0.05 % ácido trifluoroacético, TFA; en acetonitrilo, ACN) hasta 95 % del solvente B (0.05 % TFA en agua) durante 75 minutos; con un flujo de 1 mL/min (85). También se corrieron los blancos de las soluciones de extracción; la detección se hizo a 220 nm.

2.2.5.2. Electroforesis SDS-PAGE

Para todos los extractos se realizó electroforesis según los métodos descritos por Laemmli (86) en geles del 12.5 % o en geles del 10 % según Schägger y Von Jagow (87). Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 92 °C durante 5 minutos. Los geles fueron fijados con ácido acético 10 % durante 30 minutos y se tiñeron con azul de coomassie G-250 y/o tinción de plata (88); se analizaron con el programa Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

2.2.5.3. Electroforesis Bidimensional

Se rehidrató la tira IPG (IPG's de un rango continuo de pH 3-10 y 7 cm de diámetro) de forma pasiva durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente con 125 μ L de

solución de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, anfolitos Bio-Lyte 3/10 0,2 % w/v y trazas azul de bromo fenol), 100-150 µg de proteína total de extracto crudo de veneno (EV) disuelto en buffer muestra (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2 % Anfolitos 3-10, DTT 40 mM) y 3 mL de aceite mineral, seguida de rehidratación activa por 11 horas. Después de la rehidratación, se realizó el enfoque usando Bio-Rad PROTEAN® IEF cell a una temperatura de 20 °C a 250 V por 20 min, 4000 V por 2 horas y finalmente 4000 V a 10000 V-hr, todo a 50 µA/tira para un total de 5 horas.

Una vez terminada la primera dimensión, se realiza el equilibrio de las tiras IPG incubando 20 minutos en agitación con Buffer de equilibrio I (urea 6 M, SDS 2 %, Glicerol 20 % y Tris-HCl ,375 M pH 8,8 y DTT 130 mM), seguido de Buffer de equilibrio II (Urea 6 M, SDS 2 %, Glicerol 20 % y Tris-HCl ,375 M pH 8,8 y iodoacetamida 135 mM) durante 20 minutos en agitación y oscuridad. Una vez finalizado el equilibrio de las tiras IPG la segunda dimensión se llevó a cabo en SDS-PAGE usando geles del 12,5 % (86). Al finalizar la separación en la segunda dimensión los geles se tiñeron con azul de coomasie G-250 al 0,1% y/o tinción de plata.

2.3. RESULTADOS

Se siguieron tres métodos de extracción con el fin de seleccionar la mejor metodología de obtención del EV de *P. volitans*. Los métodos descritos (82,89) se seleccionaron para solubilizar la mayoría de las proteínas con PBS 1X que mantiene el pH y la fuerza iónica fisiológica (90) o glicerol 10 %, ya que es un agente estabilizante que previene la agregación de proteínas (91); la adición de inhibidores de proteasas, se hizo con el fin de evitar la degradación de proteínas del extracto. En todos los casos, después de realizar diálisis con membrana de 3 kDa la coloración disminuyó significativamente y se eliminaron moléculas menores a 3 kDa; con estos extractos se evaluó la actividad biológica y la cantidad de proteína.

2.3.1. Obtención de los extractos de veneno y cuantificación de proteína total

Se colectaron 25 peces de *P. volitans*, y la especie se confirmó con las características morfológicas; la identificación fue realizada por Dr. San Juan Alfonso López y la Dra. Mónica Puyana Hegedus, docentes de la Universidad Jorge Tadeo Lozano sede Santa Marta. La cuantificación (ver anexo A) de proteína para cada uno de los extractos por el método del ácido bicinconínico (BCA) se presenta en la tabla 2-1.

Tabla 2-1: Concentración de proteína de los EV

Extracto	Solución de extracción	Tejido húmedo (mg)	mg/mL	mL	Proteína total (mg)	² Rendimiento (%)
Choromanski	¹ PBS 1X CIP mezcla	254,4	2,404	0,700	1,683	0,660
	PBS Sigma [®] 1X	255,3	2,797	0,766	2,142	0,849
	PBS cOplete [®] 1X	252,6	2,142	0,760	1,630	0,644
Church	Glicerol 10 % ³	251,4	1,955	0,754	1,474	0,586
Choromanski y Church	¹ Glicerol 10 % ³ CIP mezcla	246,0	1,348	0,738	0,995	0,404
	Glicerol 10 % ³ Sigma [®]	255,3	1,365	0,766	1,046	0,410

¹mezcla: EGTA 1 mM, leupeptina 10 µg/mL y PMSF 1 mM. ²Respecto a los mg de aparato venoso (tejido húmedo). ³glicerol 10 % en H₂O

Con estos extractos se evaluó el perfil de proteínas por HPLC-RP C18 y su actividad biológica, a partir de pruebas de citotoxicidad usando células HTR8, (ver 2.3.2 y 3.4.2.6.1 respectivamente) para determinar, cuál era el mejor proceso de extracción, que permitía obtener la mejor concentración de proteínas con actividad biológica.

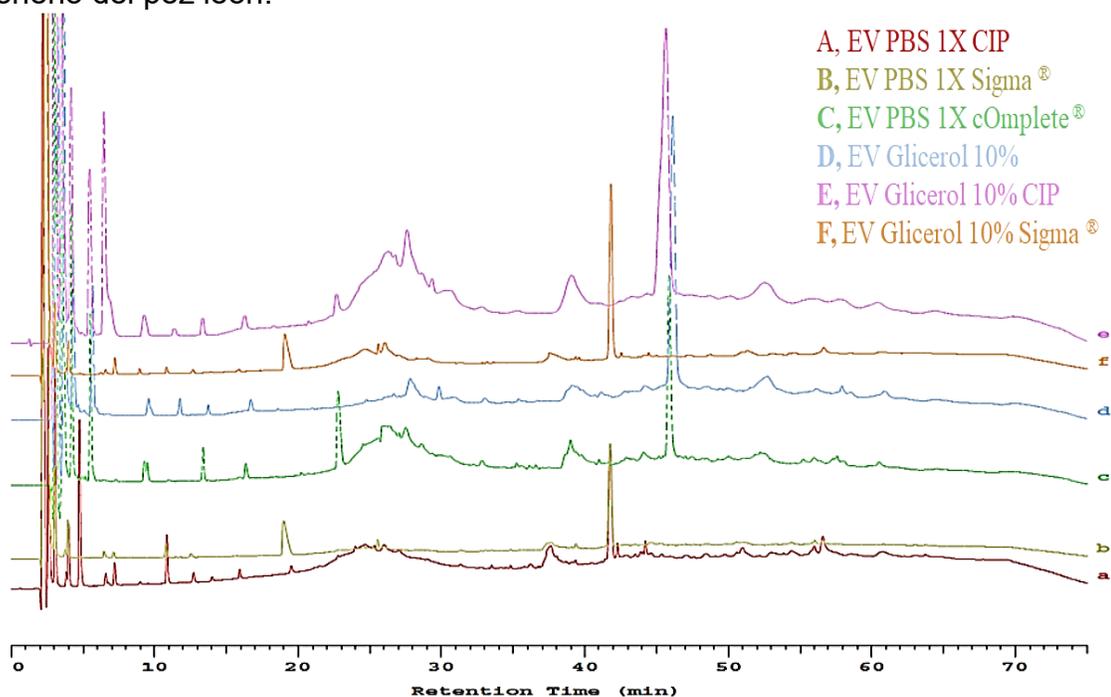
2.3.2. Identificación de perfil de proteínas por HPLC-RP C18

La Figura 2-5 muestra los perfiles superpuestos de HPLC con cada uno de los extractos de veneno sin dializar. Se observa mayor intensidad de las señales entre

20 y 50 min, para el extracto obtenido con glicerol 10 % y CIP. El Anexo B muestra los cromatogramas individuales de los extractos de veneno (el software elimina automáticamente las señales provenientes del blanco) y los controles de cada solución de extracción.

Se observan señales no resueltas en t_R entre 20 a 30 minutos, a $t_R \sim 46$ min se presenta la señal más intensa de los extractos obtenidos con glicerol 10 % y la mezcla de inhibidores ensayada (CIP), glicerol 10 % y PBS 1X cOmplete[®], pero no se aprecia en las extracciones realizadas con glicerol 10 % CIP Sigma[®] ni con PBS 1X- CIP; en cambio, para estas dos preparaciones se presenta una señal a t_R 42 min.

Figura 2-5: Multicromatograma HPLC-RP C₁₈ de cada uno de los extractos del veneno del pez león.



En general, no se observaron señales intensas con estos métodos, si se comparan con los otros métodos empleados. Para todos los extractos se observaron señales con t_R de 2 a 20 min que pueden corresponder a los constituyentes más polares del veneno, sin embargo, su intensidad es baja.

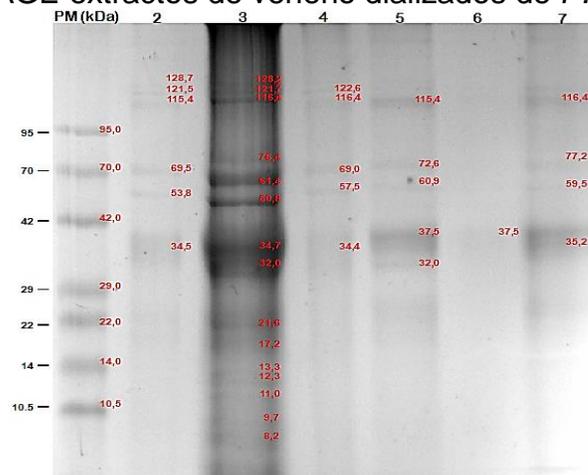
Tabla 2-2: Tiempos de retención de las señales obtenidas para los EV de *P. volitans*

Señal	PBS 1X CIP	PBS 1X Sigma®	PBS 1X complete®	Glicerol 10 % Sigma®	Glicerol 10 % CIP	Glicerol 10 %
1	2.1	2.5	3.0	2.5	3.1	3.1
2	2.5	3.0	4.2	3.0	3.5	3.7
3	3.0	4.3	5.5	4.0	4.2	4.3
4	4.0	5.4	9.4	7.2	5.5	5.7
5	5.1	6,6	13.3	9.7	6.5	9.5
6	6,6	7.7	16.3	22 -30	9.2	11.8
7	7.8	10.7	22.8	37.6	11.4	13.7
8	11.3	12.5	24-30	41.8	13.3	16.7
9	12.7	19.0	39.0	51.3	16.3	18.6
10	14.0	16.9	45.8	-	22.6	30.9
11	16.9	19.5	-	-	23-30	39.1
12	19.5	41.7	-	-	39.1	46.1
13	20 - 30	-	-	-	45.6	52.7
14	32.7	-	-	-	52.5	-
15	41.8	-	-	-	-	-
16	44.6	-	-	-	-	-
17	50,9	-	-	-	-	-

Los colores indican las señales más intensas que son comunes para los EV con el mismo tiempo de retención

En la Tabla 2-2, se resumen las señales y los tiempos de retención para los EV; de acuerdo con estos resultados el método de extracción con glicerol 10 % en PBS 1x conteniendo CIP es el que presenta mayor número e intensidad de señales.

2.3.3.SDS PAGE 1D y 2D para los EV

Figura 2-6: SDS-PAGE extractos de veneno dializados de *P. volitans*

Carriles: 1, PM Opti-Protein Marker; 2, EV Glicerol 10 % - Sigma®; 3, EV Glicerol 10 % - CIP; 4, EV Glicerol 10 %; 5, EV PBS 1X - cComplete®; 6, EV PBS 1X - Sigma®; 7, EV PBS 1X - CIP. En cada

uno de los carriles se sembraron 100 µg de proteína total, los cuales se desnaturalizaron con SDS 1% y calentamiento a 92 °C. Análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

Tabla 2-3: Resumen pesos moleculares observados en SDS-PAGE

Método de extracción	²PM kDa
Glicerol 10 % - Sigma®	128, 121, 115, 69, 53, 34
Glicerol 10 % - CIP	128, 121, 116, 76, 61, 50, 34, 32, 21, 17, 13, 12, 11, 9, 8
Glicerol 10 %	122, 116, 69, 57, 34
PBS 1X - cOmplete®	115, 72, 60, 37, 32
PBS 1X - Sigma®	37
PBS 1X - CIP	116, 77, 59, 35, 25

Datos obtenidos a partir del análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

Por el método de Schägger y Von Jagow (86) (Figura 2-7) se obtuvo resultados similares, bandas entre 10-185 kDa, sin embargo, se observan mejor las bandas menores a 50 kDa (Tabla 2-4).

Tabla 2-4: Pesos moleculares observados en SDS-PAGE-Tricina

Método de extracción	²PM kDa
Glicerol 10 % - Sigma®	185, 134, 110, 102, 110, 77, 35, 22
Glicerol 10 % - CIP	185, 132, 110, 102, 72, 49, 41, 35, 24, 22, 11, 10
Glicerol 10 %	190, 138, 117, 72, 35, 21, 10
PBS 1X - cOmplete®	190, 138, 115, 104, 72, 35, 24, 23, 10
PBS 1X - Sigma®	145, 117, 35, 22, 10
PBS 1X - CIP	138, 110, 34, 22

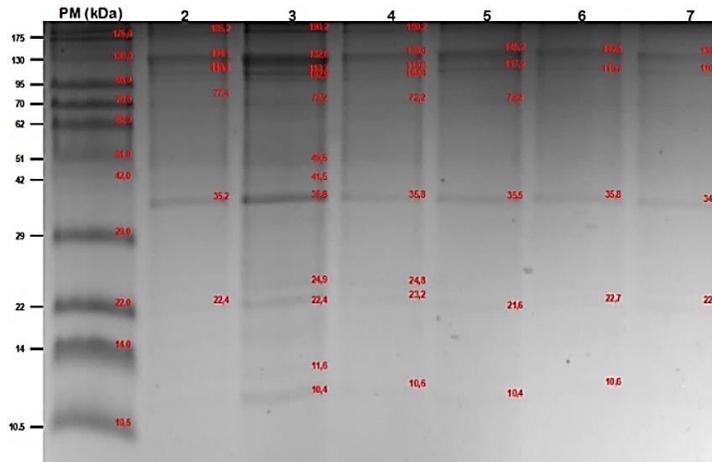
Tabla a partir del análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

En la electroforesis en 2D, se encontraron 4 spots con masas moleculares <10 kDa con pl de 3.1 a 4.5, y un rango amplio de proteínas con puntos isoeléctricos entre pH 3 y 8 (Figura 2-8). Se destaca la intensidad de un spot con una masa molecular alrededor de 12 kDa con pl ácido de 4.1, que se presenta en una proporción mayor con respecto a los demás spots.

La mayoría de los spots tienen pl en un rango de pH 5-8; además (Anexo J), hay un grupo de spots que se localizan con masas moleculares entre 26-11 kDa. Los resultados indican que el EV es una mezcla compleja de proteínas y péptidos, que

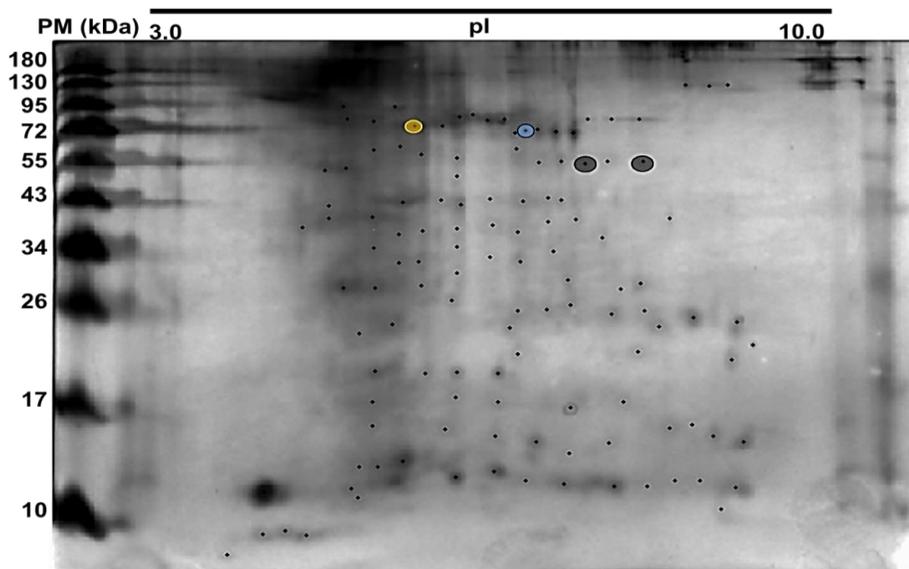
se podrían identificar realizando estudios de digestión con tripsina y determinación de la huella peptídica para cada uno de ellos. Sin embargo, se puede hacer una aproximación de la localización de proteínas presentes en el veneno en el gel 2D con el PM y pl teórico.

Figura 2-7: SDS-PAGE-Tricina de los extractos dializados de *P. volitans*



Por el método de Schagger en gel del 10%. Carriles: 1, PM Opti-Protein Marker; 2, Glicerol 10 % - Sigma®; 3, Glicerol 10 % - CIP; 4, Glicerol 10 %; 5, PBS 1X - cOmplete®; 6, PBS 1X - Sigma®; 7, PBS 1X - CIP. 50 µg de proteína total, los cuales se desnaturalizaron con SDS 1% y calentamiento a 92 °C. Análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

Figura 2-8: Electroforesis bidimensional de EV de *P. volitans*



Electroforesis bidimensional de 100 µg EV de *P. volitans*. pl, punto isoeléctrico. La totalidad de spots son numerados y descritos en el Anexo J. En amarillo Pvtoxicina-α y Pvtoxicina-β en azul. En gris hialuronidasa del veneno. El análisis del gel se realizó con el programa PDQuest Advanced 8.0.1

Por ejemplo, la toxina con subunidades Pvtoxina- α , Pvtoxina- β de 75 kDa que reportan Kiriake y Shiomi en 2011 en el veneno del pez león (48) tiene un pI teórico de 5.8 para la subunidad α y 6.2 para la subunidad β , estas subunidades podrían estar relacionadas con los spots que se observan en la Figura 2-8. En amarillo con 75,6 kDa y pI 5.4 se relaciona con Pvtoxina- α y Pvtoxina- β con 73,6 kDa y pI de 6.5 en azul. Los spots encerrados en gris podrían ser las hialuronidasas del veneno con 56,3 y 51,3 kDa, de 7.0 y 8.1 pI respectivamente.

2.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El estudio de las proteínas y péptidos provenientes de peces venenosos es muy escaso, si se compara con los numerosos estudios que se han realizado en venenos de animales terrestres; lo anterior puede darse debido a la dificultad de obtener especies de origen marino y aislar el veneno, la manipulación de las especies para obtener el veneno, su traslado a los laboratorios para su análisis y en gran medida, a la inestabilidad de los extractos por procesos como la liofilización, un almacenamiento prolongado, procesos de congelamiento – descongelamiento, cambios de temperatura y al conocimiento tan escaso que hay sobre la descripción de los venenos en la literatura (4,6,7). Lo anterior, muestra que es un campo que hay que estudiar y, por lo tanto, se debe empezar a generar el conocimiento sobre esta clase de venenos, su caracterización bioquímica y proteómica enfocada en la identificación de nuevos componentes de origen marino.

La extracción del veneno de *P. volitans*, es compleja, ya que su aparato venenoso no posee espinas tipo “aguja hipodérmica” donde la presión mecánica permite la expulsión del veneno de forma homogénea y eficiente como sucede con los peces del género *Synanceia* (39). Por esto, desde 1959 diferentes trabajos acerca de los métodos de extracción se han realizado (48,82,83,92–95).

Para este estudio, se seleccionaron los métodos de Choromanski 1985 (82) y Church & Hodgson 2002 (83), como punto de partida en la obtención del EV. El

método de extracción de Choromanski, realizado con PBS 1X y coctel de inhibidores Sigma® llevó a obtener un mayor rendimiento (0,7 %) en el proceso de extracción, con 2,14 mg de proteína total (Tabla 2-1). Sin embargo, la cantidad de proteína es baja por aspectos técnicos como la maceración manual y el tejido pesado que presentan las glándulas venenosas, las cuales se hallan embebidas en surcos que comprenden la espina, y que no poseen ninguna composición proteica (Figura 2-1); de ahí que el peso de la masa húmeda sea significativo. La cantidad de proteína total soluble, también proviene de la cubierta tegumentaria del aparato venenoso que recubre la espina, este tejido posee algunas células productoras de veneno que se encuentran en menor proporción, según lo reportado por Hasted (69).

En términos generales, la cantidad de proteína soluble no corresponde únicamente al veneno, por esa razón se hace referencia al EV. Por otra parte, luego del proceso de diálisis se eliminó en su mayoría la (s) sustancia (s) que da(n) una coloración anaranjada a los extractos y que podrían interferir en etapas posteriores de purificación. Para seleccionar el método de extracción más adecuado, se evaluó el perfil de proteínas y/o péptidos haciendo una separación de sus componentes por cromatografía y electroforesis.

La cromatografía por HPLC-RP C18 en principio no mostró gran cantidad de señales (Figura 2-5). La mayoría de los componentes, se eluyen entre 20 y 55 minutos con señales que son similares para los EV obtenidos con extracción de Glicerol 10 %, Glicerol 10 % CIP, PBS 1X cOplete®. Respecto a lo reportado por Choromanski, las fracciones 5 a 20 por HPLC Anexo C (82) son similares a las señales de este trabajo en T_R 5 a 30 min (Figura 2-5). Se observó que una gran proporción de los compuestos fueron retenidos en la columna, y eluidos en el lavado de la columna con ACN 100% (datos no mostrados), sugiriendo que el veneno contiene compuestos hidrofóbicos, que se deben separar y recuperar con otro tipo de columna. Hasta la fecha el único reporte cromatográfico del veneno de peces y su separación por HPLC-RP es el de Choromanski. Las demás señales de

T_R 30 a 50 minutos obtenidas en este trabajo por HPLC-RP C18 (Figura 2-5) no pudieron ser identificadas en el cromatograma de Choromanski debido a la baja resolución de su método (Anexo C), por el corto tiempo de análisis. Esto permite dar una aproximación a la homogeneidad de las extracciones y por lo tanto su reproducibilidad.

De acuerdo con lo mencionado y para tener un perfil más completo de la separación de los componentes EV, se empleó una columna C4, para disminuir la interacción con los componentes apolares y de esta forma obtener fracciones para hacer estudios de actividad enzimática (Capítulo 3).

Por SDS-PAGE para el EV obtenido con Glicerol 10% CIP se observó un mayor número de bandas con la misma cantidad de proteína con respecto a los demás EV (Figura 2-6 y Figura 2-7); la mezcla de inhibidores empleada, que incluía EGTA, leupeptina y PMSF, evitó la degradación de las proteínas y la auto proteólisis que usualmente se podría presentar cuando se obtienen extractos de fuentes animales; también se observó mejor integridad de las bandas en los geles. La extracción con PBS 1X con la mezcla de inhibidores comerciales (Sigma® y cOmplete®), arrojó un número de bandas menor (entre 1 y 5 bandas) con pesos moleculares en un rango de 25- 116 kDa (Figura 2-6 y Tabla 2-3). El número de bandas obtenido con la extracción de PBS 1X e inhibidores es similar al perfil electroforético obtenido por Choromanski, quien reporta 5 bandas de 29, 45, 66, 97 y 116 kDa (Anexo C).

Dentro de la familia *Scorpaenidae* se han encontrado numerosos compuestos con actividad biológica, en los que se pueden enumerar toxinas gelatinolíticas con pesos de 45-60 kDa en *P. volitans* (96), lectinas de 13,1 a 16,9, 45 y 97 kDa en *S. plumieri*, *S. verrucosa* y en *I. japonicus* respectivamente; proteasas del pez sapo *T. nattereri* con masas moleculares entre 5,9 a 41,4 kDa (46,54,55,97). El extracto de veneno estudiado por Manso (96), siguiendo la metodología de Church presenta bandas en un rango de 40 -100 kDa . Kiriake, observó aproximadamente 6 bandas entre los 10 -250 kDa, dentro de las cuales hay una alrededor de 75 kDa que fue

reconocida por el anticuerpo generado contra la NeoVTX, toxina proveniente del pez piedra *S. verrucosa* (48). En el EV obtenido con Glicerol 10 % CIP (Figura 2-6, carril 3) se pudo observar una banda muy tenue de 76,4 kDa, la cual podría estar relacionada con la NeoVTX. En otros peces venenosos como *Green scat* se encuentran proteínas en un rango de 7- 250 kDa (98,99) con actividades hemolíticas y proteolíticas como las encontradas en el veneno de *P. volitans*.

El veneno de *P. volitans* está compuesto de proteínas de alto y bajo peso molecular características de venenos en animales. En los venenos de las serpientes *Vipera berus berus*, *Agkistrodon contortrix* y *Crotalus durissus terrificus* han identificado proteínas como: metaloproteasas con masas moleculares mayores a 95 kDa y pl entre 5.5 y 6.5; serin proteasas entre 33 y 50 kDa con pl de 5.0 a 7.0; fosfolipasas básicas de 17 a 23 kDa y pl de 4.5 y fosfolipasas neutras a pl de 7.0 a 8.0; lectinas tipo C con masa molecular menor a 17 kDa y pl aproximado de 6.0 (100–102). Además, en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* han reportado metaloproteasas de 35 y 25 kDa con pls de 6.0 a 4.5 y péptidos menores a 10 kDa con pl de 9.0 que actúan en el reconocimiento de canales de sodio (85,103), en *Tityus stigmurus* se encuentran metaloproteasas de 25.8 kDa en pl 5.0 (104).

Dentro de la caracterización de los componentes proteicos de venenos de origen marino, se encuentra el análisis 2D PAGE del veneno crudo del pez *T. nattereri* (59,97), que muestra únicamente 6 spots que se distribuyen en un gradiente de pH de 6 y 11 y masas de 43 y 38 kDa correspondientes a variaciones de la toxina Natterina (Tabla 1-1). En comparación con el perfil 2D PAGE observado en este trabajo con *P. volitans* (Figura 2-8), se puede observar mucha correlación con las masas moleculares y pl descritos en otros organismos venenosos, sin embargo, es de tener en cuenta que muchos de los spots observados en este trabajo podrían corresponder no solo a toxinas, proteasas y lectinas presentes en el veneno, sino también a otros compuestos proteicos que hacen parte de la cubierta tegumentaria que recubre el aparato venenoso de *P. volitans* y que son obtenidos por el método de extracción usado (Figura 2-8).

Con base en los resultados obtenidos, los mejores métodos de extracción del veneno son aquellos que se realizaron con Glicerol 10 % (Church 2002), Glicerol 10 % CIP y Glicerol 10 % Sigma®; estos últimos propuestos en este trabajo a partir del trabajo de Church. Para continuar con los ensayos propuestos, se hizo tres recolecciones de peces león en diferentes tiempos, y se realizó la extracción con el método de Church & Hodgson, es decir, Glicerol 10 % sin inhibidores de proteasas, debido a que interfieren en algunos de los experimentos enfocados en la detección de actividad enzimática, tales como actividad de proteasa, hialuronidasa y en efectos tóxicos *in vivo* de ratones y peces. Por otra parte, la integridad del extracto se conserva, al igual que el perfil de bandas, como se observó por PAGE 1D y 2D.

3. PURIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL VENENO DE *P. volitans*

3.1. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DEL VENENO DE *Pterois volitans* EN DIFERENTES MODELOS

Estudios realizados para identificar el (los) componente(s) activo(s) del veneno han permitido establecer, que el efecto en la presión sanguínea en conejos anestesiados es negativa, produciendo hipotensión (vaso dilatación) a bajas dosis (130 µg de extracto proteico veneno/kg), y en altas dosis (cercana a la dosis letal de 200 µg de extracto proteico veneno/kg) hipertensión, seguida por hipotensión y se observa aumento en el ritmo respiratorio dependiente de concentración (92). En ratas anestesiadas se presenta un efecto positivo seguido de uno negativo en la presión sanguínea, se identifica una posible activación de los receptores muscarínicos y la distensión de arterias coronarias de cerdo, previa contracción (83). El veneno del pez león induce en ratas una respuesta inotrópica mixta (fuerza de contracción positiva y negativa) en la aurícula izquierda y por lo tanto una posible actividad en el receptor adrenérgico β_1 ; respecto a la respuesta cronotrópica se encontró un latido espontaneo por parte de la aurícula derecha en ratas (83) (Tabla 3-1).

El veneno produce una respuesta inotrópica y cronotrópica negativa en corazones de rana y almeja, también se presenta fibrilación de preparados neuromusculares por la presencia de acetilcolina y otra toxina en EV que afecta las transmisiones

neuromusculares, observándose debilidad muscular en ratones inoculados con el veneno (94). En corazones de peces Búfalo se observó un incremento en el efecto cronotrópico seguido de una rápida disminución inotrópica (82) (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Efectos cardiovasculares del veneno de *P. volitans* en diferentes modelos animales

Modelo	Efectos	Objetivos	Referencia
Rata	Presión sanguínea efecto + y -		(105)
Arterias coronarias cerdo	Contracción seguida de distensión	Receptores muscarínicos	(105)
Conejo	Presión sanguínea efecto - a dosis baja y +/- alta dosis	No reporta	(92)
Rata estimulada por aurícula izquierda	Respuesta inotrópica -/+	Adrenoreceptores β 1	(105)
Rata estimulada por aurícula derecha	Respuesta cronotrópica +	Adrenoreceptores β 1	
Pez búfalo	Respuesta cronotrópica y inotrópica		(82)
Corazón de rana y almeja	Respuesta cronotrópica y inotrópica	No reporta	(94)
Preparación neuromuscular de biventer cervicis de pollo	Fibrilación y bloqueo del musculo, respuesta contráctil	Liberación de acetilcolina de nervios presinápticos terminales, formación de poros celulares	(94,106)

Tabla modificada de (6).

La presencia en el veneno de una toxina no proteica que exhibe absorción máxima a 287 nm y tiene una masa molecular de 327 Da, mostró inducir parálisis en peces de la familia *Cyprinodontidae*, quienes recuperaban su movilidad después de ser retirada la toxina del medio en donde se mantenían. La estructura no pudo ser elucidada debido a que el método de extracción de veneno no permitía tener cantidades adecuadas para los estudios estructurales (93) (Tabla 3-1). Otros estudios realizados con el veneno demostraron que había actividad hemolítica con alta especificidad por eritrocitos de conejo (23700 unidades hemolíticas/mg de veneno) y muy bajas a eritrocitos de vaca, caballo, oveja, conejillo de indias y gallina (< 30 unidades hemolíticas/mg de veneno) debido a la presencia de hemolisinas encontradas en variedad de peces venenosos y que probablemente la mayoría de ellas son selectivas a eritrocitos de conejo (95). Presenta también

actividad gelatinolítica de una proteasa de 45 kDa, aumento de la actividad de acetilcolinesterasa y ATPasas de Na⁺ y K⁺ dosis dependiente. La adición del extracto de veneno a células corticales murinas produce un aumento de los niveles de Ca²⁺ probablemente por la formación de poros en la membrana celular (106).

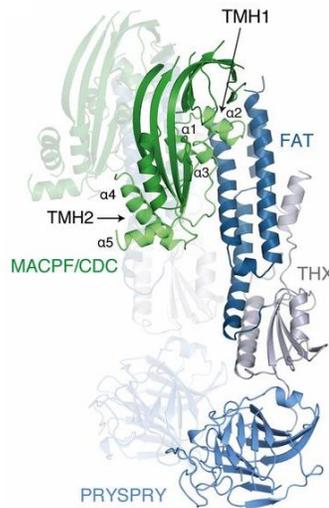
Los efectos citotóxicos del EV en células endoteliales aórticas bovinas y mioblastos murinos son débiles (107), Balasubashini y colaboradores realizaron la separación del veneno por cromatografía de exclusión y a la fracción que tuvo actividad citotóxica se purificó por HPLC-RP, e identificaron un péptido por espectrometría de masas de 7,6 kDa. Este péptido a una concentración de 2 µg/mL inhibe la proliferación de células cancerígenas HEP2 y HeLa en 24 horas por inducción de apoptosis selectiva activando la caspasa 3; y por la fragmentación nuclear que se observa al teñir células con yoduro de propidio, por otra parte no hubo efectos adversos en linfocitos humanos (50,108). El EV aumenta la vida media en ratones que han sido inoculados con tumor ascítico de Ehrlich, al disminuir la carga tumoral y el estrés oxidativo, teniendo actividad hepatoprotectora y antimetastásica en este tipo de tumor (109). Otros estudios realizados con ratones intoxicados con alcohol y tratados con EV, mostraron la restauración de la actividad de la acetilcolinesterasa, posiblemente por su contenido de acetilcolina o compuestos con un efecto similar (110).

3.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE *Pterois volitans*

El estudio del veneno de *P. volitans* ha llevado a la identificación de algunas proteínas y péptidos con actividad biológica, por ejemplo, inmunoensayos demostraron que existen reacciones cruzadas del veneno del pez león con el antiveneno del pez piedra, *S. verrucosa*, reconociendo en el veneno una proteína dimérica con subunidades de 75 kDa, y que conserva una identidad del 47 % al 81 % con las subunidades α y β de toxinas estudiadas en miembros de la familia

Scorpaenidae, de *S. verrucosa* (verrucotoxina) y *S. horrida* (stonustoxina). Estas toxinas contienen el dominio B30.2/SPRY en la región C-terminal de cada subunidad, el cual media interacciones proteína-proteína (48,111). La proteína dimérica de 75 kDa posee epítopes de secuencia y estructura similares a la verrucotoxina y stonustoxina (Figura 3-1). El componente letal en el veneno del pez piedra denominado stonustoxina (SNTX), es un complejo proteico que por su actividad formadora de poros tiene actividad hemolítica, promueve la agregación plaquetaria y actividad neurotóxica (66). La SNTX se compone de 4 dominios a lo largo de su estructura, el dominio N-terminal MACPF/CDC (1-265aa) está compuesto por 4 hebras- β antiparalelas a las cuales se asocian dos hélices- α , que corresponden a hélices transmembranales TMH1 y TMH2 (Figura 3-1), el dominio FAT (266-385aa) forma una estructura de 4 hélices- α seguido de 5 láminas- β para el dominio THX (386-517aa) y por último el dominio C-terminal PRYSPRY (518-703aa) forma una estructura tipo sándwich con dos hojas- β compuesta de 7 y 6 hebras- β antiparalelas.

Figura 3-1: Estructura cristalina de la stonustoxina



A. Estructura cristalina de las subunidades de la SNTX y dominios que la conforman. Imagen y descripción tomada y modificada de (66).

Esta toxina heterodimérica posee en su N-terminal un dominio que pertenece al complejo de ataque a membrana Perforina/Citolisina dependiente de colesterol

MACPF/CDC que se encuentra seguida de un dominio de adhesión focal (FAT) que sirve como soporte en la conformación de complejos. Después, continúa con el dominio tiorredoxina (THX) que usualmente pertenece a proteínas que actúan en la regulación redox de otras, sin embargo, en SNTX el dominio THX carece de los aa catalíticos teniendo un papel estructural únicamente. El dominio PRYSPRY interviene en el reconocimiento de virus y bacterias intracelulares (66). Como en la mayoría de los venenos, hay enzimas que degradan ácido hialurónico; la enzima hialuronidasa, se encuentra ampliamente distribuida en el veneno de lagartos, serpientes, escorpiones, arañas, abejas y peces, entre otros; lo que les permite romper la matriz extracelular de los tejidos.

La hialuronidasa en el veneno de *P. volitans* tiene 483 aminoácidos y su actividad óptima es a pH 6,6, 37 °C y 0,1 M de NaCl, presenta 99,6 % de identidad con hialuronidasas de *P. antennata* y entre el 72–77 % con la de los peces piedra de *S. verrucosa* y *S. horrida* (112). Se encontró también actividad de proteasas gelatinolíticas con pesos moleculares entre 45-60 kDa y se sugiere que son metaloendoproteasas debido al aumento de su actividad proteolítica en presencia de iones Ca^{2+} (96,107) (Tabla 3-2).

Tabla 3-2: Compuestos presentes en el veneno de *P. volitans*

Molécula	Actividad y peso molecular	Referencia
Hemolisina	Hemólisis de eritrocitos de conejo	(95,96,106,107)
Proteasas	Gelatinolítica, caseinolítica 60 -19 kDa	(96,107,108)
Hialuronidasa	Hidrólisis de ácido hialurónico 56,5 kDa	(107,112)
Toxina	Factor hemolítico, 2 subunidades de 75 kDa	(48)
Péptido	Induce apoptosis en células Hep2 y HeLa 7.5 kDa	(50)
Toxina	Produce parálisis en peces 327 Da	(93)
Acetilcolina	Neurotransmisor	(94)
Pterocidina-α	Péptido antibacterial y hemolítico 2.4 kDa	(49)

La detección de lectinas, a partir de cualquier fuente por lo general se realiza por ensayos de aglutinación, con eritrocitos de diversas fuentes animales. En las últimas décadas, se han identificado varias lectinas de peces marinos con actividad antiproliferativa; como la lectina obtenida de las huevas del salmón; la cual es

reconoce ramnosa y es tóxica en células MCF-7 derivadas de cáncer de mama y células Hep G2 de hepatoma (113). Otra lectina que reconoce ramnosa proviene de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), pero en este caso reconoce lipopolisacáridos y ácido lipoteicoico proveniente de la pared de bacterias grampositivas (114); la galectina-1 recombinante de *Paralichthys olivaceus* es capaz de reducir la patogenicidad del virus de la linfocistis que afecta principalmente al salmón y la dorada (115). Una lectina tetramérica de unión a manosa fue aislada de *Rachycentron canadum* con actividad antibacterial y mitogénica a *Escherichia coli* y esplenocitos de ratón respectivamente (116).

Aunque las lectinas están presentes de forma ubicua, y se han reportado diversidad de aplicaciones y funciones de aquellas aisladas tanto de tejidos vegetales como de animales; los reportes de lectinas provenientes de venenos se han limitado en su mayoría a las serpientes, donde se ha encontrado que tienen actividad hemostática, estimulan la proliferación celular y están en procesos de adhesión celular (117–119). En el caso del veneno proveniente de peces se han identificado hasta ahora, la Karatoxina, una glicoproteína de 110 kDa del veneno de *H. rubripinnis* que reconoce D-manosa y posee efectos citolíticos, mitogénicos, quimiotácticos y aglutinantes a eritrocitos de conejo (20) (Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Lectinas presentes en el veneno de peces acantóxicos

Especie	Clase	Nombre	Masa molecular kDa	Inhibición	Actividad Biológica
<i>S. verrucosa</i>	-	ND	45	α -D-manósido	Mitogénesis
<i>S. plumieri</i>	Tipo-C	Sp-CL 1-5	16–17	Galactosa	ND
	Tipo-B	Plumieribectina	14	No reportada	Mitogénesis
<i>I. japonicus</i>	-	ND	97	α -D-manósido	Mitogénesis
<i>T. nattereri</i>	Tipo-C	Nattectina	15	Asialofetuina	Modulación sistema inmune
<i>H. rubripinnis</i>	-	Karatoxina	110	α -D-manósido	Hemolítica, citolítica y quimiotáctica

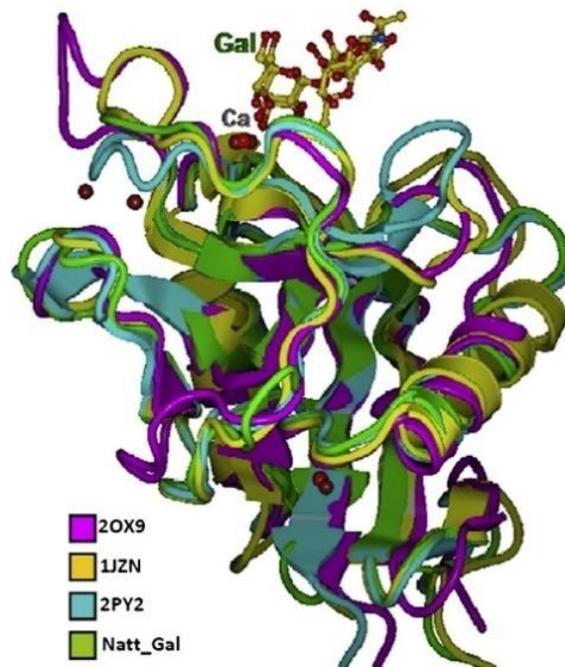
ND: no determinado

En el veneno de *S. plumieri* se halló la Plumieribectina con un peso molecular de 14 kDa y especificidad a la manosa, además presenta interacciones proteína-proteína con la integrina $\alpha 1\beta 1$ debilitando el contacto célula-matriz extracelular y

reduciendo por lo tanto la migración celular (54), este veneno además posee isolectinas de tipo C (16,8 - 17 kDa), de las cuales la isolectina Sp-CL-4 podría presentar funciones similares a sus homólogos como la Nattectina de 15 kDa (55); aislada del veneno de *Thalassophryne nattereri* que exhibe propiedades proinflamatorias en ratones, al inducir el reclutamiento de neutrófilos en el tejido inflamado (58).

En otros estudios, se encontró que la Nattectina, actúa como un agente inmunomodulador en la respuesta inmune innata, al activar macrófagos y de esta forma estimular la respuesta de células T (120,121) (Tabla 3-3, Figura 3-2). Lopes-Ferreira en 2011 determinan que la Nattectina presenta bajo porcentaje de identidad (32–37 %) con lectinas provenientes de serpientes, peces y ratones, sin embargo, en el modelamiento de la estructura terciaria observan que conserva el dominio de reconocimiento a galactosa de las lectinas tipo C, carece de la secuencia Asn-X-Thr receptora de glicosilaciones y la región aceptora de Ca^{2+} debido a la sustitución de Asp-Asn161 (Figura 3-2).

Figura 3-2: Modelamiento molecular de la Nattectina



Se presenta la superposición estructural de lectina de tipo C de ratón (2OX9), lectina específica de galactosa del veneno de *C. atrox* (1JZN), la Nattectina (Natt_Gal) y proteína anticongelante tipo II de *C. harengus* (2PY2). Todas las estructuras son similares diferenciándose los dos bucles que rodean el sitio de reconocimiento de Ca^{2+} . Imagen modificada de (58).

A partir del modelamiento 3D, Lopes-Ferreira encontraron que la Nattectina tiene un plegamiento conocido como jelly roll (Figura 3-2) característico de las lectinas tipo leguminosa, en el cual se presenta 8 hebras antiparalelas que forman una hoja- β estabilizándose con enlaces de hidrogeno entre las hebras 1 y 2; 2 y 7; 3 y 6, y 4 y 5 (58). Recientemente se ha observado similitud en las características funcionales de las lectinas presentes en venenos de la misma familia, en este caso *Synanceiidae* en la que se enmarcan los peces piedra *Inimicus japonicus* y *S. verrucosa*. Se aislaron dos lectinas de masas moleculares de 97 kDa y 45 kDa, las cuales son inhibidas por metil α -D-manósido y estimulan la proliferación de linfocitos murinos (46,52) (Tabla 3-3).

Los anteriores estudios demuestran el gran potencial farmacológico de las lectinas presentes en venenos de peces marinos, y a pesar de que son pocos los reportes, en comparación con las lectinas presentes en venenos de serpientes; los venenos de origen marino son una gran fuente de compuestos de importancia biotecnológica.

3.3. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.3.1. Purificación del EV por métodos cromatográficos

Para todas las cromatografías en este trabajo se define como fracción a cada una de las señales y/o picos que se observan en el cromatograma.

3.3.1.1. Cromatografía de exclusión por HPLC y en columna abierta

Para la cromatografía de exclusión en columna abierta, el EV (Glicerol 10 %) se dializó contra bicarbonato de amonio 20 mM con una membrana de 3 kDa y se cuantificó por el método de BCA obteniendo 594 μ g (250 μ L) de proteína total. La separación se realizó sobre 21 mL de Sephadex[®] G-75 en una columna con dimensiones de 10X310 mm, a un flujo de 1 mL/ 8,5 min en acetato de amonio 20

mM pH 4,7. Las fracciones obtenidas se liofilizaron y cuantificaron por el método de BCA.

Para la cromatografía de exclusión por HPLC, el EV (Glicerol 10 %) se liofilizó y reconstituyó en 50:50 de 0,1 % TFA; ACN-TFA 0,1 %, luego fue centrifugado a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante (SobEVT) se cuantificó por el método de BCA obteniendo 450 µg (250 µL) de proteína total. La separación se realizó con una columna Cosmosil 5Diol-300-II Waters (tamaño de partícula 5 µm), con dimensiones de 7,5x600 mm a un flujo de 0,5 mL/min en acetato de amonio 20 mM pH 4,7. La corrida se hizo durante 80 min, y la detección a 230 nm y 280 nm.

3.3.1.2. HPLC de intercambio aniónico

De la fracción 7 obtenida por exclusión en HPLC (3.3.1.1), se inyectaron 84.1 µg de proteína en 200 µL de buffer fosfatos 5 mM pH 6.0, 20 % ACN. La separación se realizó en una columna Protein-pak DEAE 5PW (tamaño de partícula 10 µm), 7,5x75 mm, con un gradiente lineal de 100 % solvente A (Buffer fosfatos 5 mM pH 6.0, 20 % ACN) a 100 % de solvente B (Buffer fosfatos 5 mM pH 6.0, 20 % ACN, NaCl 1M) durante 75 minutos, con un flujo de 1 mL/min y detección a 280 nm.

3.3.1.3. HPLC-RP C4

El EV (Glicerol 10 % dializado como se describe en 2.2.3) se liofilizó y reconstituyó en 50:50 de 0,1 % TFA; ACN-TFA 0,1 %, luego fue centrifugado a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante (SobEVT) se cuantificó por el método de BCA obteniendo 300 µg (250 µL) de proteína total. La separación se hizo sobre una columna Vydac 214TP C4 (tamaño de partícula 5 µm), con dimensiones 4,6x250 mm, con un gradiente lineal de 100 % de solvente A, (0.1 % TFA en agua) durante 5 min. Seguido de 0-60 % del solvente B (0.1 % ácido trifluoroacético, TFA; en acetonitrilo, ACN) y 100-40 % de A en 60 min. En 5 min de 60-90 % de solvente B y se mantiene por 5 min; la corrida se llevó a cabo durante 75 min, con un flujo de 1 mL/min y la detección a 280 nm y 220 nm. Las fracciones obtenidas se secaron

al vacío y se cuantificaron por NanoDrop a 280 nm y 220 nm, teniendo en cuenta que en una mezcla compleja de proteínas se puede determinar su concentración si el espectro en el rango UV posee máximos de absorbancia a 280/270 nm y a 190/220 nm y considerando que 1UA corresponde a 1 mg/mL de proteína presente (90).

3.3.1.4 Cromatografía de afinidad

Se sembraron 400 µg de EV (Glicerol 10 %) en NaCl 1 % conteniendo Mn⁺⁺ 5 mM, Ca⁺⁺ 5 mM en 1 mL de soporte de manosa-agarosa, previamente equilibrado en la misma solución. Los componentes no retenidos se eluyeron con NaCl 1 % 5 mM Mn⁺⁺/Ca⁺⁺. Para eluir la fracción retenida se adicionó primero glucosa 0.2 M y después buffer Glicina-HCl pH 3.0 a un flujo de 0.1 mL/5 min. La detección se hizo a 220 y 280 nm. También se hicieron ensayos sobre 1 mL de soporte Sefarosa 4B-manosa y se sembraron 400 µg de EV NaCl 1 % conteniendo Mn⁺⁺ 5 mM, Ca⁺⁺ 5 mM. Se siguió el procedimiento descrito previamente.

3.3.2. Evaluación de la actividad del veneno y las fracciones purificadas

3.3.2.1. Actividad hemolítica

Para la determinación de la actividad hemolítica se trabajó con eritrocitos de conejo al 2 % en PBS 1X pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄). El EV (Glicerol 10 %) se dializó en membrana de 3 kDa contra bicarbonato de amonio 20 mM, y cuantificó por el método de BCA. Se agregó 9,5 µg de proteína total en bicarbonato de amonio 20 mM a 200 µL de la suspensión de eritrocitos. Como control positivo de hemólisis se usó 800 µL de Tritón X-100 al 2 % en PBS 1X pH 7.4 y como control negativo de hemólisis se usó PBS 1X pH 7.4.

Todos los tratamientos se llevaron a un volumen final de 1 mL con PBS 1X pH 7.4. Después de homogenizar los tubos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. El porcentaje de hemólisis (% H) se estimó a partir de la absorbancia de la hemoglobina liberada a 545 nm con el valor medio de las absorbancias (réplicas) para cada tratamiento (95,96,122).

$$\%H = (DOM-DOCN/DOCP-DOCN)$$

DO = densidad óptica, M = muestra, CN = control negativo, CP = control positivo.

3.3.2.2. Actividad aglutinante

Se trabajó con una suspensión de eritrocitos de conejo al 2 %; la actividad se evaluó empleando una escala cualitativa de 0 a +4 según el grado de aglutinación; donde 0 no presente actividad eritroaglutinante y +4 contiene alta actividad. Esta fue verificada al microscopio de luz mediante un frotis en placa y observada bajo el objetivo a 10X y 40X (123). Como control negativo de aglutinación se usó PBS 1X únicamente.

3.3.2.3. Actividad fosfolipasa

Se preparó una solución de yema de huevo al 10 % (p/v) en Tris-HCl 0,1 M pH 7.5, CaCl₂ 5 mM y Tritón X-100 0,5 % con agitación magnética durante 10 minutos, posteriormente fue centrifugada a 1500 rpm 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Luego, se disolvió 0,1 g de agarosa en 10 mL de Tris-HCl 0,2 M pH 7.95 y se adicionó inmediatamente 1 mL de CaCl₂ 20 mM, 7 mL rodamina 6G 0,1 %, 100 µL Tritón X-100 y 2 mL de la solución de yema de huevo al 10 %, dejando solidificar en la caja de petri.

El EV (Glicerol 10 % dializado como se describe en 2.2.3) se liofilizó y reconstituyó en 50:50 de 0,1 % TFA; ACN-TFA 0,1 %, luego fue centrifugado a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante (SobEVT) y el pellet (P1 resuspendido en PBS 1X

pH 7.4) se cuantificaron por el método BCA y se sembraron 10 µg de proteína de SobEVT, P1, EV (Glicerol 10 %) y algunas de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4, solubilizadas en 10 µL de PBS 1X pH 7.4. Como control positivo, se usó el veneno de *Micrurus fulvius* y control negativo PBS 1X pH 7.4. Luego se incubó 1 hora a 37 °C. La actividad de fosfolipasa se visualizó en transiluminador UV, por formación de halos traslucidos o turbios (124).

3.3.2.4. Actividad de proteasas

Se copolimerizó 1,5 mg/mL de gelatina con poliacrilamida al 10 %. Luego se sembraron 5 µg de proteína de EV y de algunas de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4 solubles en 10 µL de PBS 1X pH 7.4. Para el control positivo se usaron 2 µg de veneno de *Bothrops asper*. También se sembró SobEVT y P1.

Después de la separación electroforética, los geles se incubaron en Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, tritón X-100 5 %, con agitación constante durante una hora. Luego se incubó con Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 tritón X-100 0,05 % durante una hora más. El gel se dejó por una hora más en Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Finalmente se colocaron en una cámara humedad toda la noche y se realizó tinción con azul de Coomassie; los geles fueron decolorados con ácido acético al 10 % e isopropanol 10 % (125).

3.3.2.5. Actividad de hialuronidasa

Se sembraron 5 µg de proteína de EV y de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4, SobEVT y P1 solubilizadas en 10 µL de PBS 1X pH 7.4; como control positivo se usaron 2 µg del veneno de *Brachypelma vagans*. Las muestras fueron corridas por SDS-PAGE en un gel del 10 %, copolimerizado con ácido hialurónico (HA) 0,5 mg/ml (ácido hialurónico sal de potasio de cordón umbilical humano, Sigma®). A las muestras se les agregó 4 µL de buffer de carga Laemmli (en condiciones no denaturantes), y no fueron calentadas.

Después de la separación electroforética, los geles se incubaron con PBS pH 5.8 (0,1 M fosfatos, NaCl 0,15 M, Tritón X-100 5%) por una hora a temperatura ambiente, el procedimiento se repitió dos veces. Luego se incubó con PBS pH 5.8 (0,1 M fosfatos, NaCl 0,15 M, Tritón X-100 0.05%), durante una hora y luego se dejó en PBS pH 5.8 (0,1 M fosfatos, NaCl 0,15) por diez minutos y luego los geles se dejaron en cámara húmeda toda la noche. Posteriormente se realizaron dos lavados con Tris-HCl pH 7.95 (0,015 M) y se tiñó durante 5 horas con agitación, utilizando una solución al 5 % de formamida, 20 % isopropanol, Tris-HCl pH 7.95 (0.015M) y 5 mL de Stains all 0,1 %, protegido a la exposición a la luz. Los geles fueron desteñidos durante una hora en agitación constante con 5 % formamida, 20 % isopropanol, Tris-HCl pH 7.95 (0.015 M). La región del gel donde HA había sido degradado por HAAsas no se tiñó, y la actividad HAasa se detectó como bandas no teñidas (126).

3.3.2.6. Actividad de EV y fracciones purificadas *in vitro* e *in vivo*

3.3.2.6.1. Citotoxicidad

La toxicidad del EV del pez *P. volitans* se evaluó *in vitro* en cinco líneas celulares disponibles en el banco de células del grupo de investigación (GRIP). Las líneas fueron: trofoblastos de placenta humana HTR8 (con morfología epitelial, adherentes y no tumorigénicas) (127); colon, HT-29 (proveniente de colon humano con adenocarcinoma colorrectal, morfología epiteliales, adherentes, pase # 49) (127); HeLa, cérvix (obtenidas de tejido de cérvix humano con adenocarcinoma, epiteliales y adherentes, pase # 4) (127); seno, HTB-26 (obtenidas de adenocarcinoma de glándula mamaria/mama, derivado del lugar de la metástasis, epiteliales, adherentes, pase # 6) (127); próstata, PC3 (obtenidas de adenocarcinoma de tejido de próstata, derivado desde el sitio de metástasis: hueso de humano, epiteliales, adherentes, pase # 2) (127).

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 10000 células/pozo en 100 μ L de medio de cultivo con 10 % de SFB y 10 % de antibiótico-antimicótico, y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5 %, durante 24 horas. El crecimiento de cada una de las líneas fue a 37 °C y 5 % de CO₂. Pasado este tiempo, las placas se inspeccionaron bajo microscopio invertido para evidenciar la adherencia de las células y la formación de la monocapa. Con el fin de observar efectos dosis respuesta sobre la viabilidad celular, estas se trataron por 24 horas a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad con los extractos de veneno en un rango de concentraciones entre 2 - 200 μ g/mL (en medio suplementado con SFB) y únicamente RPMI suplementado con SFB 10 %, como control negativo para determinar el 100 % de viabilidad celular.

La toxicidad de EV también se probó en cultivo primario de neuronas; para el cultivo se siguió la metodología descrita (128–131). La placa de 96 pozos fue tratada previamente con poli-D-lisina (PDK) por 12 horas y lavadas con H₂O MiliQ estéril para eliminar exceso de PDK. Una vez secos los pozos de la placa se adicionó el volumen con suspensión de neuronas para obtener la densidad requerida y se completó a 100 μ L en cada pozo con medio PNGM (constituido por: PNBM (Primary Neuron Basal Medium), 2 % de NSF-1, 2 mM de L-Glutamina; antibiótico 50 μ g/mL de Gentamicina y 37 ng/mL de amforericina). El medio se cambió cada dos días *in vitro* (DIV). El cultivo primario se mantuvo en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. Al onceavo DIV se realizó el estímulo con el EV de *P. volitans*.

El efecto sobre la actividad metabólica celular en las líneas celulares y el cultivo primario se determinó mediante el ensayo colorimétrico con MTT (132). A las 24 horas se adicionó 10 μ L de MTT (5 mg/mL en PBS 1X) a cada uno de los pozos y se incubó por 3 horas. Posteriormente se descartó el medio de cultivo y se dejaron decantar los cristales de formazan, los cuales se solubilizaron con 100 μ L DMSO 100 % durante 30 minutos a 37 °C. Una vez terminado el proceso de solubilización se leyó absorbancia a 540 nm (132). Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se evaluaron usando ANOVA de una o dos vías y prueba de comparaciones múltiples por Dunnett o Tukey según el ensayo (Anexo I).

3.3.2.6.2. *Ensayo de actividad antimicrobiana en Staphylococcus aureus*

Se trabajó con la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) en Cuernavaca, Morelos, México.

El inóculo de *S. aureus*, se hizo en 4 mL de medio líquido Müller-Hinton e incubó a 37 °C en baño maría con agitación constante. A las 12 horas se midió la absorbancia a 600 nm y se ajustó la densidad óptica entre 0,08 – 0,13. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a 20 mL con Agar Müller-Hinton fundido y se homogenizó la solución. Se sembraron 10 µg de proteína de EV (glicerol 10 %) y de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4 disueltas en 5 µL de PBS 1X pH 7.4. Como control positivo se usó 1 µL de ampicilina 1X. Se dejó difundir en el agar durante 20 min y se incubó a 37 °C hasta observar actividad, en control positivo y las muestras.

3.3.2.6.3. *Actividad insecticida en grillos de la especie Acheta domesticus*

La especie *A. domesticus* fue obtenida en el del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del IBT-UNAM. Se inyectaron las fracciones F6, F7 y F8 obtenidas por HPLC-RP C4, todas disueltas en H₂O MiliQ 5 µL y cuantificadas por NanoDrop, como control negativo se usa H₂O MiliQ. La inyección se realizó con un volumen máximo de 3 µL en la zona izquierda del tórax, segundo segmento. Se inyectaron 20 µg de proteína por gramo de grillo y se observó el comportamiento durante 24 horas.

3.3.2.6.4. *Actividad tóxica en ratas Wistar*

Se trabajó con 23 ratas Wistar (22 ± 2 g), obtenidas del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del IBT-UNAM. Se inyectaron por vía intravenosa 62,2 µg de proteína de EV (glicerol 10 %) liofilizado y solubilizado en agua. De las

fracciones obtenidas por HPLC-RP C4 se inyectaron 30 µg, disueltos en PBS 1X pH 7.4, Durante 24 horas se observó el comportamiento de los animales, en cuanto a equilibrio, piloerección, y movilidad entre otros.

*3.3.2.6.5. Actividad tóxica en peces cebra, *Danio rerio**

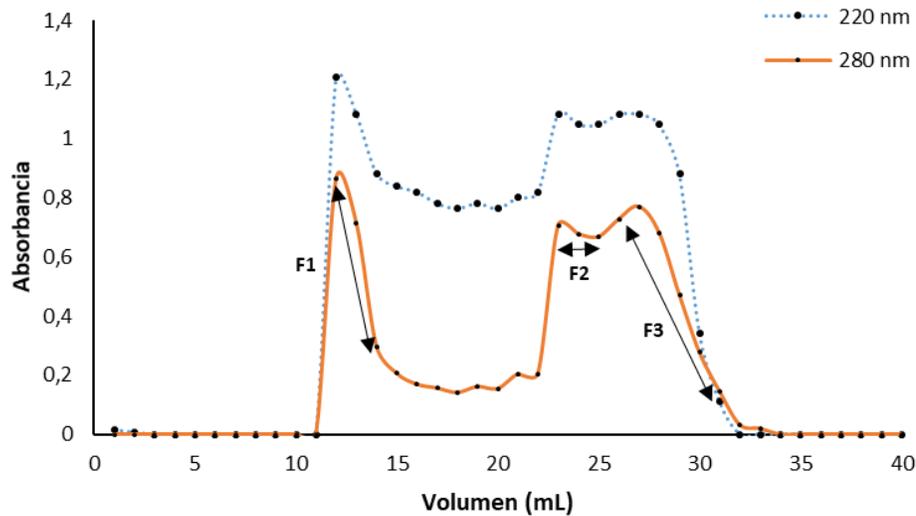
Se trabajó con 21 peces (432 ± mg), los cuales fueron facilitados en el departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del IBT-UNAM. Por vía intraperitoneal se administraron 10 µg de EV solubilizados en agua; y de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4 se inyectaron 5 µg solubilizados en H₂O MiliQ. Durante 12 horas se observó el comportamiento, como nado, flotación, convulsiones, ojos y aletas. La inoculación se realizó evitando afectar la vejiga natatoria inyectando un volumen máximo 3 µL cada una de las muestras (133).

3.4. RESULTADOS.

3.4.1. Purificación del veneno por métodos cromatográficos

3.4.1.1. Cromatografía de exclusión en columna abierta

Con el fin de identificar la mejor técnica para la separación de los componentes de EV se realizó cromatografía con Sephadex[®] G-75, el rango de exclusión se encuentra de 3 a 80 kDa, por lo tanto, las proteínas mayores a 80 kDa eluyen juntas (límite de exclusión) en la exclusión por tamaño en columna abierta no se obtiene tanta separación de los componentes proteicos, pero se consigue mayor cantidad de proteína.

Figura 3-3: Cromatografía de exclusión con Sephadex® G-75

Se realizó con acetato de amonio 20 mM y flujo de 0,1 mL/min. Se sembró 594 μ g de EV. Se indican las fracciones (flechas pool), F1, F2 y F3.

En esta separación (Figura 3-3) se obtuvo 3 señales de absorción cercanos a 1 UA en 280 nm, F1, F2 y F3. Los dos últimos no se separan bien en el cromatograma, pero se dividen en dos pools. A partir de la calibración de la columna (Figura E-1) se puede predecir los pesos moleculares presentes en cada fracción. La fracción F1 puede estar relacionada con proteínas mayores a 66 kDa, F2 con pesos moleculares entre 14 y 30 kDa y F3 con péptidos o proteínas de bajo peso molecular menores a 14 kDa.

Tabla 3-4: Proteína obtenida de las fracciones de exclusión por Sephadex G-75 en columna abierta y pesos moleculares de sus componentes proteicos

μ g Proteína EV	Fracción	¹ mg/mL	Proteína μ g	Recuperación %	² PM Electroforesis kDa
594	F1	0,394	197	33	47, 46, 40, 20, 10, 7
	F2	0,210	105	17	47, 43, 33, 10
	F3	0,076	38	6	45, 33, 10, 7

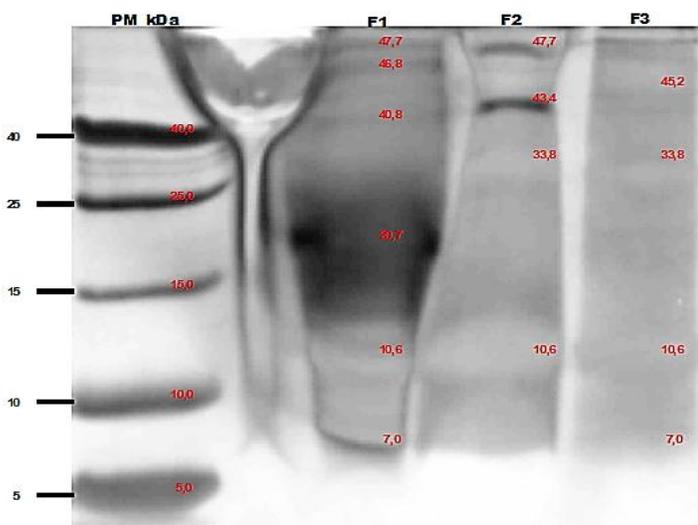
¹Volumen total de las fracciones 500 μ L. ²Pesos moleculares determinados a partir de los patrones moleculares usados en el gel de electroforesis. Figura 3-4.

El perfil electroforético de cada fracción (Tabla 3-4 y Figura 3-4) no muestra una separación por tamaño adecuada. En todas las fracciones se tienen PM de 10 kDa y mayores a 40 kDa, en F1 y F2 se encuentran de 7 kDa, en F2 y F3 de 33 kDa.

Los PM que distinguen a F1, F2 y F3 son de 46, 43 y 45 kDa respectivamente (Tabla 3-4 y Figura 3-4). Estas observaciones pueden ser producto de factores instrumentales (longitud y calidad de empaque de la columna, flujo, etc.) afectando la separación por tamaño de las proteínas presentes en EV.

Las fracciones obtenidas por exclusión molecular que se observan por electroforesis presentan mayor contenido proteico en F1 con una banda muy intensa a 20 kDa (Tabla 3-4), en F2 y F3 se tienen bandas definidas a 47 y 43 kDa y débiles debajo de 33 kDa respectivamente. En las tres fracciones se observa una banda de bajo peso molecular de 10 kDa.

Figura 3-4: SDS-PAGE Schägger de las fracciones de exclusión molecular por columna abierta



Por el método de Schägger en gel del 15%. En cada uno de los carriles se sembraron 20 µg de proteína total en condiciones denaturantes. Análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

3.4.1.2. Cromatografía de exclusión HPLC

Con el fin de identificar la mejor metodología para la separación de los componentes del veneno, una de las técnicas usadas fue la cromatografía de exclusión por HPLC, para separar las proteínas que se encontraban en el EV, al cual se le realizó un tratamiento previo para disminuir la complejidad de la matriz

proteica (SobEVT) y evitar saturación y daños en la columna, tal como se indica en la metodología (3.3.1.1).

Con un rango de exclusión de 10 a 700 kDa, la calibración de la columna con pesos moleculares conocidos (Anexo D) permitió determinar que: los picos que eluyen en menos de 34 min corresponden a proteínas de PM mayores de 66 kDa, al minuto 42 se encuentran proteínas cercanas a 29 kDa y entre 14 y 29 kDa están las proteínas que eluyen a 45 min (Figura 3-5).

Figura 3-5: Cromatografía de exclusión por HPLC del SobEVT de *P. volitans*

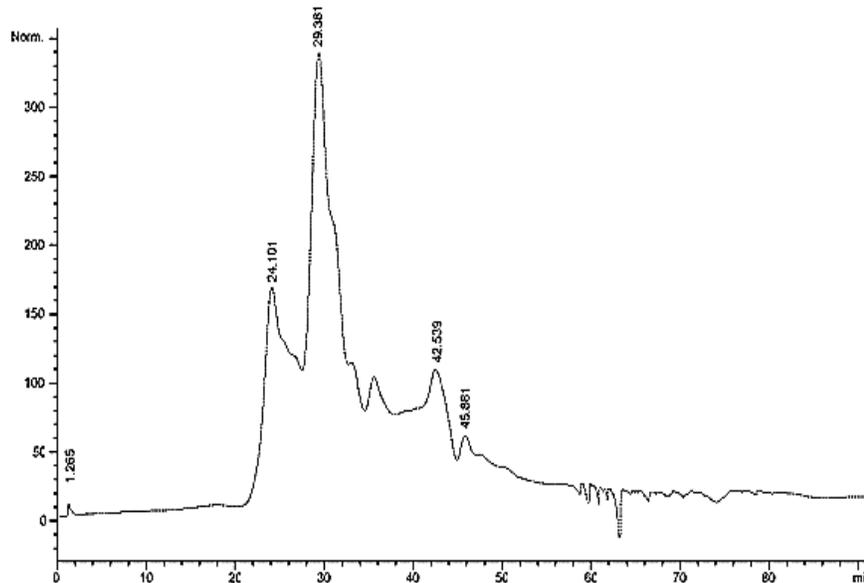


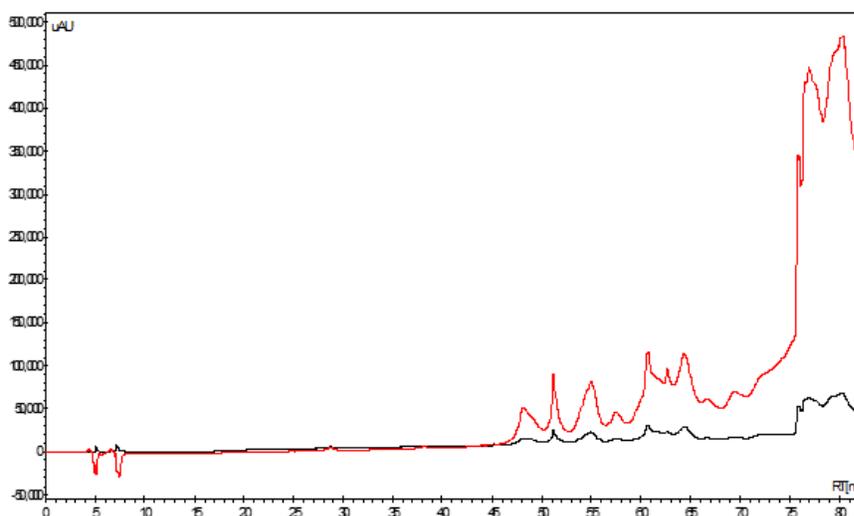
Tabla 3-5: Proteína total de fracciones obtenidas por exclusión HPLC

Proteína total EV (µg)	Fraciones (min)	1mg/mL	Proteína total µg	Recuperación de la purificación %
450	24.10	0*	0*	-
	29.38	0,30	60	13
	42.53	0,18	36	8
	45.88	0,07	15	9

¹Volumen total de las fracciones 200 µL *La cuantificación por NanoDrop no obtuvo ningún resultado en esta fracción.

Se obtuvo entre el 8 y 13 % de recuperación de proteína en las fracciones por exclusión (Tabla 3-5). La fracción eluída a 29.38 min con mayor cantidad de proteína se repurifica por cromatografía HPLC-RP C4 usando 60 μg de proteína total, con el fin de observar que grado de pureza se pudo obtener en la separación por exclusión por HPLC (Figura 3-6).

Figura 3-6: Cromatograma de HPLC-RP C4 de la repurificación de fracciones SobEVT obtenidas por exclusión molecular HPLC



Línea roja, absorción a 220 nm y línea negra, absorción a 280nm.

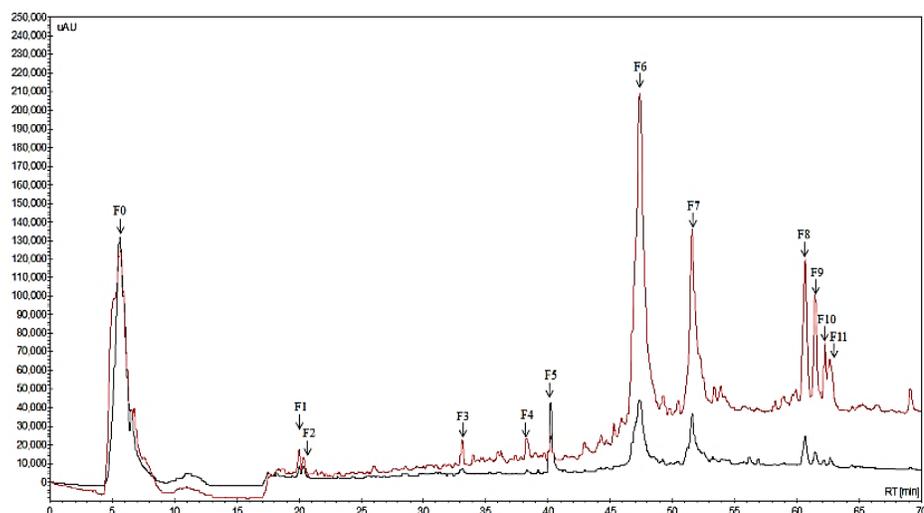
Se observa un número de señales que eluyen a 43 % hasta el 60 % de ACN-TFA 0.1 % (45 min- 65 min). Similar a lo observado cuando se purifica EV en la Figura 3-7 lo que indica que la purificación por exclusión molecular no fue tan efectiva como se esperaba. Por otro lado, no fue posible realizar más análisis de las fracciones obtenidas en el paso de repurificación pues la cantidad de proteína recuperada no fue mayor a 111 μg .

3.4.1.3. HPLC-RP C4

El SobEVT presentó mejor separación de los compuestos presentes, y por SDS-PAGE (Figura 3-8), se observa un amplio rango de proteínas que tienen carácter hidrofóbico ya que eluyeron con un mayor porcentaje de ACN (Figura 3-7).

En la separación de los componentes proteicos del veneno se obtuvo once fracciones, que eluyen entre 32 % y 54 % de ACN-TFA 0.1 %; probablemente hay proteínas más hidrofóbicas que en las fracciones F1 a F5 que eluyen a porcentajes menores de ACN-TFA 0.1 %.

Figura 3-7: Perfil cromatográfico de SobEVT por HPLC-RP C4



Las fracciones obtenidas se nombraron de F0 a F11, se secaron en SpeedVacum y fueron cuantificadas por NanoDrop. En rojo, absorbancia a 220 nm y en negro, absorbancia a 280 nm.

Tabla 3-6: Tiempos de retención y μg de proteína de las señales obtenidas de las fracciones provenientes de SobEVT del veneno de *P. volitans*

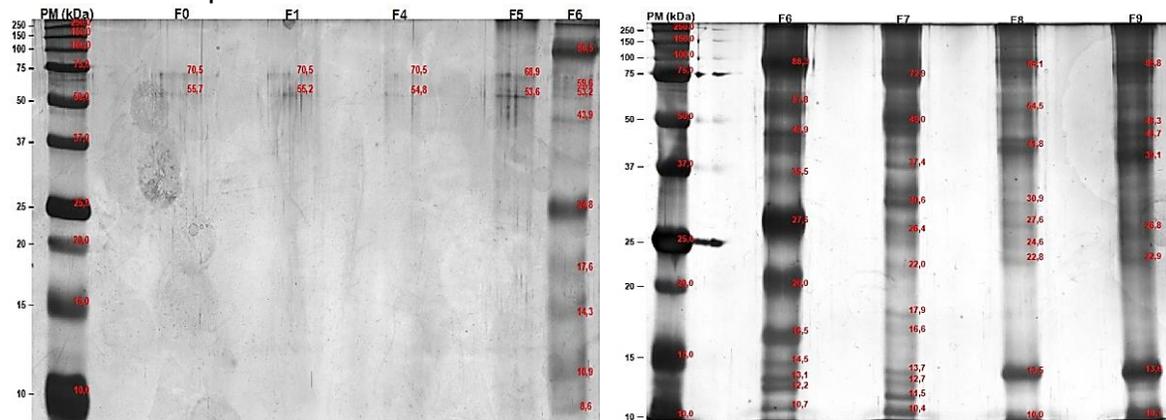
Fracción	T_R min	1mg/mL	Proteína μg	$2^{\text{recuperación}}$ %	3^{PM} kDa
1	20.0	0,26	13.0	3,3	70, 55
2	20.4	0,13	6.5	1,6	ND
3	33.1	0,13	6.5	1,6	ND
4	38.3	0,32	16.0	4,0	70, 55
5	40.2	0,25	12.5	3,1	70, 55
6	47.4	0,85	69.5	17,4	88, 58. 46, 35, 27,20, 16, 14, 13, 12, 10
7	51.6	1,39	42.5	10,6	73, 50 37, 30, 18, 14, 13, 12, 10
8	60.7	0,64	32.0	8,0	84, 54, 42, 31, 27, 24, 23, 13, 10
9	61.5	0,13	6.5	1,6	86, 48, 45, 39, 27, 23, 14, 10
10	62.3	0,22	11.0	2,8	ND
11	62.6	0,18	9.0	2,3	ND

$1^{\text{Volumen total de las fracciones}}$ 50 μL . $2^{\text{Porcentaje de recuperación de proteína a partir}}$ 300 μg de SobEVT. $3^{\text{Peso molecular calculado con los patrones de peso molecular en el gel de electroforesis}}$

(Figura 3-8). ND, No determinado debido a la poca proteína. Tabla a partir del análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

Como se observa en la anterior tabla, las fracciones que contienen la mayor cantidad de proteína (F6 a F9) presentan entre 8-12 bandas cada una, sin embargo, es de tener en cuenta que la electroforesis en (Figura 3-8) se realizó en condiciones reductoras, lo que implica la separación de proteínas que posean subunidades y por esto, se presenten numerosas bandas. En comparación con el número de bandas que se obtienen del EV en la Figura 2-6 y Figura 2-7.

Figura 3-8: SDS-PAGE de las fracciones obtenidas a partir de SobEVT del veneno de *P. volitans* por HPLC-RP C4



Por el método de Laemmli en gel del 12,5 % fracciones obtenidas por HPLC-RP C8. En cada uno de los carriles se sembraron 20 µg de proteína total. Condiciones denaturantes y reductoras. Tinción en plata. Análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

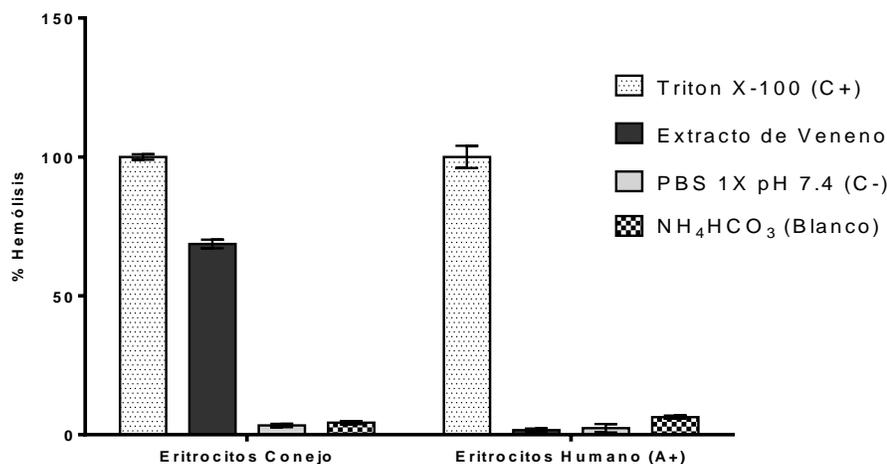
En las fracciones F0, F1, F4 y F5 se observan dos bandas de 70 y 55 kDa, a pesar de que la cantidad de proteína obtenida en la purificación por HPLC-RP C4 era poca (Tabla 3-6) y, en el caso particular de F0 que la cuantificación por NanoDrop no determinó proteína en ella. Esta última fracción quizás se muestra en el cromatograma (Figura 3-7) como una señal intensa debido a la presencia tanto de compuestos no proteicos que absorben a longitudes de 220 y 280 nm, como de proteínas que componen el veneno y eluyen fácilmente una vez empieza a aumentar el % de ACN.

3.4.2. Evaluación de la actividad de EV y las fracciones purificadas

3.4.2.1. Actividad hemolítica

Un parámetro que puede indicar la calidad de la extracción y si el EV permanece con actividad, es su capacidad de hemolizar de forma específica a los eritrocitos de conejo. En este ensayo, para identificar la actividad hemolítica del EV obtenido se usó Tritón X-100 como control positivo en la lisis celular, es decir, determina el 100 % de hemólisis. El control negativo de hemólisis se una PBS 1X pH 7.4 que mantiene la osmolaridad celular y pH fisiológico. Bicarbonato de amonio se usa como blanco ya que el veneno usado se encontraba disuelto en esta solución y demostrar que el solvente no afecta en la capacidad hemolítica de EV.

Figura 3-9: Actividad hemolítica del veneno frente a eritrocitos de conejo y humano tipo A+.



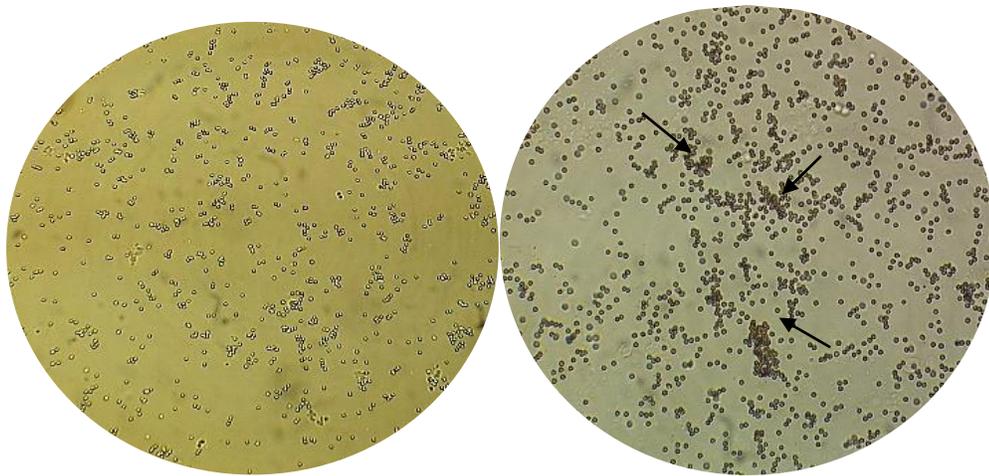
En una suspensión de eritrocitos al 2% en PBS 1X pH 7.4, se usa control positivo (C+), negativo (C-) de hemólisis y blanco 20 mM de bicarbonato de amonio (solución en que se encuentra disuelto el veneno). Los valores son la media \pm SD, n=3.

Usando 9,5 μ g de veneno se hemolizan el 69 % de los eritrocitos de conejo, mientras que, con eritrocitos de humano se obtiene solamente el 2 % de hemólisis; confirmando la actividad hemolítica dirigida específicamente a eritrocitos de conejo sin afectar los humanos y la presencia de una hemolisina activa en el EV obtenido (Figura 3-10).

3.4.2.2. Actividad aglutinante

Se realizaron estudios con el EV en eritrocitos humanos y de conejo, pero no se observó aglutinación en humano, y en conejo se presentaba hemólisis. Reportes de la literatura recomiendan la separación de los componentes líticos del veneno que pueden enmascarar la actividad aglutinante que pueda tener el veneno.

Figura 3-10: Eritroaglutinación de la fracción 3 resultante de la separación del veneno por exclusión molecular en columna abierta.



Ensayo de actividad aglutinante realizado con eritrocitos de conejo. Control negativo con PBS 1X pH 7.4, izquierda, con 9,5 µg de la fracción 3 de exclusión molecular (Figura3-3), derecha. Las flechas muestran algunos aglutinados (objetivo 10x).

Tabla 3-7: Ensayo de aglutinación con eritrocitos de conejo 2 %

Fracción	µg proteína	Aglutinación
1	82	0
2	26	H
3	9,5	+2

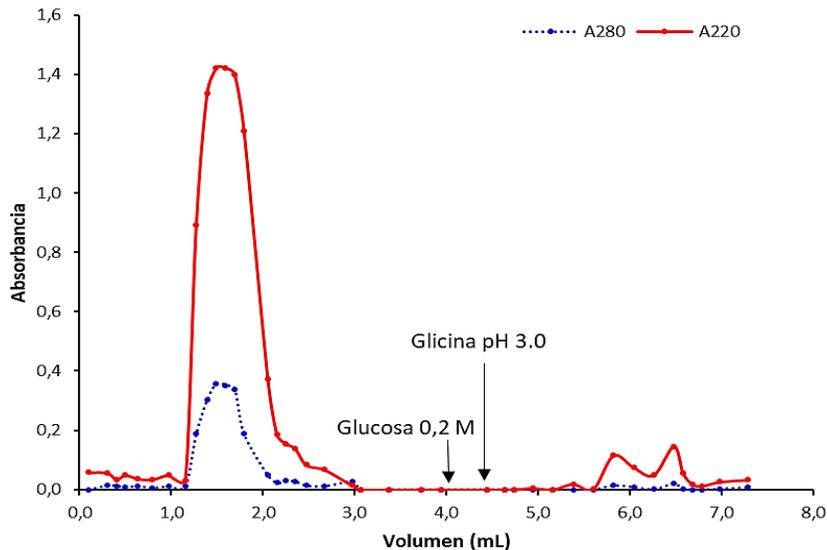
H, hemólisis. Escala cualitativa de aglutinación 0, donde no se presenta aglutinación y +4 aglutinación fuerte.

De la separación del veneno por cromatografía de exclusión en columna abierta se obtuvo tres fracciones (Figura 3-3), y con cada una se realizó prueba de aglutinación (Figura 3-10) con eritrocitos de conejo, determinando cualitativamente aglutinación +2 en la fracción 3 con 9,5 µg de proteína total. La fracción 2 produjo

hemólisis en los eritrocitos. Esto indica que la cromatografía de columna abierta con Sephadex G-75 permitió la separación del componente hemolítico y el aglutinante. Con estos resultados, y lo que se observa en la Figura 3-3 y Tabla 3-4 es probable que la hemólisis corresponda a una proteína de 43 kDa (Figura 3-3), ya que esta no se encuentra en F3 (que posee actividad aglutinante) ni en la F1, donde no se observa ninguna de las dos actividades evaluadas.

Al encontrar actividad en F3, se realizaron ensayos de purificación por cromatografía de afinidad, empleando columnas acopladas a manosa, teniendo en cuenta que algunas lectinas encontradas en venenos de peces son específicas por este carbohidrato (Tabla 3-3).

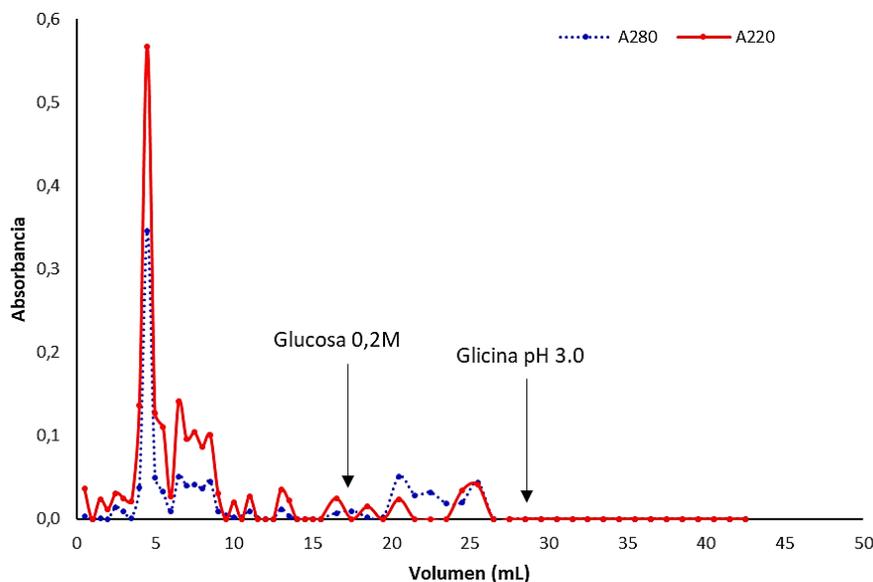
Figura 3-11: Cromatografía de afinidad en columna de Manosa-Agarosa con EV de *P. volitans*



Se ensayaron dos eluciones, primero con glucosa 0.2 M y segundo con buffer Glicina-HCl pH 3.0. La segunda solución permite observar la elución de dos fracciones en 5.9 y 6.5 mL. Sin embargo, al liofilizar las fracciones obtenidas y cuantificar por BCA no se detectó proteína, probablemente la cantidad de lectina en el EV es muy baja (<0.5 µg/mL); también es posible que reconozca ligandos con

una mayor cantidad de residuos de manosa o presente una afinidad diferente por otros residuos de carbohidratos.

Figura 3-12: Cromatografía de afinidad en columna de Sepharose-4B Man



En este procedimiento se observa que existe gran cantidad de compuestos no retenidos. Luego, cuando se realizó la elución de la fracción no retenida con glucosa 0.2 M se obtienen señales a baja intensidad, sin embargo, no fue posible determinar la cantidad de proteína por BCA.

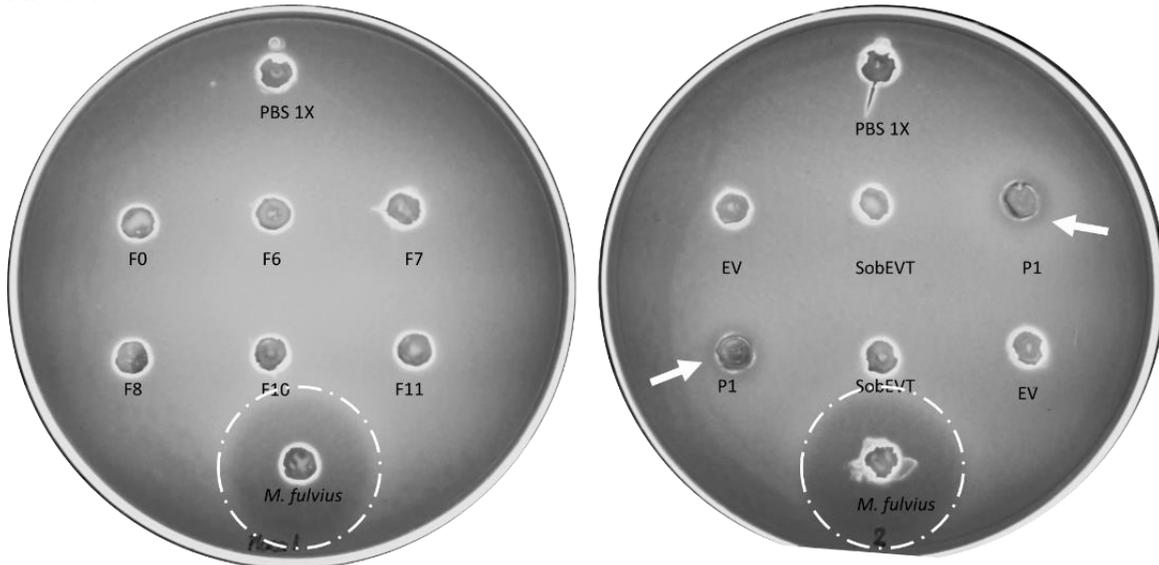
3.4.2.3. Actividad fosfolipasa

Ensayo cualitativo para identificar actividad fosfolipasa en el EV y fracciones purificadas por HPLC-RP C4. La actividad positiva de fosfolipasas de tipo A_2 se observa con la presencia de un halo traslúcido como lo hace la PLA_2 presente en el veneno de *M. fulvius* (Figura 3-13). Cuando se observan las cajas de petri no se identifican halos traslucidos en ninguno de los pozos, indicativo de la ausencia de PLA_2 en el veneno, sus tratamientos y fracciones purificadas.

A excepción de P1, en los demás tratamientos no se observa la formación de halo alrededor del pozo. El halo que produce P1 es turbio a diferencia del control positivo de PLA_2 que se mantiene totalmente traslucido. Según Habermann (134) la

formación de halos turbios es el resultado de la actividad de fosfolipasas tipo C, enzima que no se había identificado en el veneno de *P. volitans*.

Figura 3-13: Ensayo actividad de fosfolipasa de fracciones obtenidas por HPLC-RP C4



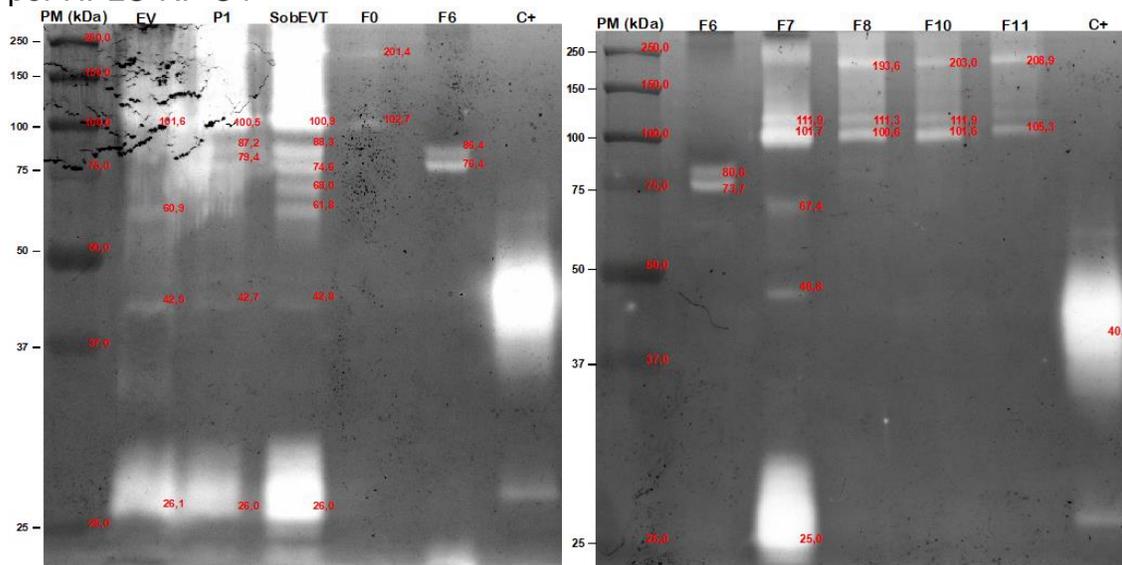
Yema de huevo co-polimerizada con agar - agar y rodamina 6G para la detección de actividad de fosfolipasa A₂. Control positivo de fosfolipasa (C+): veneno total de *Microrus fulvius* y 20 µg de proteína total de cada una de las fracciones. Con flechas se indica actividad positiva en P1 (pellet resultado del tratamiento con ACN-TFA descrito en 3.3.2.3). F5, F6, F7, F8, F10 y F11 son las fracciones obtenidas en 3.4.1.3. SobEVT corresponde al sobrenadante descrito en 3.3.2.3. Círculos punteados indican el halo formado por la acción de fosfolipasa.

3.4.2.4. Actividad de proteasas gelatinolíticas

En los zimogramas se aprecia que EV y sus fracciones purificadas tienen actividad gelatinolítica con un amplio rango de proteínas con pesos moleculares entre 26-200 kDa.

En la Figura 3-14, se observa la actividad de proteasas en un amplio número de bandas que van de 200 hasta 26 kDa (Tabla 3-8), sin embargo, el EV después de ser tratado con ACN-TFA 0,1 %:TFA 0.1% 50:50 y usar el sobrenadante (SobEVT ver 3.3.2.3) se observa actividad proteolítica de 2 proteínas diferentes de 80 y 73 kDa (Tabla 3-8); estas no se observan en EV (Figura 3-14 y Tabla 3-8).

Figura 3-14: Zimograma de proteasas gelatinolíticas de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4



Por el método de Laemmli en gel del 10 % co-polimerizado con gelatina 1,4 mg/mL. Control positivo de proteasa gelatinolítica (C+): veneno total de *Bothrops asper* y 5 µg de proteína total de cada una de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4. P1 (pellet resultado del tratamiento con ACN-TFA descrito en 3.3.2.3). F5, F6, F7, F8, F10 y F11 son las fracciones obtenidas en 3.4.1.3. SobEVT corresponde al sobrenadante descrito en 3.3.2.3. Análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

Tabla 3-8: Masa molecular de las proteasas de las fracciones de SobEVT purificadas por HPLC-RP C4

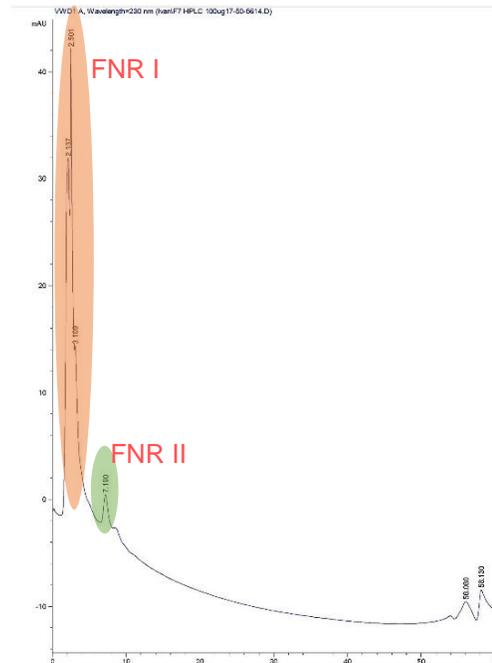
kDa Proteasas	EV	P1	SobEVT	F0	F6	F7	F8	F10	F11
200	-	-	++	+/-	-	+	+	+	+
100, 111	+/-	+	++	+/-	-	+	+	+	+
80, 73	-	-	+	-	+	-	-	-	-
60	+/-	-	+	-	-	+/-	-	-	-
45	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
26	+	+	++	-	-	++	-	-	-

+/- Actividad débil, + presencia de actividad, ++ actividad intensa, - No se observa actividad. SobEVT corresponde al sobrenadante descrito en 3.3.2.3. P1 (pellet resultado del tratamiento con ACN-TFA descrito en 3.3.2.3. Bandas se analizaron con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad

Estudios previos reportaron una proteasa de 19 kDa presente en el veneno del pez león (101); sin embargo, los resultados muestran una banda alrededor de 26 kDa con alta actividad gelatinolítica. Además de bandas de alto peso molecular, que probablemente son formas de la enzima multimérica, donde sus subunidades están en equilibrio. Para aislar la forma de 26 kDa, se hicieron ensayos por cromatografía

de intercambio aniónico sobre DEAE por HPLC, con la F7 y posterior purificación por HPLC-RP C4

Figura 3-15: Cromatografía de F7 de *P. volitans* por intercambio aniónico DEAE HPLC.



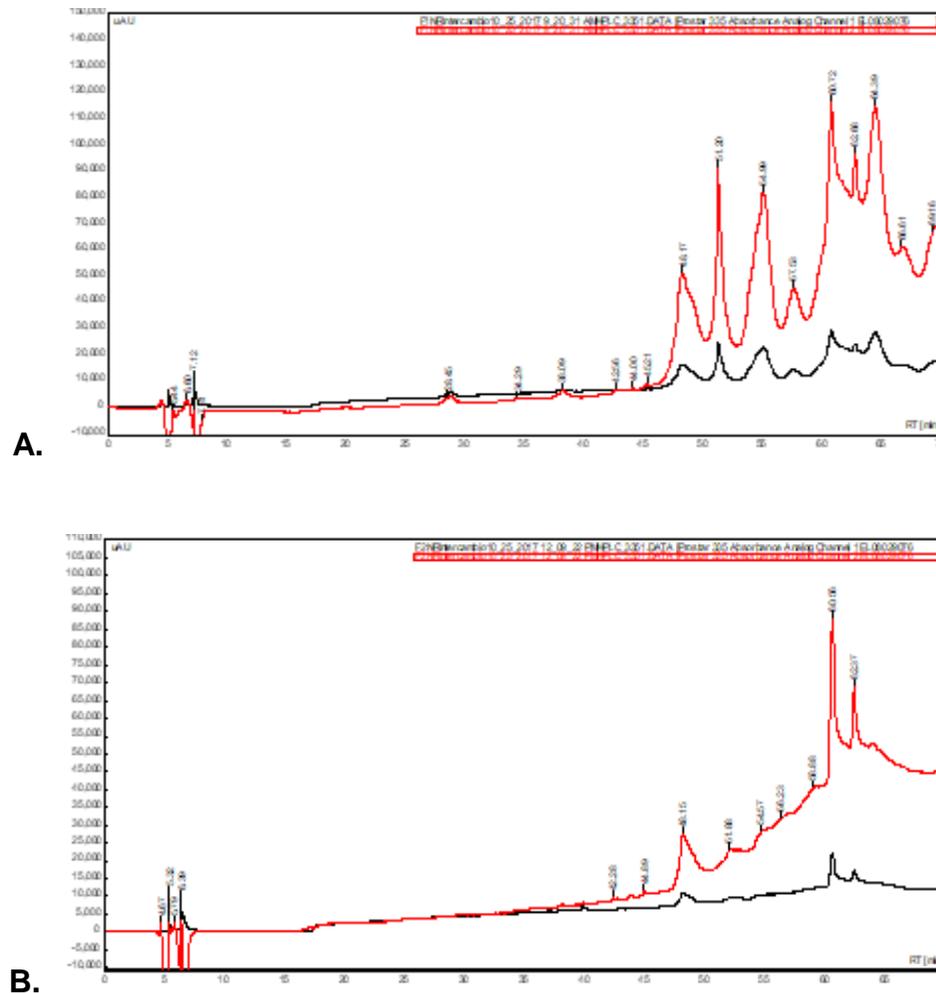
Purificación de la fracción F7 que contiene la proteasa, se obtuvo cuatro fracciones con tiempos de retención 2.1, 2.5, 3.1 (Rojo FNRI), 7.2 minutos (Verde FNRII).

Se hizo un “pool” con las fracciones no retenidas (2.1, 2.5 y 3.1 FNRI), y fueron cuantificadas por NanoDrop; 150 µg de proteína total se usaron para la purificación en HPLC-RP C4. Con la fracción 7.2 (FNRII) se obtuvo 50 µg de proteína para ser repurificada. Por otro lado, la purificación por DEAE muestra alta intensidad de la señal de las primeras tres fracciones y baja de la fracción FNRII, esto puede estar relacionado con la baja cantidad de proteína que se usó para este paso de purificación.

El perfil cromatográfico obtenido muestra que las fracciones son similares, en ambas FNRI y FNRII tienen tiempos de retención en 48, 51, 54, 60 y 62 minutos, sin embargo, se diferencian sólo en 2 señales que tiene el cromatograma de la fracción FNRII con tiempos de retención de 56 y 58 minutos a intensidades muy bajas, mientras tanto FNRI tiene 4 señales a 57, 64, 66 y 69 minutos con picos

definidos. A pesar de esto no fue posible la cuantificación de las fracciones individuales al tener bajas cantidades de proteína, por el método de BCA, siendo posible que la concentración de proteína en las fracciones fuera menor a 0.5 µg/mL.

Figura 3-16: Cromatograma de HPLC-RP C4 de la repurificación de las fracciones de F7 obtenidas por intercambio aniónico HPLC.



A. Repurificación del pool hecho con la fracción FNRI de intercambio aniónico DEAE. **B.** repurificación de la fracción FNRII de intercambio aniónico DEAE. HPLC-RP C4. Línea roja lectura a 220 nm y negra lectura a 280 nm.

Los perfiles cromatográficos muestran que existe una gran cantidad de señales que corresponderían a varias proteínas diferentes. Con base en lo que se observó con estos métodos combinados para la separación de la proteasa, es necesario

plantear otros métodos de purificación que permitan obtener mayores cantidades de proteína y mejor separación.

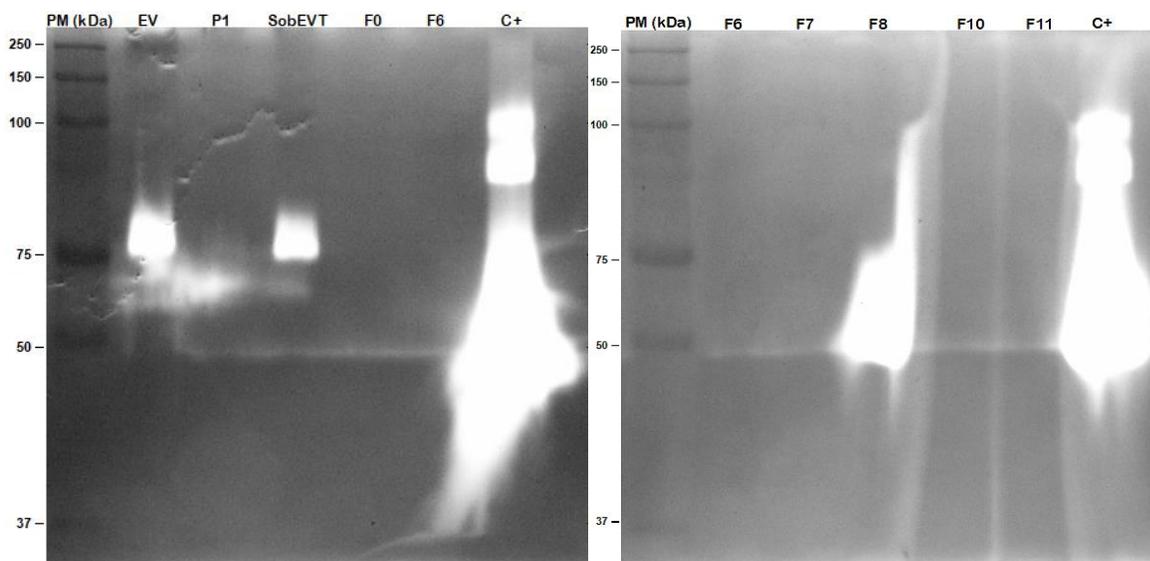
Tabla 3-9: Proteína total de las fracciones repurificadas por HPLC-RP C4 de FNRI y FNRII

Fracción de intercambio aniónico DEAE	Fracciones obtenidas (min)	¹ mg/mL	µg Proteína total
FNRI	48.17	0,26	13,0
	51.20	0,23	11,5
	54.98	0,64	32,0
	57.5	0,12	6,0
	60.7	0,28	14,0
	62.6	0,12	1,5
FNRII	48.1	0,03	6,0
	60.5	0,18	7,5
	62.3	0,02	3,5
	64.4	0,15	9,0
	69.4	0,07	1,0

Las fracciones corresponden a aquellas que pudieron ser cuantificadas por NanoDrop, consecuencia de la cantidad de proteína en la muestra. ¹Volumen total de las fracciones 50 µL.

3.4.2.5. Actividad de hialuronidasa

Figura 3-17: Zimograma de hialuronidasa de las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4



Por el método de Laemmli en gel del 10 % co-polimerizado con ácido hialurónico 0,5 mg/mL. Control positivo de hialuronidasa (C+): veneno total de *Brachipelma vagans* y 6 µg de proteína total de c

ada una de las fracciones. SobEVT corresponde al sobrenadante descrito en 3.3.2.3. y P1 (pellet resultado del tratamiento con ACN-TFA descrito en 3.3.2.3). F5, F6, F7, F8, F10 y F11 son las fracciones obtenidas en 3.4.1.3. Análisis de pesos moleculares del gel con Quantity One 4.6.7 e Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

Otro factor que permite identificar la integridad del veneno y la calidad de su extracción es la presencia de enzimas características en el veneno, en este caso hialuronidasa. Como se describió en este capítulo, el veneno de *P. volitans* contiene hialuronidasa con peso molecular de 55,5 kDa según Saénz (2017) y Kiriake (2014). Por lo tanto, se optó por realizar un Zimograma (Figura 3-17) que permitiera identificar la actividad y el peso molecular de las proteínas que realizaban la hidrólisis del ácido hialurónico, observándose en el gel bandas no teñidas.

En la Figura 3-17 se observa que EV posee una marcada actividad, al igual que SobEVT, en P1 no se observa actividad, lo que significa que la hialuronidasa es obtenida completamente en las proteínas que se solubilizaron al tratar el EV con ACN-TFA 50%. Además, es posible separar HAasa con 55.5 % de ACN-TFA 0.1 % como se observa en la fracción F8 (Figura 3-7 y Figura 3-17). La actividad de la HAasa es mayor que lo observado en EV, ya que se encuentra parcialmente pura, al sembrar en el gel una muestra donde la proteína estaría en mayor proporción respecto a la que se presenta en EV con otros componentes proteicos.

3.4.2.6. Actividad de EV y fracciones purificadas *in vitro* e *in vivo*

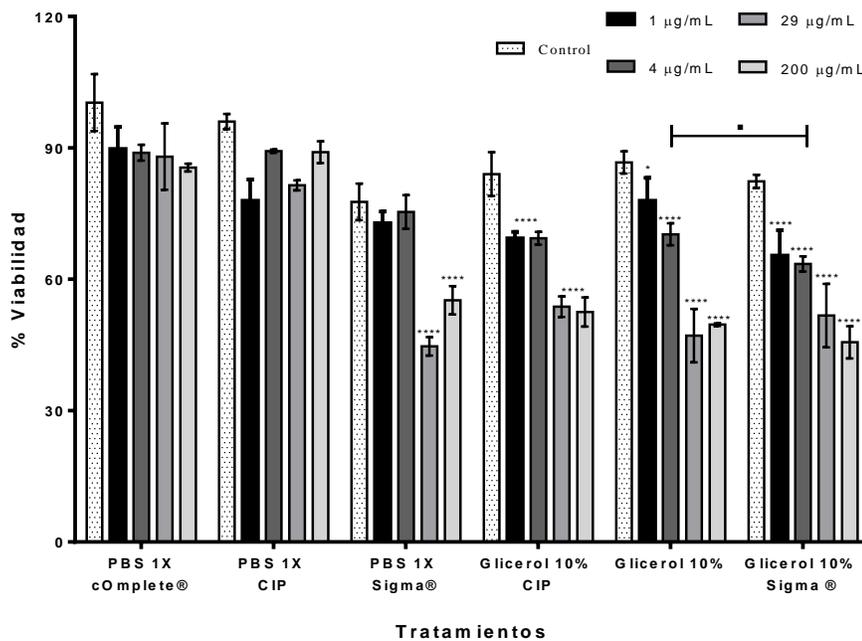
3.4.2.6.1. Citotoxicidad

Con el propósito de evaluar actividad citotóxica de cada uno de los extractos obtenidos (EV) por las diferentes líneas celulares; inicialmente, se evaluó la actividad con la línea HTR-8.

El veneno (EV) obtenido con diferentes soluciones de extracción e inhibidores sobre la línea celular HTR8, presentó una baja actividad citotóxica con los extractos

de proteínas obtenidos con PBS 1 X con inhibidores (CIP) y marca complete®. A 200 µg/mL, el EV preparado con PBS 1X conteniendo inhibidores Sigma® tiene un porcentaje de viabilidad del 45 % ($p \leq 0.0001$), y no se encontró una tendencia dosis dependiente (Figura 3-18).

Figura 3-18: Porcentaje de viabilidad de células HTR8 tratadas con EV obtenido por diferentes métodos de extracción.



Ensayo de citotoxicidad con células HTR8 y EV a diferentes concentraciones con el ensayo de MTT a las 24 horas de aplicado el tratamiento. Los valores son la media \pm DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de dos factores y posterior prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Se usó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre tratamientos donde * $p \leq 0.05$.

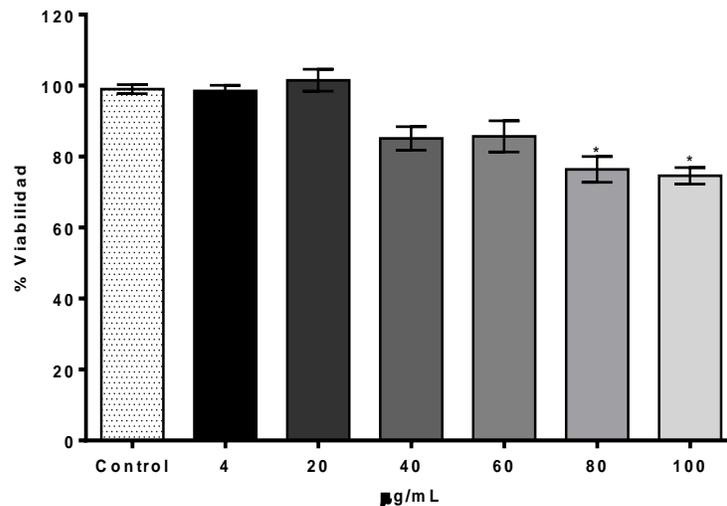
Por otro lado, el veneno extraído con glicerol 10 % y suplementado con diferentes inhibidores de proteasas (Sigma®, cOplete® y CIP) exhibió una respuesta citotóxica dosis dependiente marcada, especialmente con el coctel de inhibidores marca Sigma®; aunque, los controles de estos tratamientos mostraron que los inhibidores de proteasas disminuyen la viabilidad celular; los controles de PBS 1X Sigma® y Glicerol al 10 % presentaron una diferencia pequeña ($p \leq 0.05$) respecto a las células sin ningún tratamiento, y una diferencia significativa media ($p \leq 0.01$)

usando glicerol 10 % con inhibidores Sigma® contra células no tratadas, siendo tóxico en el 18 % de la población (Figura 3-18).

Con base en este resultado y lo discutido en el capítulo 2 se selecciona como método de extracción el descrito por Church en 2002. Con el veneno extraído por este método se realiza los experimentos para identificar actividad citotóxica a líneas celulares cancerígenas.

Cuando se trataron las células HeLa con EV (Glicerol 10 %), la población celular disminuyó el 25 % con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($*p \leq 0.05$), y a concentraciones menores de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el EV no tuvo efecto significativo (Figura 3-19).

Figura 3-19: Porcentaje de viabilidad en células HeLa tratadas con EV

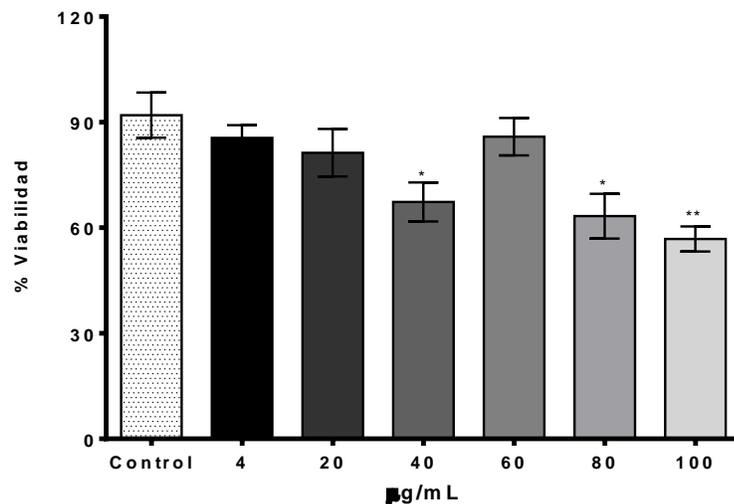


Ensayo de citotoxicidad con células HeLa y diferentes concentraciones EV. Los valores son la media \pm DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Dunnett para comparaciones múltiples, $*p \leq 0.05$.

Las células HT-29 mostraron una respuesta dependiente de la concentración de EV significativa para 40, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ afectando al 33, 37 y 44 % de la población celular ($p \leq 0.05$, 0.01). A 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó el aumento de la viabilidad a 85 %, probablemente, por consideraciones experimentales (Figura 3-20).

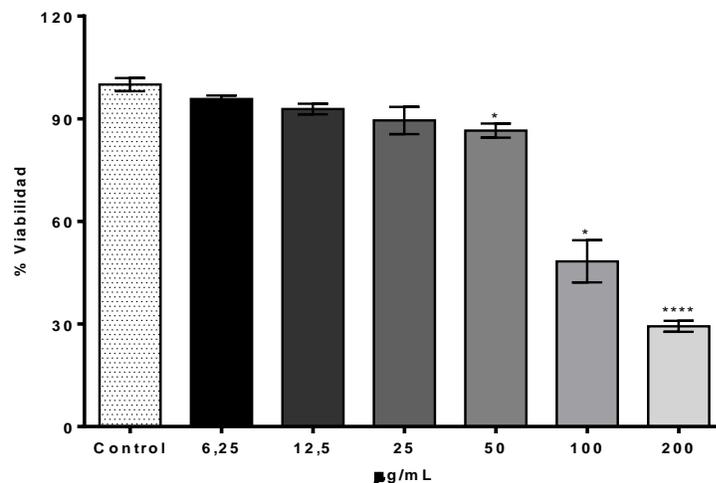
El EV es citotóxico en células tumorales de mama a 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.0001$), siendo citotóxico para el 52 y 71 % de las células a estas dos últimas concentraciones con efecto marcado desde 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3-21).

Figura 3-20: Porcentaje de viabilidad en células HT-29 tratadas con EV



Ensayo de citotoxicidad con células HT-29 y EV a diferentes concentraciones con el ensayo de MTT. Los valores son la media \pm DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Dunnett para comparaciones múltiples, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

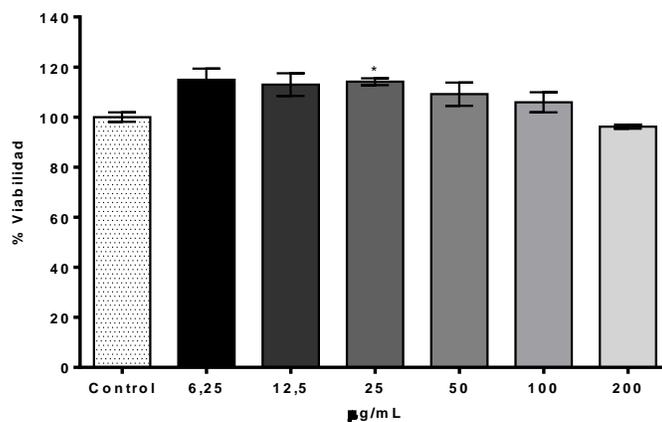
Figura 3-21: Porcentaje de viabilidad en células HBT26 tratadas con EV



Ensayo de citotoxicidad con células HBT26 y EV a partir del método de MTT a las 24 horas de aplicado el tratamiento. Los valores son la media \pm DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Dunnett para comparaciones múltiples, * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$.

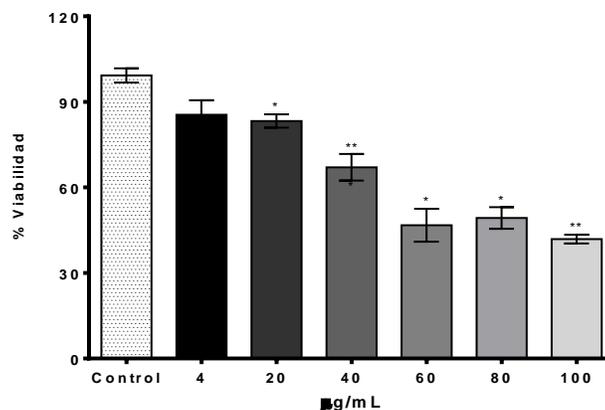
EV no tiene ningún efecto citotóxico a la línea PC3, por el contrario, se observa que la viabilidad celular aumenta desde 6,5 µg/mL hasta 100 µg/mL. Sin embargo, la única concentración que es estadísticamente significativa diferente al control es 25 µg/mL de EV. A esta concentración podría que se esté estimulando la división celular en este tipo de cáncer (Figura 3-22).

Figura 3-22: Porcentaje de viabilidad en células PC3 tratadas con veneno de *P. volitans*.



Ensayo de citotoxicidad con células PC3 y EV a partir del método de MTT a las 24 horas de aplicado el tratamiento. Los valores son la media ± DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Dunnett para comparaciones múltiples, *p≤0.05.

Figura 3-23: Porcentaje de viabilidad en cultivo primario de neuronas hipocampales de rata tratadas con EV.



Ensayo de citotoxicidad con cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar y EV a partir del método de MTT a las 24 horas de aplicado el tratamiento. Los valores son la media ± DS. La

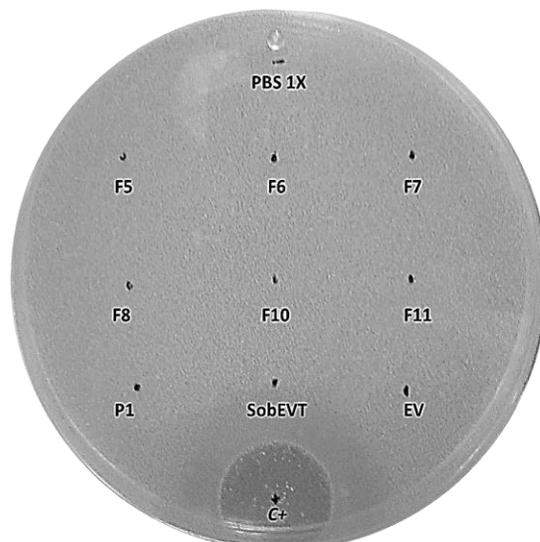
diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Dunnett para comparaciones múltiples, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

La viabilidad de las neuronas hipocampales de rata disminuye de forma marcada en 16, 33, 54, 59 % con concentraciones crecientes del veneno de *P. volitans* a 20, 40, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). Respecto a las demás líneas celulares se observa que el EV posee componentes tóxicos con alta especificidad a células neuronales. Sin embargo, esto puede ser efecto también del trabajo sinérgico de diferentes compuestos proteicos y no proteicos, que potencian la actividad neurotóxica (Figura 3-23).

3.4.2.6.2. Antimicrobiano en *Staphylococcus aureus*

La determinación de la actividad antibacteriana fue negativa para EV y las fracciones provenientes de HPLC-RP C4 (Figura 3-24); si hay propiedades bactericidas, probablemente se encuentren en una baja cantidad para observar de forma macroscópica el efecto o definitivamente el veneno y sus fracciones no tienen este tipo de actividad contra la cepa evaluada.

Figura 3-24: Actividad antibacteriana de EV y las fracciones purificadas frente a *S. aureus*



Agar Müller-Hinton co-polimerizado con *S. aureus* concentración final de 5×10^6 UFC/mL. C- PBS 1X, C+ 1 μL de ampicilina 1X; Las fracciones obtenidas por HPLC-RP C4 F5, F6, F7, F8, F10, F11 y P1, SobEV, EV. Se sembraron 10 μg de proteína de cada muestra.

3.4.2.6.3. Actividad insecticida en *Acheta domesticus*

El experimento se realiza con el fin de identificar actividad insecticida del EV y fracciones purificadas por HPLC. El ensayo consiste en inyectar vía intraperitoneal el veneno del pez león y las fracciones que se han obtenido por HPLC-RP C4 y observar por 24 comportamientos anormales como convulsiones, parálisis, actividad intensa y muerte. Este insecto se usa por su facilidad de obtención y crianza, además por ser una especie que se encuentra comúnmente en el hábitat de los seres humanos en regiones templadas. El EV y las fracciones F6, F7 F8 obtenidas por HPLC-RP C4 no presentaron efecto insecticida en grillos de la especie *A. domesticus* (Tabla 3-10).

Tabla 3-10: Cantidad de proteína inyectada a los grillos *A. domesticus*

EV		H ₂ O MiliQ		Fracción 6		Fracción 7		Fracción 8	
grillo (mg)	Proteína (µg)	grillo (mg)	grillo (mg)	Proteína (µg)	grillo (mg)	Proteína (µg)	grillo (mg)	Proteína (µg)	
125,4	2,50	141,3	174,3	3,48	146,4	2,93	128,3	2,56	
130,2	2,59	154,6	155,8	3,11	140,5	2,81	123,5	2,47	
128,4	2,56	137,4	160,2	3,20	150,6	3,01	127,3	2,55	

No se observó comportamiento anormal en ninguno de los grillos inoculados

Los grillos fueron inyectados con las fracciones y como control negativo H₂O MiliQ. Se observaron durante 24 horas.

3.4.2.6.4. Mamíferos, ratas Wistar

El EV no tuvo efecto letal en las ratas inclusive suministrando dosis más alta (69,2 µg) de la LD₅₀ intraperitoneal (42.5 µg/kg) reportada en estudios anteriores (50,92,108); posiblemente por la liofilización hecha, el factor letal presente en el veneno se inactivó. Sin embargo, un efecto tóxico muy leve se pudo ver en las fracciones F6 y F7, donde se evidenció parálisis leve en las patas traseras e inactividad por periodos cortos de tiempo respecto a las ratas sin inocular o inoculadas con PBS 1X pH 7.4 (Tabla 3-11).

Tabla 3-11: Toxicidad del veneno de *P. volitans*, y sus fracciones de HPLC-RP C4 en ratas Wistar

Muestra	Toxicidad	Observaciones
-	-	
(C-)	-	Comportamiento normal
EV	-	
F6	+	Arrastra las patas traseras ~10 min y se recupera
F7	++	Arrastra las patas, piloerección, movimientos pausados ~10 min y periodos de inactividad
F8	-	
F9	-	
F10	-	Comportamiento normal
F11	-	

C- Control negativo PBS 1X pH 7.4, - No hay toxicidad, + se presenta 1 comportamiento distinto al normal, ++ Se observan comportamientos diferentes al normal. Se inyectó 69,2 µg de proteína de EV. De las fracciones se inyectó 30 µg de proteína. Las inyecciones se realizaron de forma intracraneal. Por triplicado.

3.4.2.6.5. Peces *Danio rerio*

Este estudio se llevó a cabo con peces cebrá, ya que por su tamaño no es necesario el uso de altas cantidades de proteína comparado con el modelo de ratón. Este organismo también está en un ambiente acuático, por lo que teóricamente lo haría más susceptible a los venenos de especies marinas.

Tabla 3-12: Toxicidad del EV y sus fracciones en peces *Danio rerio*

Muestra	Toxicidad	Observaciones
-	-	
(C-)	-	Comportamiento normal, nado continuo
EV	Letal	Nada despacio, se queda inmóvil y las agallas se mueven rápidamente. Muere ~5 min
F6	Letal	Nada y se detiene repetidamente, después de un tiempo se ladea, convulsiona y muere ~10 min
F7	Letal	Nada rápidamente, se queda inmóvil y muere ~15 min
F8	+	Queda inmóvil y reacciona sucesivamente
F9	Letal	Queda inmóvil ~5 min y se recupera, nada rápidamente y a ~30 min convulsiona y muere

C- Control negativo H₂O MiliQ, - No hay toxicidad, +: se presentan comportamientos distintos al normal.

El EV liofilizado y soluble fue letal en los peces, al igual que las fracciones evaluadas; se observó parálisis, convulsiones, nado anormal y la muerte. Los compuestos con actividad letal fueron estables al proceso de liofilización y temperatura (Tabla 3-12).

3.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La separación de los componentes del veneno por exclusión por tamaño fue más conveniente por columna abierta, a pesar de que se obtenía mejor separación de los componentes proteicos por HPLC. La cromatografía de exclusión por columna abierta permitió obtener entre 33 % y 6 % de recuperación de proteína total (Tabla 3-4) permitiendo usar cantidades suficientes para observar el perfil proteico (Figura 3-4) y la identificación de actividad aglutinante.

La búsqueda de proteínas que reconozcan carbohidratos (lectinas) en los venenos provenientes de peces es poca hasta la fecha (46,52,54,55,58). Pero se ha observado que representan un componente importante dentro de la acción de los venenos, en especial entre las serpientes. Por ejemplo, las lectinas tipo-C se presentan en el 2 % de los elápidos, y 100 % en el veneno de vipéridos; componiendo el 22 % del veneno de *Daboisa russellii* y 80 % en el género *crotalus*, siendo *Bothrops insularis* quien posee la mayor cantidad de lectina tipo-C en su veneno con 31 % (135).

El reconocimiento específico de carbohidratos permite que tengan un amplio rango de acción biológico (mitogénicos, citotóxicas, insecticidas, antimicrobianas, interacciones célula-matriz extracelular) y sean blanco en la investigación farmacológica. En el veneno de *P. volitans* hasta el momento no se había detectado actividad aglutinante; sin embargo, fue necesario realizar una purificación previa para eliminar hemolisinas. En la fracción 3 obtenida por cromatografía de exclusión molecular (Figura 3-3), se detectó actividad aglutinante débil con eritrocitos de conejo al 2%, y por SDS PAGE se observan bandas en 45,

33 y 10 kDa. En venenos de peces se han identificado algunas lectinas de bajo peso molecular, dentro del género Scorpaeniforme, al cual pertenece el pez león, como isolectinas tipo-C entre 16 y 17 kDa (55), la Plumieribetina con 15 kDa (54) en el veneno de *S. plumieri* y en *S. verrucosa* de 45 kDa. En otros peces venenosos como *I. japonicus* y *T. nattereri* se encontraron con pesos moleculares de 97 kDa (subunidades de 75 y 30 kDa) y 15 kDa respectivamente. En estos reportes se ha realizado la purificación de las lectinas por métodos cromatográficos que van desde la filtración en gel, HPLC-RP, intercambio catiónico hasta cromatografía de afinidad.

En este trabajo, el método de separación que permitió identificar la actividad aglutinante fue la cromatografía de exclusión por tamaño, que además separó el componente hemolítico (Figura 3-3). También se realizaron ensayos de purificación para obtener la lectina pura por medio de cromatografía de afinidad; sin embargo, no pudo ser determinada la cantidad de proteína en las fracciones retenidas por la baja cantidad de proteína, seguramente por debajo de 0,5 µg/mL que es el límite de detección de cuantificación por BCA (Figura 3-11 y Figura 3-12). Lo anterior indica que el veneno del *P. volitans* presenta una lectina que reconoce carbohidratos como manosa, al igual que la Plumieribetina presente en el veneno de *S. plumieri* (54); no obstante, se deben realizar estudios de inhibición para determinar su especificidad y realizar otros ensayos de purificación por afinidad con mayor cantidad de proteína.

Los ensayos preliminares de purificación del EV por HPLC-RP, mostraron que una parte de los componentes del extracto eran retenidos por la columna C18 y que solo se podían eluir con lavados de ACN 100 %, por lo tanto, se optó por realizar la separación por intercambio aniónico (Anexo F), pero no se obtuvo separación. De acuerdo con lo anterior, se decidió realizar nuevamente HPLC-RP, pero con una columna C4, siendo menos hidrofóbica por tener grupos alifáticos más cortos que permiten que la separación sea mejor respecto a compuestos muy retenidos en columnas C18 y efectivamente, la separación de los componentes proteicos del

veneno fue mejor (Figura 3-7). Los rendimientos luego de los diferentes procesos de purificación por HPLC-RP C4 fueron bajos, entre 1,3 % a 13,9 % (Tabla 3-6), aunque fue el método que permitió tener una mejor separación de los componentes del veneno. La separación por SDS-PAGE, de las fracciones F0, F1, F4 y F5 únicamente mostraron dos bandas tenues de 50 y 70 kDa; pero en las fracciones F6, F7, F8 y F9 se observaron numerosas bandas que están en un rango de 75 - 10 kDa. Sin embargo, las fracciones F8 y F9 exhiben menor número de bandas, probablemente proteínas con carácter más hidrofóbico. Ambas fracciones presentaron una banda intensa alrededor de 15 kDa, y dos en 75 y 40 kDa.

Teniendo en cuenta lo anterior, es claro que el número de bandas en cada una de las fracciones corresponde a una gran cantidad de proteínas que derivan de una mezcla compleja, como es el extracto de veneno de *P. volitans*. Además, es de considerar que la extracción del veneno se realiza con la cubierta tegumentaria que recubre las espinas del aparato venenoso, de modo que todos los componentes proteicos de tejido y glándulas se encuentren en el extracto. El perfil proteico del veneno de animales marinos se ha caracterizado por tener numerosos compuestos tóxicos y variados pesos moleculares, como ejemplo, en peces venenosos hasta la fecha se han identificado 35 toxinas (Tabla 1-1) y esto se debe a que el veneno de peces y otros organismos venenosos marinos se caracterizan por ser una combinación de compuestos proteicos y peptídicos de alto y bajo peso molecular respectivamente. Por ejemplo, se tiene que el veneno de *S. plumieri* contiene proteínas de 6- 120 kDa (136), *S. argus* de 7 – 250 kDa (99) *P. russelli* con un rango de 6 -250 kDa (51) y *Chrysaora sp.* de 6 – 250 kDa (137). Adicionalmente, los resultados expuestos son consistentes y apoyan lo reportado anteriormente respecto a la composición proteica del veneno de *P. volitans* (14,17,82,92,96,112).

Una de las principales características de los venenos, es la capacidad de causar hemólisis en eritrocitos; efecto que se ha identificado en peces venenosos que contienen toxinas proteicas como la VTX de 322 kDa de (44) y la neoVTX (45) de *S. verrucosa*, la SNTX de *S. horrida* de 148 kDa que lisa eritrocitos de rata, perro,

conejillo de indias y conejo, pero no de humano (16); Sp-CTx de *S. plumieri* con una masa molecular de 121 kDa que presenta actividad hemolítica (53), *I. japonicus*, *P. lunulata*, *P. antennata*, *D. zebra* y *P. volitans* tienen actividad hemolítica en eritrocitos de vaca, caballo, cabra, conejillo de indias, gallina y actividad muy fuerte en eritrocitos de conejo (95). El mecanismo de acción reportado para las hemolisinas es a través de la formación de poros catiónicos de 3.2 nm en las membranas de los eritrocitos (138,139). Este tipo de actividad fue confirmada en EV contra eritrocitos de conejo con 9,5 µg de proteína total hemolizando cerca del 70 % de los eritrocitos y manteniendo el 98 % de integridad en los eritrocitos humanos, esto concuerda con la actividad hemolítica reportada para *P. volitans* (95,96,106,107) siendo consistentes los resultados de este trabajo con los reportes previos de hemólisis y demostrando que el EV es activo. Además fue posible la separación del componente hemolítico del veneno (Figura 3-3, Figura 3-4, Figura 3-10 y Tabla 3-4) cuando se prueba la actividad de las fracciones obtenidas por exclusión molecular en columna abierta en eritrocitos de conejo. La fracción 2 produce la hemólisis y a partir del perfil de pesos moleculares encontrados en esta fracción, la banda que la diferencia de las demás fracciones es una de 43 kDa, la cual probablemente podría ser el componente hemolítico del veneno. Sin embargo, esto debe ser confirmado con posteriores experimentos.

Se han realizado estudios enzimáticos en la caracterización del veneno de *P. volitans* en los que se analiza la actividad de proteasas en sustratos como gelatina y caseína, actividad de hialuronidasa y la búsqueda de fosfolipasas. Referente a la actividad proteolítica en el veneno, los zimogramas de la Figura 3-14, mostraron bandas de proteasas de 200, 111, 100, 80, 73, 60, 45 y 26 kDa (Tabla 3-8), sin embargo Balasubashini solo observó una proteasa de 45 kDa (108). Por otro lado, Manso identificó dos proteasas de 40 y 60 kDa cada una (96), lo que corresponde con lo reportado por Balasubashini y el presente trabajo. Recientemente, Aránzazu realizó la caracterización proteolítica del veneno usando gelatina e identificó, al igual que este estudio, proteasas de alto y bajo peso molecular (107), no obstante, la proteasa de bajo peso molecular fue de 19 kDa. Lo anterior demuestra que el

perfil proteico y proteolítico del veneno del pez león puede variar dependiendo de la localización geográfica en que este habita y, además, es factible que la actividad proteasa a altos pesos moleculares (Figura 3-14) sea el producto de formas multiméricas que se forman a partir del monómero de 26 kDa.

Entre las proteasas identificadas hasta la fecha, la que contiene el veneno de *S. plumieri* de 80 kDa nombrada Sp-GP fue purificada por 3 métodos cromatográficos combinados (filtración en gel sobre Sephacryl S-200, intercambio aniónico DEAE-celulosa y HPLC-RP en columna C4). Esta proteasa corresponde el 2 % del veneno crudo y su actividad optima es a pH 7-8 (140). En este trabajo se realizaron 3 pasos cromatográficos similares, RP-HPLC C4/intercambio aniónico DEAE/ HPLC-RP C4 (Figura 3-7, Figura 3-15 y Figura 3-16) para la purificación de la proteasa de bajo peso molecular eluída en la F7 de la separación del veneno por HPLC-RP C4, sin embargo, la separación no fue eficiente, por el número de señales y la poca proteína obtenida en la última purificación.

Las hialuronidasas son un componente importante en los venenos animales, pues estas permiten la difusión de los demás componentes tóxicos del veneno al degradar el ácido hialurónico presente en la matriz extracelular de los tejidos alterando así las propiedades químicas y estructurales de la matriz (141). El primer reporte de hialuronidasa en animales venenosos fue realizado Singer (1950) (142) en el veneno de *Agkistrodon piscivorus*, desde entonces los reportes de hialuronidasas en venenos animales, especialmente de serpientes, son numerosos. Pero esto no se aplica para los venenos provenientes de peces, pues es muy limitada por la dificultad de obtener y manipular el veneno sin que este pierda actividad (112). El pez *Potamotrygon motoro* preserva en su veneno una hialuronidasa de 79 kDa con actividad óptima a pH 4.2 (143), la mantarraya *Potamotrygon* de 79 kDa con actividad óptima a pH 4.2 (24,144) y los peces piedra contienen proteínas que degradan HA con masas moleculares de 62 kDa para *S. horrida*, 59 kDa en *S. verrucosa* (16,112,145,146). Mientras que el pez león *P. volitans* y *P. antennata* tienen una HAasa de 55,5 kDa según Kiriake (107,112).

Estos reportes no corresponden con lo observado en la Figura 3-17, donde el EV y SobEVT, producto de la precipitación del veneno con ACN-TFA (como se indica en 3.3.1.3) conservan la actividad, inclusive en la fracción F8 de la purificación por HPLC-RP C4 pero con un peso molecular de 75 kDa. Esta diferencia puede radicar en modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones y esto lo confirma Kiriake (2014) (112) en la hialuronidasa presente en el veneno de los peces león *P. antenata* y *P. volitans*. Estas presentan alta identidad con hialuronidasas de *S. verrucosa* y *S. horrida* que son glicoproteínas con tres sitios de N-glicosilación y las hialuronidasas presentes en el pez león comparten los mismos sitios de glicosilación y, además, tienen dos lugares de glicosilación extras, siendo en suma cinco lugares de glicosilación que pueden variar la movilidad electroforética y por lo tanto aumentar la masa molecular de la hialuronidasa.

Por ejemplo, se ha visto que en las hialuronidasas de venenos animales marinos y terrestres como en *Conus purpurascens* y *Tityus serrulatus* se pueden presentar glicosilaciones. Para ambas especies han identificado cinco lugares de glicosilación en los cuales se pueden tener cadenas glicosiladas como $[\text{HexNac}]_{(1-3)}[\text{Hex}]_{(0-7)}$ para *C. purpurascens* (147) y en *T. serrulatus* se ha confirmado la presencia de una sola N-glicosilación que incrementa la masa molecular de la hialuronidasa en 4,5 kDa (148), esta evidencia experimental en anteriores reportes demuestran que efectivamente es posible que la glicosilación puede aumentar significativamente la masa molecular de la proteína y si la hialuronidasa de *P. volitans* tiene 5 sitios de glicosilación es probable que estén glicosilados o se presenten diferencias en cada uno de los sitios teniendo cadenas y ramificaciones de glicanos mayores en unos sitios que en otros. Este es otro resultado que demuestra la efectividad de la extracción del veneno y que, aunque fue liofilizado, la actividad de hialuronidasa se mantiene en el veneno.

Otro componente que se encuentra en el veneno de animales es la fosfolipasa, esta enzima ha sido clasificada como un alérgeno que constituye el 10 % del veneno de abejas en insectos, serpientes y escorpiones, entre otros (149–151). Las fosfolipasas perturban la integridad estructural de las bicapas lipídicas

celulares, cuando hidrolizan los fosfolípidos que componen la membrana y los remanentes (lisofosfatidilcolina, ácido lisofosfatídico, diglicéridos lipofílicos, fosforilcolina y esfingosina 1-fosfato) de esta reacción generan toxicidad causando inflamación y respuestas de origen inmune (152). Así por ejemplo la PLA₂ hidroliza el enlace acilo sn-2 de los fosfolípidos, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, la PLB corta las cadenas de acilo de las posiciones sn-1 y sn-2 de los fosfolípidos (149,152,153). La fosfolipasa más común en los venenos es PLA₂ y puede llegar a causar miotoxicidad, cardiotoxicidad, actividad bactericida, hipotensión y edema (149).

No es usual que los venenos de peces contengan actividad de fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual tampoco ha sido reportada para el veneno de *P. volitans* (6,89,107,154). Pero se ha empezado a descubrir este tipo de compuestos en venenos de peces. Por ejemplo, en el 2013 se reportó una fosfolipasa-C (PLC) en el veneno de *S. argus* (98), y más reciente, en 2016 para el veneno de *P. russelli* una PLA₂ (51). En este trabajo se hizo una prueba cualitativa en placa de agar-agar para actividad de fosfolipasas (Figura 3-13) y se observa actividad PL en el precipitado obtenido al tratar el EV con 50:50 de ACN-TFA 0.1 % (P1), sin embargo, en las fracciones purificadas de la fase soluble y el SobEVT no se observa actividad.

El control positivo para PLA₂ proveniente del veneno de *M. fulvius* produce un halo traslucido, mientras tanto el halo producido por P1 es turbio, esto se debe a los remanentes líticos hidrofílicos y lipofílicos producto de la hidrólisis de la lecitina (presente en la yema de huevo) como fosforilcolina y diglicéridos respectivamente (134). Estos compuestos incrementan la turbidez en las suspensiones lipoproteicas, como la usada en este trabajo. Este es el primer reporte de la identificación de actividad PLC en el veneno del pez león *P. volitans*.

La evaluación de la actividad citotóxica de extractos del veneno del pez león con diferentes soluciones de extracción (numeral 3.3.2.6), permitió identificar la metodología de extracción que conservara la actividad tóxica a las células HTR8.

La prueba estadística de Tukey para comparaciones múltiples entre los tratamientos permite que, dentro de los tratamientos que se observa citotoxicidad dependiente de concentración, se pueda determinar que el veneno extraído con glicerol 10 % y glicerol 10 % Sigma® presenta una diferencia estadística ($p \leq 0.05$) señalando como mejor opción esta última forma de extracción (Figura 3-18). No obstante, como se mencionó anteriormente, (en 3.4.2.6.1) el coctel de inhibidores Sigma® afecta de forma significativa ($p \leq 0.01$) la viabilidad celular HTR8, así que el mejor método de obtención de un extracto de veneno con actividad citotóxica a HTR8 es la extracción con Glicerol 10 % que como solución de extracción posee un efecto citotóxico bajo a las células ($p \leq 0.05$).

Conociendo que el método de extracción de veneno con glicerol 10 % permite la preservación de actividad citotóxica en HTR8, muestra una mayor cantidad de componentes por cromatografía de HPLC y electroforesis. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con EV obtenido con este método de extracción (2.2.3.2), frente a líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix (HeLa), adenocarcinoma colorrectal (HT29), cultivo primario de neuronas hipocampales de rata, adenocarcinoma de mama (HBT26) y de próstata (PC3).

La prueba de citotoxicidad con la línea celular HeLa se realizó con el fin de determinar actividad citotóxica por el EV, como reporta Balasubashini (2006) (50) donde se purificó un péptido de 7 kDa tóxico para la línea celular HeLa. En este trabajo EV no presentó efecto citotóxico significativo, esto indica posiblemente, que la actividad citotóxica observada a altas concentraciones ($>60 \mu\text{g/mL}$) es producto de la baja proporción que pueda existir del péptido, reportado por Balasubashini y/o diferentes toxinas que puedan encontrarse en el veneno (Figura 3-19). En la línea celular SiHa, de carcinoma cervical, el veneno de *S. venosa* disminuye la viabilidad celular en 95 % a 1 mg/mL (155). Aun así, es posible determinar que el EV posee citotoxicidad débil a esta línea celular, tal como se ha encontrado con otras líneas celulares en estudios recientes sobre células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) y mioblastos murinos (C2C12), observándose efectos tóxicos a

concentraciones de 50 µg/mL (107). En otros estudios con el veneno de la manta raya *Dasyatis stephen* se observa que disminuye significativamente la viabilidad de células HeLa hasta en 80 % a 16 µg/mL (156).

Con la línea celular HT-29 el EV es citotóxico en el 44 % de la población celular a una concentración de 100 µg/mL, lo que sugiere una interacción muy débil del veneno con este tipo de célula tumoral (Figura 3-20). Hasta la fecha, sólo se ha reportado efecto citotóxico del extracto de veneno total de *P. volitans* en el carcinoma ascítico de Ehrlich's, el cual permitió aumentar la vida media de los ratones inoculados (109), C2C12 y BAEC, presentando citotoxicidad débil a las seis horas con una concentración de 50 µg/mL de EV y mayor actividad en BAEC disminuyendo aproximadamente en 55 % la viabilidad celular (107). Para la línea HT29 no se han presentado estudios con el EV del pez león, siendo nueva evidencia experimental de que el veneno puede afectar de forma leve la viabilidad celular de otros tipos de cáncer. Sin embargo, peces venenosos como *Trachinus Viper*a y *S. venosa* presentan actividad apoptótica vía mitocondrial en células provenientes de carcinoma colorrectal HCT116 e inhibe la migración celular (155,157).

El EV disminuye de forma dosis dependiente la viabilidad de neuronas hipocampales de rata hasta al 59 % a 100 µg/mL (Figura 3-23). Se cree que la concentración presente de toxina que produce la actividad neurotóxica sería baja, con relación a la concentración usada de EV en el ensayo de citotoxicidad, y esto se podría discutir con más profundidad cuando se realicen experimentos con fracciones purificadas. Church et al., 2003, determinaron que el EV promueve el aumento de niveles de calcio intracelular, lo que induciría la muerte de células corticales murinas, (neuronas que recubren la corteza cerebral) e infieren la posibilidad de que el mecanismo de acción sea debido a la formación de poros catiónicos no selectivos en la célula (106). Sin embargo, no se ha determinado que tipo de molécula presente en el veneno de *P. volitans* estaría produciendo ese efecto citotóxico, pero al inhibir SAFV completamente la actividad del veneno,

aseguran que la(s) toxina(s) responsable(s) de este resultado serían antigénicamente similares entre los peces venenosos del orden de los Scorpaeniformes, y esto efectivamente se ha comprobado con antisuero de las subunidades α y β de la neoverrucotoxina (neoVTX) de *S. verrucosa*, que presenta reactividad cruzada contra proteínas de tamaños próximos al de las subunidades de 75 kDa de neoVTX (48). Con base en esto, en 2015 Ellisdon determinó la estructura cristalina de la SNTX, toxina del veneno de *S. horrida* homóloga a la neoVTX, estableciendo que esta toxina pertenece a las proteínas formadoras de poros en membrana, debido a que las subunidades α y β establecen conformaciones oligoméricas supramoleculares en forma de anillo que abren poros en membranas celulares (66). Según lo anterior, es posible que el efecto citotóxico del veneno de *P. volitans* hacia algunas células sea por esta vía con toxinas formadoras de poros en la membrana.

El EV elimina el 71 % de células HTB-26 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3-21). Este resultado es similar a la toxicidad que promueve el veneno en las neuronas hipocampales (citotóxico hasta en 59 % de las células a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, hasta el momento, es la única línea celular tumoral en la que se observe un efecto citotóxico fuerte con el veneno completo de *P. volitans*. La línea celular de adenocarcinoma de próstata (PC3) no se ve afectada con el extracto de veneno crudo, sin embargo, el extracto posee actividad citotóxica débil sobre líneas HTR8, HeLa y HT29. Mientras que, para el cultivo primario de neuronas hipocampales y HBT26 afecta a las células disminuyendo más del 50% de la población. Estos resultados sugieren que los compuestos y/o toxinas provenientes del veneno que estén afectando la viabilidad celular, son afines por ciertos tipos celulares y posiblemente el reconocimiento de moléculas de la membrana celular que se encuentren mucho más expresados que en otros. Sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan identificar el mecanismo por el cual se produce la disminución de la viabilidad celular.

A la fecha solo hay dos estudios que buscan elucidar el mecanismo de acción *in vitro* del veneno de *P. volitans*; el primero, en neuronas corticales murinas, ha demostrado por tinción con yoduro de propidio que EV compromete la membrana celular, posiblemente por la formación de poros (106); y el segundo, en células Hep2 y HeLa, en esta última línea se aisló un péptido de 7 kDa que promueve la apoptosis intrínseca debido a la expresión de caspasas-8 y 3, además de suprimir la expresión de BcL-2 y producir la fragmentación nuclear (50). El péptido de 7 kDa proveniente del veneno del pez león puede clasificarse dentro de los péptidos con potencial anticancerígeno, y se cree pueden tener diferentes mecanismos de acción para ejercer su capacidad tóxica. Los péptidos catiónicos reconocen la fosfatidilserina en la membrana celular, por ejemplo, genera la redistribución de la bicapa lipídica de la membrana induciendo la muerte celular, como consecuencia de la formación de poros. También existe la posibilidad de que los péptidos reconozcan receptores que promueven la muerte celular por disrupción de membrana mitocondrial y por ende apoptosis (139).

El extracto de veneno y sus fracciones purificadas por HPLC-RP C4 no presentan actividad antibacteriana contra *S. aureus* con 10 µg de proteína total (Figura 3-24). Puede ser que esta cantidad de proteína no permitiera observar la actividad, puesto que recientemente Houyvet reportó mediante análisis transcriptómicos y proteómicos la presencia de un péptido antimicrobiano en la piel de *P. volitans*, denominado pteroidicina-α que posee actividad antibacteriana en la forma aminada pteroidicina-α CONH₂ a *S. aureus*, *E. coli* y *A. salmonicida* mientras que, la forma no aminada pteroidicina-α COOH solo inhibe el crecimiento (49). En este trabajo el extracto de veneno del pez león se realizó con las espinas que contienen las glándulas venenosas y la recubierta tegumentaria; consiguiendo posiblemente la extracción conjunta de este péptido, sin embargo, la baja cantidad obtenida de la separación de los componentes del veneno por HPLC-RP C4, afectaría la actividad antibacteriana, así como sucede con la actividad aglutinante en los venenos que puede ser enmascarada por la capacidad hemolítica de otros componentes. Por

otra parte, en el proceso de diálisis que se realizó al EV se eliminaron péptidos menores a 3 kDa y la pteroidicina- α tiene una masa molecular de 2.4 kDa.

La actividad insecticida contra *A. domesticus* se evaluó con las fracciones F6, F7, F8 provenientes de la purificación del veneno de *P. volitans*; no se identificó toxicidad alguna en los grillos (Tabla 3-10). Lo que indica que las fracciones y el EV no son tóxicos hacia esta especie de insecto. Por otra parte, la toxicidad del veneno de *P. volitans* fue débil en ratas Wistar al ser inyectadas vía intravenosa (Tabla 3-11). Las fracciones F6 y F7 indujeron el arrastre de las patas traseras por cortos periodos de tiempo y en la F7, también se observó piloerección. En los estudios que se han realizado del veneno del pez león, este posee actividad letal en ratones, con LD₅₀ reportados de 1 mg/ kg i.v (92), 42,5 μ g/kg i.p (50,108) y en otros peces venenosos como *S. plumieri* 0.28 mg/kg i.v (140), 2,6 mg/kg i.v en *S. guttata* (158), *S. horrida* LD₅₀ 0.3 mg/kg i.v. (159), y *S. verrucosa* 0.125 mg/kg i.v. (44). Si bien el veneno de *S. guttata* y *P. volitans* son las LD₅₀ más altas vía intravenosa, cuando se realizaron las pruebas del veneno en ratas a dosis más altas no se presentaron efectos letales. Lo anterior se debe a que la inestabilidad del veneno es alta y por ejemplo, al ser liofilizado puede perder el 30 % de su actividad toxica (89,92,94,95), sin embargo las fracciones F6 y F7 muestran efectos en el comportamiento de las ratas (Tabla 3-11). Arrastrar las patas puede ser significado de debilidad en el musculo esquelético, comportamiento reportado antes de la muerte (92), la piloerección es otra característica del efecto tóxico de la fracción, en ambas fracciones se determinó la presencia de proteasas gelatinolíticas y en la F7 una proteasa de bajo peso molecular (26 kDa, Figura 3-14) que probablemente estén relacionadas con el efecto visto. Si bien, en la F8 se encuentra la hialuronidasa (Figura 3-17) esta no produjo ningún comportamiento anormal en las ratas (Tabla 3-11).

Finalmente, el análisis *in vivo* del veneno y sus fracciones, en el pez cebra *Danio rerio* mostraron efectos letales en las fracciones F6, F7 y F9; la F8 solo presenta parálisis temporal (Tabla 3-12). El EV es efectivo y los peces mueren en

aproximadamente 3 min con convulsiones y nado muy rápido. Efectos como parálisis y convulsiones en los peces son producto de compuestos neurotóxicos en el veneno del pez, dando como resultado la escasa re oxigenación de las branquias y por lo tanto la muerte (137).

A pesar de que en las fracciones se esperaba un efecto más fuerte con respecto a EV, este no se observó, ya que la acción casi inmediata del veneno es producto de efectos sinérgicos entre compuestos tóxicos del veneno. Como se ha observado en este y otros trabajos, el componente proteolítico, enzimas como hialuronidasa, la presencia de acetilcolina, y ahora también de una PLC se suman a la acción letal y tóxica del veneno. En estudios recientes del efecto de venenos en este modelo animal, se reporta que el veneno de la medusa *Chrysaora sp.* produce convulsiones, parálisis en las espinas pectorales, caudales y dorsales, además de anomalías en el nado seguido de la muerte (137), con el veneno de *Bothrops alternatus* aumenta la actividad de nado, se producen espasmos, temblores a lo largo de la cola, nado circular, cambio en la posición de nado, clonus, parálisis y muerte (160). Al contrastar el efecto del EV de *P. volitans* en ratas, en el que fue levemente tóxico, y la capacidad letal que se observó del veneno y sus fracciones en *D. rerio*, se puede decir que el (los) componente(s) letal(es) hacia mamíferos pierde(n) actividad con la liofilización, sin embargo, el factor letal hacia los peces no es afectado. Dentro de este se encontrarían las proteasas, hialuronidasa y PLC, además del factor letal hacia peces (133,137).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

El mejor método de extracción para la obtención del veneno activo de *P. volitans*, (EV), fue la descrita por Church (2002). El veneno está compuesto por proteínas que se encuentran en el rango de 175 - 8 kDa, la mayoría de carácter básico con pI entre 5.0 y 9.0 y algunas de carácter ácido con pI menor a 5.0, estas últimas con pesos moleculares menores a 26 kDa.

Por filtración en gel fue separado el factor hemolítico y de esta forma se detectó la actividad aglutinante contra eritrocitos de conejo. El veneno produce hemólisis selectiva a eritrocitos de conejo en un 98 %, mientras que los eritrocitos humanos no son afectados.

La purificación del veneno por HPLC-RP C4 permitió tener la mejor separación de sus componentes, mientras que el intercambio aniónico y la exclusión por HPLC no fueron técnicas adecuadas. Sin embargo, la observación de las fracciones por SDS-PAGE indicó que la separación no había sido total por la complejidad de la muestra.

Aunque para las pruebas enzimáticas el veneno fue liofilizado, este mantuvo actividad para hialuronidasa de 75 kDa. El perfil de proteínas que hidrolizan gelatina difiere a los reportes en literatura, ya que en este trabajo se encontró hidrólisis, en pesos moleculares de 250 a 75 kDa y una de 26 kDa. Siendo un rasgo de la divergencia en los componentes del veneno de *P. volitans* en hábitats

distintos, por lo menos en la capacidad proteolítica. Por primera vez se reporta la presencia de actividad fosfolipasa de tipo C (PLC) en el veneno de *P. volitans* y se corrobora la ausencia de fosfolipasa A₂ (PLA₂).

El veneno liofilizado no posee actividad toxica y letal en ratas Wistar, pero la mantuvo en peces cebra, sugiriendo que hay toxinas más estables que actúan en modelos marinos, diferentes a las que producen la letalidad en mamíferos. Además, el veneno del pez león y las fracciones obtenidas por HPLC no mostraron actividad insecticida contra *A. domesticus* ni antimicrobiana hacia *S. aureus*.

El extracto de veneno del pez león, en células HeLa (cáncer de cérvix), disminuyó la población celular en un 26 %, en HT-29 (cáncer de colón) en 44 %, HBT-26 (cáncer de mama) en 52 % y en neuronas hipocampales existe efecto neurotóxico en el 59 % de las células. Para trofoblastos, HTR8, es necesario suministrar 200 µg/mL para ser citotóxico en el 50 % de las células. La única línea celular que no mostró ser afectada por el veneno es la proveniente de cáncer de próstata (PC3).

4.2. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos de inhibición de la actividad aglutinante para identificar el carbohidrato que reconoce la lectina y de esta forma hacer estudios de afinidad para purificar la lectina presente en el veneno. Realizar estudios de secuencia e identidad con las lectinas caracterizadas en venenos de peces.

Hacer pruebas de citotoxicidad con las fracciones del veneno para identificar péptidos que induzcan toxicidad en líneas celulares cancerígenas.

Realizar nuevas técnicas de purificación de proteasas para identificar la proteasa de 26 kDa presente en el veneno de *P. volitans*.

Aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente la fosfolipasa C encontrada en el veneno del pez león.

Bibliografía

1. Calvete JJ. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochem J* [Internet]. 2017;474(5):611–34. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BCJ20160577>
2. Lahiani A, Yavin E, Lazarovici P. The molecular basis of toxins' interactions with intracellular signaling via discrete portals. Vol. 9, *Toxins*. 2017.
3. Vetter I, Davis JL, Rash LD, Anangi R, Mobli M, Alewood PF, et al. Venomics: A new paradigm for natural products-based drug discovery. Vol. 40, *Amino Acids*. 2011. p. 15–28.
4. Zhang Y. Why do we study animal toxins? *Dongwuxue Yanjiu* [Internet]. 2015;36(4):183–222. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4790257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Smith WL, Wheeler WC. Venom evolution widespread in fishes: A phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. *J Hered*. 2006;97(3):206–17.
6. Ziegman R, Alewood P. Bioactive components in fish venoms. *Toxins (Basel)*. 2015;7(5):1497–531.
7. Baumann K, Casewell NR, Ali SA, Jackson TNW, Vetter I, Dobson JS, et al. A ray of venom: Combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray (*Neotrygon kuhlii*). *J Proteomics*. 2014;109:188–98.
8. Thulesius O, Al-Hassan JM, Criddle RS, Thomson M. Vascular responses elicited by venom of Arabian catfish (*Arius thalassinus*). *Gen Pharmacol*. 1983;14(1):129–32.
9. Chhatwal I, Dreyer F. Isolation and characterization of dracotoxin from the venom of the greater weever fish *Trachinus draco*. *Toxicon*. 1992;30(1):87–93.
10. Muhuri D, Karmakar S, Dasgupta SC, Nagchaudhuri AK, Gomes A. Pharmacological studies on the venomous spotted butterflyfish (*Scatophagus argus* Linn) sting extract on experimental animals. *Indian J Exp Biol*. 2004;42(5):461–7.
11. Carlson RW, Schaeffer RC, Whigham H, Weil MH, Russell FE. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*-II. *Toxicon*. 1973;11(2):167–80.
12. Gomes HL, Andrich F, Mauad H, Sampaio KN, De Lima ME, Figueiredo SG, et al. Cardiovascular effects of scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom.

- Toxicon. 2010;55(2–3):580–9.
13. Gomes HL, Menezes TN, Malacarne PF, Roman-Campos D, Gondim AN, Cruz JS, et al. Cardiovascular effects of Sp-CTx, a cytolyisin from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. *Toxicon*. 2016;118:141–8.
 14. Church JE, Hodgson WC. Stonefish (*Synanceia* spp.) antivenom neutralises the in vitro and in vivo cardiovascular activity of soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venom. In: *Toxicon*. 2000. p. 319–24.
 15. Church JE, Hodgson WC. Dose-dependent cardiovascular and neuromuscular effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Toxicon*. 2000;38(3):391–407.
 16. Poh CH, Yuen R, Chung MCM, Khoo HE. Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem*. 1992;101(1–2):159–63.
 17. Kiriake A, Suzuki Y, Nagashima Y, Shiomi K. Proteinaceous toxins from three species of scorpaeniform fish (lionfish *Pterois lunulata*, devil stinger *Inimicus japonicus* and waspfish *Hypodytes rubripinnis*): Close similarity in properties and primary structures to stonefish toxins. *Toxicon*. 2013;70:184–93.
 18. Chuang PS, Shiao JC. Toxin gene determination and evolution in scorpaenoid fish. *Toxicon*. 2014;88:21–33.
 19. Al-Hassan JM, Thomson M, Ali M, Criddle RS. Toxic and pharmacologically active secretions from the arabian gulf catfish (*arius thalassinus*, ruppell). *Toxin Rev* [Internet]. 1987;6(1):1–43. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15569548709053860>
 20. Nagasaka K, Nakagawa H, Satoh F, Hosotani T, Yokoigawa K, Sakai H, et al. A novel cytotoxic protein, Karatoxin, from the dorsal spines of the redfin velvetfish, *Hypodytes rubripinnis*. *Toxin Rev*. 2009;28(4):260–5.
 21. Hahn ST, O'Connor JM. An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. *Toxicon*. 2000;38(1):79–89.
 22. Sosa-Rosales JI, Piran-Soares AA, Farsky SHP, Takehara HA, Lima C, Lopes-Ferreira M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon*. 2005;45(2):155–61.
 23. Lopes-Ferreira M, Barbaro KC, Cardoso DF, Moura-Da-Silva AM, Mota I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: Biological and biochemical characterisation and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*. 1998;36(2):405–10.
 24. Barbaro KC, Lira MS, Malta MB, Soares SL, Garrone Neto D, Cardoso JLC, et al. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon*. 2007;50(5):676–87.
 25. Yazawa K, Wang JW, Hao LY, Onoue Y, Kameyama M. Verrucotoxin, a stonefish venom, modulates calcium channel activity in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2007 Jan 29 [cited 2017 Nov 19];151(8):1198–203. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0707340>
 26. Xie B, Huang Y, Baumann K, Fry BG, Shi Q. From marine venoms to drugs: Efficiently supported by a combination of transcriptomics and proteomics. Vol.

-
- 15, Marine Drugs. 2017.
27. Global Invasive Species Database (GISD) 2015. Species profile: *Pterois volitans*. [Internet]. 2010 [cited 2017 Nov 19]. p. 11. Available from: <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=1050>
 28. Schultz ET. *Pterois volitans* and *Pterois miles*: Two Valid Species. *Copeia* [Internet]. 1986;1986(3):686. Available from: <http://www.jstor.org/stable/1444950?origin=crossref>
 29. Rodríguez CH. Leones en el mar (+Infografías) [Internet]. Cubahora; 2014 [cited 2017 Nov 19]. Available from: <http://www.cubahora.cu/ciencia-y-tecnologia/leones-en-el-mar>
 30. Munar AAM. Capture of the lion fish, (*Pterois volitans*) Control and Management in the Colombian Caribbean. *LOGINN Investig Científica y Tecnológica*. 2017;1(1).
 31. Field-cortazares J, Calderón-campos R, Moreno JLS. Envenenamiento por Picadura de Pez León. ... por Picadura Pez León ... [Internet]. 2008;25(2):85–90. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2008/bis082h.pdf>
 32. Cheung RCF, Wong JH, Pan W, Chan YS, Yin C, Dan X, et al. Marine lectins and their medicinal applications. Vol. 99, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. p. 3755–73.
 33. Estado E, De M, Pesca L, Acuicultura L. CONTRIBUCIÓN A LA SEGURIDAD ALIMENTARIA Y LA NUTRICIÓN PARA TODOS. 2016 [cited 2018 Feb 24]; Available from: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
 34. Casewell NR, Wüster W, Vonk FJ, Harrison RA, Fry BG. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. Vol. 28, *Trends in Ecology and Evolution*. 2013. p. 219–29.
 35. Han H, Baumann K, Casewell NR, Ali SA, Dobson J, Koludarov I, et al. The cardiovascular and neurotoxic effects of the venoms of six bony and cartilaginous fish species. *Toxins (Basel)*. 2017;9(2).
 36. Boisier P, Ranaivoson G, Rasolofonirina N, Roux J, Chanteau S, Takeshi Y. Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*): clinical and epidemiological aspects and isolation of toxins. *Toxicon*. 1995;33(10):1359–64.
 37. Rodríguez Camprubí C. Tetrodotoxin: Globalization of a local problem. 2017;
 38. Halstead BW. Fish toxins. *Foodborne Dis Handb Vol IV Seaf Environ Toxins*. 2018;
 39. Jawad LA. Dangerous fishes of the eastern and southern Arabian peninsula. *Dangerous Fishes of the Eastern and Southern Arabian Peninsula*. 2017. 1-322 p.
 40. Mancini I, Defant A, Mesarič T, Potočnik F, Batista U, Guella G, et al. Fatty acid composition of common barbel (*Barbus barbus*) roe and evaluation of its haemolytic and cytotoxic activities. *Toxicon*. 2011;57(7–8):1017–22.
 41. Colasante C, Meunier FA, Kreger AS, Molgó J. Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur J Neurosci*. 1996;8(10):2149–56.

42. Tay TKW, Chan HZ, Ahmad TST, Teh KK, Low TH, Wahab NA. Stonefish envenomation of hand with impending compartment syndrome. *J Occup Med Toxicol*. 2016;11(1).
43. Poh CH, Yuen R, Khoo HE, Chung M, Gwee M, Gopalakrishnakone P. Purification and partial characterization of stonustoxin (lethal factor) from *Synanceja horrida* venom. *Comp Biochem Physiol B*. 1991;99(4):793–8.
44. Garnier P, Goudey-Perriere F, Breton P, Dewulf C, Petek F, Perriere C. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon*. 1995;33(2):143–55.
45. Ueda A, Suzuki M, Honma T, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K. Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subj*. 2006;1760(11):1713–22.
46. Kato K, Nakagawa H, Shinohara M, Ohura K. Purification of a novel lectin from the dorsal spines of the stonefish, *Synanceia verrucosa*. *J Osaka Dent Univ*. 2016;50(2):55–61.
47. Abe T, Sumatora M, Hashimoto Y, Yoshihara J, Shimamura Y, Fukami J. Purification and properties of a cardioactive toxin, cardioleputin, from stonefish, *Synanceia verrucosa*. *J Venom Anim Toxins*. 1996;2(2):135–49.
48. Kiriake A, Shiomi K. Some properties and cDNA cloning of proteinaceous toxins from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). *Toxicon*. 2011;58(6–7):494–501.
49. Houyvet B, Bouchon-Navaro Y, Bouchon C, Goux D, Bernay B, Corre E, et al. Identification of a moronecidin-like antimicrobial peptide in the venomous fish *Pterois volitans*: Functional and structural study of pterocidin- α . *Fish Shellfish Immunol*. 2018;72:318–24.
50. Sri Balasubashini M, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Rukkumani R, Menon VP. FV peptide induces apoptosis in HEp 2 and HeLa cells: An insight into the mechanism of induction. *J Carcinog*. 2006;5(1):27.
51. Memar B, Jamili S, Shahbazzadeh D, Bagheri KP. The first report on coagulation and phospholipase A2 activities of Persian Gulf lionfish, *Pterois russelli*, an Iranian venomous fish. *Toxicon*. 2016;113:25–31.
52. Nakagawa H, Nagasaka K, Sakai H, Edo K, Shinohara M, Ohura K. Isolation of a novel lectin from the dorsal spines of the devil stinger, *Inimicus japonicus*. *Int Aquat Res*. 2015;7(2):143–50.
53. Andrich F, Carnielli JBT, Cassoli JS, Lautner RQ, Santos RAS, Pimenta AMC, et al. A potent vasoactive cytolytic isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. *Toxicon*. 2010;56(4):487–96.
54. de Santana Evangelista K, Andrich F, de Rezende FF, Niland S, Cordeiro MN, Horlacher T, et al. Plumieribetin, a fish lectin homologous to mannose-binding B-type lectins, inhibits the collagen-binding $\alpha 1\beta 1$ integrin. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34747–59.
55. Andrich F, Richardson M, Naumann GB, Cordeiro MN, Santos A V., Santos DM, et al. Identification of C-type isolectins in the venom of the scorpionfish

- Scorpaena plumieri. *Toxicon*. 2015;95:67–71.
56. Perriere C, Goudey-Perriere F, Petek F. Purification of a lethal fraction from the venom of the weever fish, *Trachinus vipera* C.V. *Toxicon*. 1988;26(12):1222–7.
 57. Karmakar S, Muhuri DC, Dasgupta SC, Nagchaudhuri AK, Gomes A. Isolation of a haemorrhagic protein toxin (SA-HT) from the Indian venomous butterflyfish (*Scatophagus argus*, Linn) sting extract. *Indian J Exp Biol*. 2004;42(5):452–60.
 58. Lopes-Ferreira M, Magalhães GS, Fernandez JH, Junqueira-De-Azevedo IDLM, Le Ho P, Lima C, et al. Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie*. 2011;93(6):971–80.
 59. Lopes-Ferreira M, Grund LZ, Lima C. *Thalassophryne nattererifish* venom: From the envenoming to the understanding of the immune system. Vol. 20, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2014.
 60. Auddy B, Muhuri DC, Alam MI, Gomes A. A lethal protein toxin (toxin-PC) from the Indian catfish (*Plotosus canius*, Hamilton) venom. *Nat Toxins*. 1995;3(5):363–8.
 61. Ramos AD, Conceição K, Silva PI, Richardson M, Lima C, Lopes-Ferreira M. Specialization of the sting venom and skin mucus of *Cathorops spixii* reveals functional diversification of the toxins. *Toxicon*. 2012;59(6):651–65.
 62. Tamura S, Yamakawa M, Shiomi K. Purification, characterization and cDNA cloning of two natterin-like toxins from the skin secretion of oriental catfish *Plotosus lineatus*. *Toxicon*. 2011;58(5):430–8.
 63. Shiomi K, Takamiya M, Yamanaka H, Kikuchi T, Suzuki Y. Toxins in the skin secretion of the oriental catfish (*Plotosus lineatus*): immunological properties and immunocytochemical identification of producing cells. *Toxicon*. 1988;26(4):353–61.
 64. Kiriake A, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Occurrence of a stonefish toxin-like toxin in the venom of the rabbitfish *Siganus fuscescens*. *Toxicon*. 2017;140:139–46.
 65. Sosa-Rosales JI, D'Suze G, Salazar V, Fox J, Sevcik C. Purification of a myotoxin from the toadfish *Thalassophryne maculosa* (Günther) venom. *Toxicon*. 2005;45(2):147–53.
 66. Ellisdon AM, Reboul CF, Panjekar S, Huynh K, Oellig CA, Winter KL, et al. Stonefish toxin defines an ancient branch of the perforin-like superfamily. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2015;112(50):15360–5. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1507622112>
 67. Satoh F, Nakagawa H, Yamada H, Nagasaka K, Nagasaka T, Araki Y, et al. Fishing for bioactive substances from scorpionfish and some sea urchins. *J Nat Toxins [Internet]*. 2002;11(4):297–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12503872>
 68. Khoo HE. Bioactive proteins from stonefish venom. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(9):802–6.
 69. Halstead BW, Chitwood MJ, Modglin FR. The anatomy of the venom apparatus of the zebrafish, *Pterois volitans* (Linnaeus). *Anat Rec*.

- 1955;122(3):317–33.
70. Morris J. JA, Whitfield PE. Biology, ecology, control and management of the invasive Indo-Pacific lionfish: An updated integrated assessment. 2009; Available from: http://aquaticcommons.org/2847/1/NCCOS_TM_99.pdf
 71. González J, Grijalba-Bendeck M, Acero P. A, Betancur-R. R. The invasive red lionfish, *Pterois volitans*, in the southwestern Caribbean Sea. *Aquat Invasions*. 2009;4(3):381–4.
 72. U.S. Department of the Interior | U.S. Geological Survey. Nonindigenous Aquatic Species [Internet]. 2018 [cited 2018 Feb 25]. p. 1. Available from: <https://nas.er.usgs.gov/queries/SpeciesAnimatedMap.aspx?speciesID=963>
 73. Kimball ME, Miller JM, Whitfield PE, Hare JA. Thermal tolerance and potential distribution of invasive lionfish (*Pterois volitans*/miles complex) on the east coast of the United States. *Mar Ecol Prog Ser* [Internet]. 2004;283:269–78. Available from: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v283/p269-278/>
 74. Morris Jr J, Akins J, Barse A. Biology and ecology of the invasive lionfishes, *Pterois miles* and *Pterois volitans*. *Proc Gulf ...* [Internet]. 2009;61(November):1–6. Available from: http://www.tflats.com/app/webroot/userfiles/66/File/morrisetal_2009.pdf
 75. Albins MA. Invasive Pacific lionfish *Pterois volitans* reduce abundance and species richness of native Bahamian coral-reef fishes. *Mar Ecol Prog Ser*. 2015;522:231–43.
 76. Albins MA, Hixon MA. Invasive Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* reduce recruitment of Atlantic coral-reef fishes. *Mar Ecol Prog Ser*. 2008;367:233–8.
 77. Hixon MA. Predation: Piscivory and the ecology of coral reef fishes. In: *Ecology of Fishes on Coral Reefs*. 2015. p. 41–52.
 78. Gardner PG, Frazer TK, Jacoby CA, Yanong RPE. Reproductive biology of invasive lionfish (*Pterois* spp.). *Front Mar Sci* [Internet]. 2015;2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmars.2015.00007/abstract>
 79. McCloskey K, Surmaitis R, Patel D, Goldberger D. Accidental lionfish envenomation. *Vis J Emerg Med*. 2017;6:28.
 80. SUBRAMANIYAN A, SARAVANAMURUGAN R, SANGEETHA P. Haematological and biochemical changes in lionfish (*Pterois russelii*) venom treated Swiss albino mice.
 81. Copyright © 2012 Dawn Witherington. Portrait of an Invasion | Invasive Lionfish Portal [Internet]. 2012 [cited 2018 Feb 25]. Available from: <http://lionfish.gcfi.org/portrait-invasion>
 82. Choromanski JM, Murray TF, Weber LJ. Responses of the isolated buffalo sculpin heart to stabilized venom of the lionfish (*Pterois volitans*). In: *Proceedings of the Western Pharmacology Society* [Internet]. 1984. p. 229–32. Available from: <papers2://publication/uuid/E1A4F7AF-B54B-4C8C-AB19-4CFD90F77E68>
 83. Church JE, Hodgson WC. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lion fish (*Pterois volitans*) venom. *Toxicol*. 2002;40(6):787–96.
 84. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia a K, Gartner FH, Provenzano MD. Measurement of protein using bicinchoninic acid *Anal Biochem* 150: 76–

85. Anal Biochem. 1985;150(1):76–85.
85. Rincón-Cortés CA, Reyes-Montaña EA, Vega-Castro NA. Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) y evaluación preliminar de su actividad citotóxica. *Biomédica*. 2016;37(2).
86. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
87. Schagger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 1987;166(1 987):368–79.
88. Switzer RC, Merril CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1979;98(1):231–7.
89. Church JE, Hodgson WC. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*. 2002;40(8):1083–93.
90. Wilson K, Walker J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge university press; 2010.
91. Vagenende V, Yap MGS, Trout BL. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 2009;48(46):11084–96.
92. Saunder PR, Taylor PB. Venom of the lionfish *Pterois volitans*. *Am J Physiol*. 1959;197(2):437–40.
93. Nair MSR, Cheung P, Leong I, Ruggieri GD. A non-proteinaceous toxin from the venomous spines of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus). *Toxicon*. 1985;23(3):525–7.
94. Cohen AS, Olek AJ. An extract of lionfish (*Pterois volitans*) spine tissue contains acetylcholine and a toxin that affects neuromuscular transmission. *Toxicon*. 1989;27(12):1367–76.
95. Shiomi K, Hosaka M, Fujita S, Yamanaka H, Kikuchi T. Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. *Mar Biol*. 1989;103(3):285–9.
96. Manso L, Ros U, Valdés G, del Rivero MA, Lanio ME, Álvarez C. Proteolytic and hemolytic activity in the venom of the lionfish *Pterois volitans*, an invasive species of Cuban sea coasts. *Rev Cuba Ciencias Biológicas [Internet]*. 2015;4(2):57–63. Available from: http://scholar.google.com/scholar_url?url=http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/download/170/279&hl=en&sa=X&scisig=AAGBfm3v7j4y1thrF3yJ7dQs8e2xiHSokA&nossl=1&oi=scholaralrt
97. Magalhães GS, Lopes-Ferreira M, Junqueira-De-Azevedo ILM, Spencer PJ, Araújo MS, Portaro FCV, et al. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie*. 2005;87(8):687–99.
98. Ghafari SM, Jamili S, Bagheri KP, Ardakani EM, Fatemi MR, Shahbazzadeh F, et al. The first report on some toxic effects of green scat, *Scatophagus argus* an Iranian Persian Gulf venomous fish. *Toxicon*. 2013;66:82–7.
99. Ghafari Khalaf Mohamadi SM, Shahbazzadeh D, Jamili S, Fatemi SMRR,

- Pooshang Bagheri K. A new method for venom extraction from venomous fish, *Green Scat. Iran J Fish Sci.* 2015;14(2):321–7.
100. Bocian A, Urbanik M, Hus K, Łyskowski A, Petrilla V, Andrejčáková Z, et al. Proteomic analyses of *Agkistrodon contortrix contortrix* venom using 2D electrophoresis and MS techniques. *Toxins (Basel)*. 2016;8(12).
 101. Bocian A, Urbanik M, Hus K, Łyskowski A, Petrilla V, Andrejčáková Z, et al. Proteome and Peptidome of *Vipera berus berus* Venom. *Molecules*. 2016;21(10).
 102. Georgieva D, Öhler M, Seifert J, Bergen M Von, Arni RK, Genov N, et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus*-correlation with pharmacological activities. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2302–16.
 103. Escorpión D, Macrochirus T, Andrea C, Cortés R. IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PÉPTIDO(S) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA, PRESENTE(S) EN EL VENENO. 2017 [cited 2018 Mar 15]; Available from: [http://www.bdigital.unal.edu.co/60861/1/IDENTIFICACIÓN%2C AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PÉPTIDO\(S\) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA PRESENTE\(S\) EN EL VENENO DE ESCORPIÓN Tityus macrochirus BUTHIDAE CARC.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/60861/1/IDENTIFICACIÓN%2C%20AISLAMIENTO%20Y%20CARACTERIZACIÓN%20BIOQUÍMICA%20DE%20PÉPTIDO(S)%20CON%20ACTIVIDAD%20CITOTÓXICA%20PRESENTE(S)%20EN%20EL%20VENENO%20DE%20ESCORPIÓN%20Tityus%20macrochirus%20BUTHIDAE%20CARC.pdf)
 104. Silva NA, Albuquerque CMR, Marinho AD, Jorge RJB, Silva Neto AG, Monteiro HSA, et al. Effects of *Tityus stigmurus* (Thorell 1876) (Scorpiones: Buthidae) venom in isolated perfused rat kidneys. *An Acad Bras Cienc*. 2016;88:665–75.
 105. Church JE, Hodgson WC. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. *Toxicon*. 2002;
 106. Church JE, Moldrich RX, Beart PM, Hodgson WC. Modulation of intracellular Ca²⁺ levels by Scorpaenidae venoms. *Toxicon*. 2003;41(6):679–89.
 107. Sáenz A, Ortiz N, Lomonte B, Rucavado A, Díaz C. Comparison of biochemical and cytotoxic activities of extracts obtained from dorsal spines and caudal fin of adult and juvenile non-native Caribbean lionfish (*Pterois volitans/miles*). *Toxicon*. 2017;137:158–67.
 108. Sri Balasubashini M, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Viswanathan P, Menon VP. In vivo and in vitro characterization of the biochemical and pathological changes induced by lionfish (*Pterois volitans*) venom in mice. *Toxicol Mech Methods* [Internet]. 2006;16(9):525–31. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15376510600803573>
 109. Sri Balasubashini M, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Viswanathan V, Raveendran P, et al. Fish venom (*Pterois volitans*) peptide reduces tumor burden and ameliorates oxidative stress in Ehrlich's ascites carcinoma xenografted mice. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2006;16(24):6219–25.
 110. Manoharan J PS, Subramaniyan A VD. Neuroprotective Effects of *Pterois volitans* Venom against Alcohol Induced Oxidative Dysfunction in Rats. *J Environ Anal Toxicol* [Internet]. 2015;05(05):1. Available from:

- <https://www.omicsonline.org/open-access/neuroprotective-effects-of-pteris-volitans-venom-against-alcohol-induced-oxidative-dysfunction-in-rats-2161-0525-1000306.php?aid=60174>
111. Woo JS, Imm JH, Min CK, Kim KJ, Cha SS, Oh BH. Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J.* 2006;25(6):1353–63.
 112. Kiriake A, Madokoro M, Shiomi K. Enzymatic properties and primary structures of hyaluronidases from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). *Fish Physiol Biochem.* 2014;40(4):1043–53.
 113. Bah CSF, Fang EF, Ng TB, Mros S, McConnell M, El-Din Ahmed Bekhit A. Purification and characterization of a rhamnose-binding chinook salmon roe lectin with antiproliferative activity toward tumor cells and nitric oxide-inducing activity toward murine macrophages. *J Agric Food Chem.* 2011;59(10):5720–8.
 114. Tateno H, Ogawa T, Muramoto K, Kamiya H, Saneyoshi M. Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Onchorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66(3):604–12.
 115. Liu S, Hu G, Sun C, Zhang S. Anti-viral activity of galectin-1 from flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2013;34(6):1463–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464813004543>
 116. Ngai PHK, Ng TB. A mannose-specific tetrameric lectin with mitogenic and antibacterial activities from the ovary of a teleost, the cobia (*Rachycentron canadum*). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(2):433–8.
 117. Nolte S, Castro D De, Cristina A, Gomes J, Magalhães A, Fc L, et al. Toxicon BJcuL , a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom , induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. *Toxicon.* 2011;59(2012):81–5.
 118. Sartim MA, Sampaio S V. Snake venom galactoside-binding lectins: A structural and functional overview. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2015;21(1):35.
 119. de Queiroz MR, de Sousa BB, da Cunha Pereira DF, Mamede CCN, Matias MS, de Moraes NCG, et al. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon.* 2017;133:33–47.
 120. Ishizuka EK, Ferreira MJ, Grund LZ, Coutinho EMM, Komegae EN, Cassado AA, et al. Role of interplay between IL-4 and IFN- γ in the in regulating M1 macrophage polarization induced by Nattectin. *Int Immunopharmacol.* 2012;14(4):513–22.
 121. Saraiva TC, Grund LZ, Komegae EN, Ramos AD, Conceição K, Orii NM, et al. Nattectin a fish C-type lectin drives Th1 responses in vivo: Licenses macrophages to differentiate into cells exhibiting typical DC function. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(10):1546–56.
 122. Alonso Geli Y, Del Toro García G, Falcón Dieguez JE, Valdés Rodríguez YC. Actividad hemolítica de la ortovainillina y la isovainillina sobre eritrocitos humanos. *Rev Cuba Farm.* 2005;39(1):1.
 123. de Navarro Y, Pérez G. Normalización del método de migración capilar para

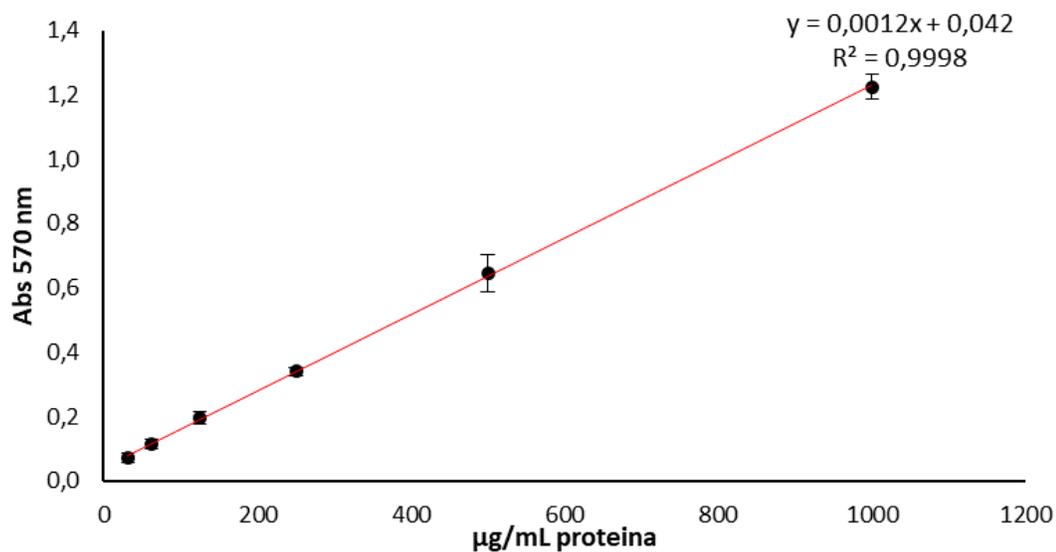
- evaluar eritroaglutinación. *Rev Colomb química* [Internet]. 1978;8(1):15–23. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/15564/1/10195-18887-1-PB.pdf>
124. Shiloah J, Klibansky C, de Vries a, Berger a. Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom. *J Lipid Res* [Internet]. 1973;14(3):267–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704070>
 125. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem*. 1980;102(1):196–202.
 126. Cevallos MA, Navarro-Duque C, Varela-Julia M, Alagon AC. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon*. 1992;30(8):925–30.
 127. American Type Culture Collection. ATCC the Global Bioresource Center [Internet]. 2016 [cited 2018 Feb 19]. p. 2–10. Available from: <https://www.atcc.org/>
 128. Ernesto C, Roa M. Síntesis de péptidos derivados de conantokina G y evaluación in vitro de su posible efecto neuroprotector en eventos isquémicos. 2016 [cited 2018 Mar 13]; Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/57099/7/cesarernestomachucaroa.2016.pdf>
 129. Reyes-Guzman EA, Vega-Castro N, Reyes-Montaña EA, Recio-Pinto E. Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed. *BMC Neurosci*. 2017;18(1):44.
 130. Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A. Neuregulin-2 is Developmentally Regulated and Targeted to Dendrites of Central Neurons. *J Comp Neurol*. 2004;472(2):156–72.
 131. Beaudoin GMJ, Lee S-H, Singh D, Yuan Y, Ng Y-G, Reichardt LF, et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc* [Internet]. 2012;7(9):1741–54. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2012.099>
 132. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
 133. Kinkel MD, Eames SC, Philipson LH, Prince VE. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J Vis Exp* [Internet]. 2010;(42):e2126. Available from: <http://www.jove.com/video/2126/intraperitoneal-injection-into-adult-zebrafish>
 134. Habermann E, Hardt KL. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal Biochem*. 1972;50(1):163–73.
 135. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. Vol. 9, *Toxins*. 2017.
 136. Gomes HL, Menezes TN, Carnielli JBT, Andrich F, Evangelista KS, Chávez-Olórtegui C, et al. Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom. *Toxicon*. 2011;57(7–8):992–9.
 137. Becerra-Amezcuca MP, Guerrero-Legarreta I, González-Márquez H, Guzmán-García X. In vivo analysis of effects of venom from the jellyfish *Chrysaora* sp.

- in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicon*. 2016;113:49–54.
138. Chen D, Kini RM, Yuen R, Khoo HE. Haemolytic activity of stonustoxin from stonefish (*Synanceja horrida*) venom: pore formation and the role of cationic amino acid residues. *Biochem J* [Internet]. 1997;325 (Pt 3):685–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9271089
 139. Wang L, Dong C, Li X, Han W, Su X. Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources (Review). Vol. 38, *Oncology Reports*. 2017. p. 637–51.
 140. Carrijo LC, Andrich F, De Lima ME, Cordeiro MN, Richardson M, Figueiredo SG. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*. 2005;45(7):843–50.
 141. Fox JW. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. Vol. 62, *Toxicon*. 2013. p. 75–82.
 142. Singer TP, Kearney EB. The L-amino acid oxidases of snake venom. II. Isolation and characterization of homogeneous L-amino acid oxidase. *Arch Biochem*. 1950;29(1):190.
 143. Magalhães MR, da Silva NJ, Ulhoa CJ. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. *Toxicon*. 2008;51(6):1060–7.
 144. Haddad Jr V, Neto DG, de Paula Neto JB, de Luna Marques FP, Barbaro KC. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*. 2004;43(3):287–94.
 145. Sugahara K, Yamada S, Sugiura M, Takeda K, Yuen R, Khoo HE, et al. Identification of the reaction products of the purified hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Biochem J*. 1992;283(Pt 1):99.
 146. Ng HC, Ranganathan S, Chua KL, Khoo HE. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceja horrida*). *Gene*. 2005;346:71–81.
 147. Möller C, Clark E, Safavi-Hemami H, DeCaprio A, Marí F. Isolation and characterization of Conohyal-P1, a hyaluronidase from the injected venom of *Conus purpurascens*. *J Proteomics*. 2017;164:73–84.
 148. Amorim FG, Boldrini-França J, de Castro Figueiredo Bordon K, Cardoso IA, De Pauw E, Quinton L, et al. Heterologous expression of rTsHyal-1: the first recombinant hyaluronidase of scorpion venom produced in *Pichia pastoris* system. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2018 Apr 17 [cited 2018 Mar 15];102(7):3145–58. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-8821-z>
 149. Zambelli VO, Picolo G, Fernandes CAH, Fontes MRM, Cury Y. Secreted phospholipases A2 from animal venoms in pain and analgesia. Vol. 9, *Toxins*. 2017.
 150. Diniz-Sousa R, Kayano AM, Caldeira CA, Simões-Silva R, Monteiro MC, Moreira-Dill LS, et al. Biochemical characterization of a phospholipase A 2

- homologue from the venom of the social wasp *Polybia occidentalis*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2018;24(1):5.
151. Masood R, Ullah K, Ali H, Ali I, Betzel C, Ullah A. Spider's venom phospholipases D: A structural review. Vol. 107, *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. p. 1054–65.
 152. Elieh Ali Komi D, Shafaghat F, Zwiener RD. Immunology of Bee Venom. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2017;1–11.
 153. Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*. 2011;111(10):6130–85.
 154. Lopes-Ferreira M, Emim JADS, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH, Araújo MDS, et al. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(11):2151–7.
 155. Sasikala R, Ravindran VS. Apoptosis of SiHa and HCT116 cancer cell-lines by *Scorpaenopsis venosa* toxic extracts. 2016;
 156. Rajeshkumar R, Vennila R, Karthikeyan S, Prasad NR, Arumugam M, Velpandian T, et al. Antiproliferative activity of marine stingray *Dasyatis sephen* venom on human cervical carcinoma cell line. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* [Internet]. 2015;21(1):41. Available from: <http://www.jvat.org/content/21/1/41>
 157. Fezai M, Slaymi C, Ben-Attia M, Kroemer G, Lang F, Jemaà M. Inhibition of colon carcinoma cell migration following treatment with purified venom from lesser weever fish (*Trachinus Viper*a). *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(6):2279–88.
 158. SCHAEFFERJR R, Carlson RW, Russell FE, Schaeffer Jr. RC, Schaeffer Jr R. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon* [Internet]. 1971;9(1):69–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com.eres.librarby.manoa.hawaii.edu/retrieve/pii/0041010171900456%5Cnpapers2://publication/uuid/8B79B5E9-4CA3-4066-8F46-0085C230B711%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010171900456%5Cnhttp://linkinghub.elsevi>
 159. Khoo HE, Yuen R, Poh CH, Tan CH. Biological activities of *Synanceja horrida* (stonefish) venom. *Nat Toxins*. 1992;1(1):54–60.
 160. Carvalho JCT, Keita H, Santana GR, de Souza GC, Dos Santos IVF, Amado JRR, et al. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. *Inflammopharmacology*. 2017;1–12.

A. Anexo: Datos de cuantificación extractos de veneno

Tabla A-1: Curva de calibración de diluciones dobles seriadas de BSA.



B. Anexo: Cromatogramas individuales de cada uno de los extractos de veneno obtenidos

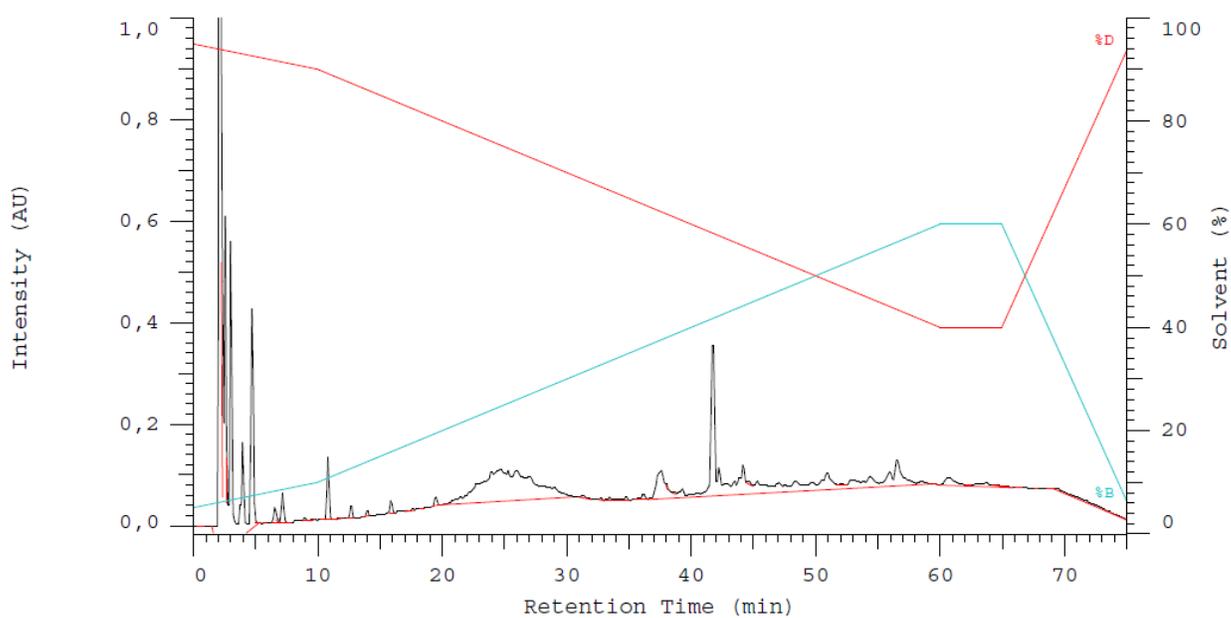


Figura B-1: Cromatograma individual del extracto de veneno realizado con PBS 1X CIP.

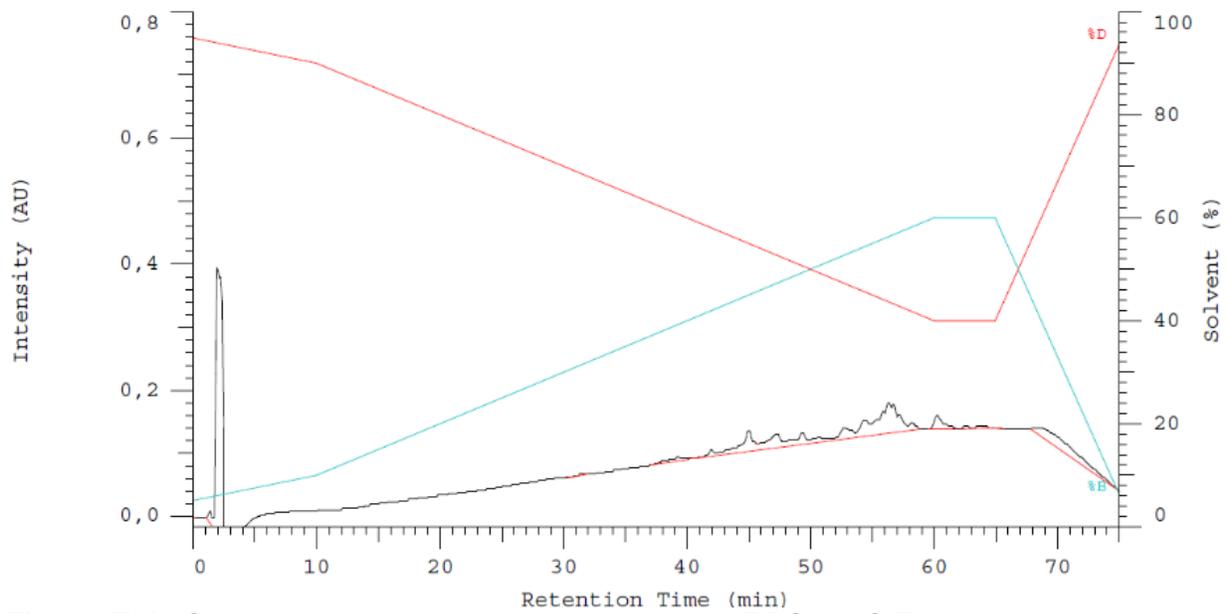


Figura B-2: Cromatograma individual del blanco de PBS 1X CIP.

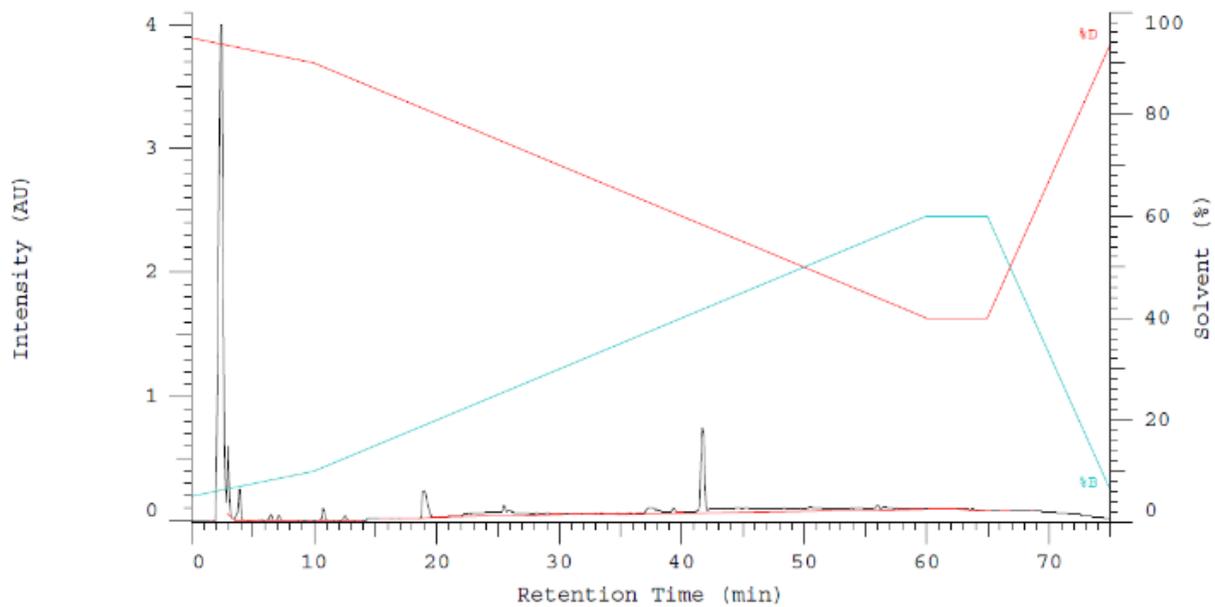


Figura B-3: Cromatograma individual del extracto de veneno realizado con PBS 1X Sigma®

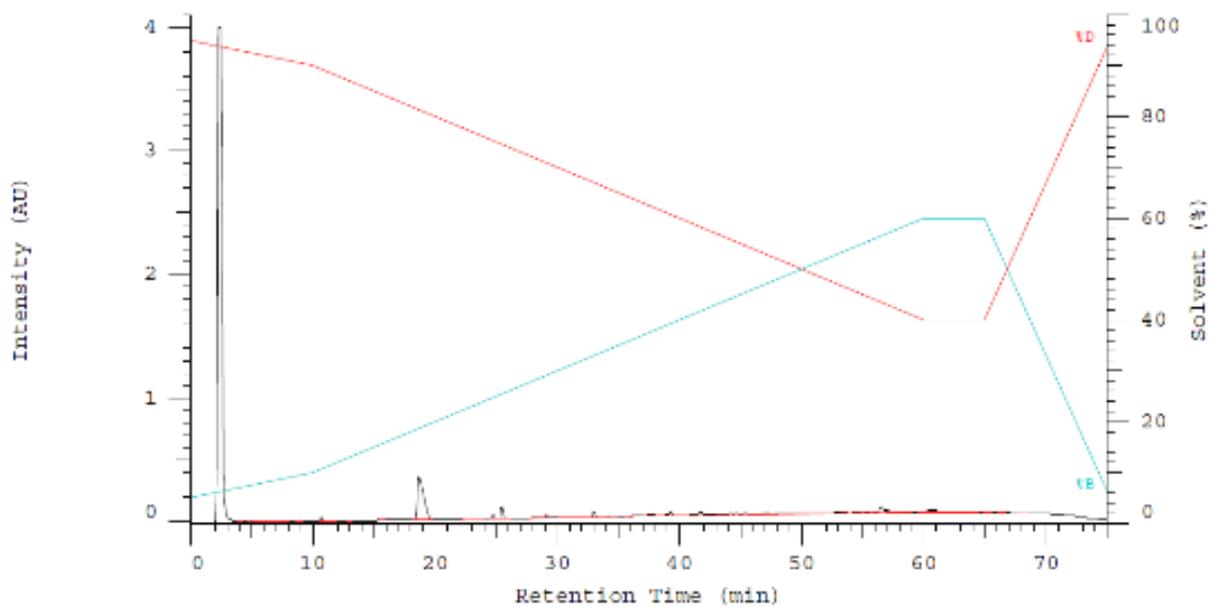


Figura B-4: Cromatograma individual del blanco PBS 1X Sigma®

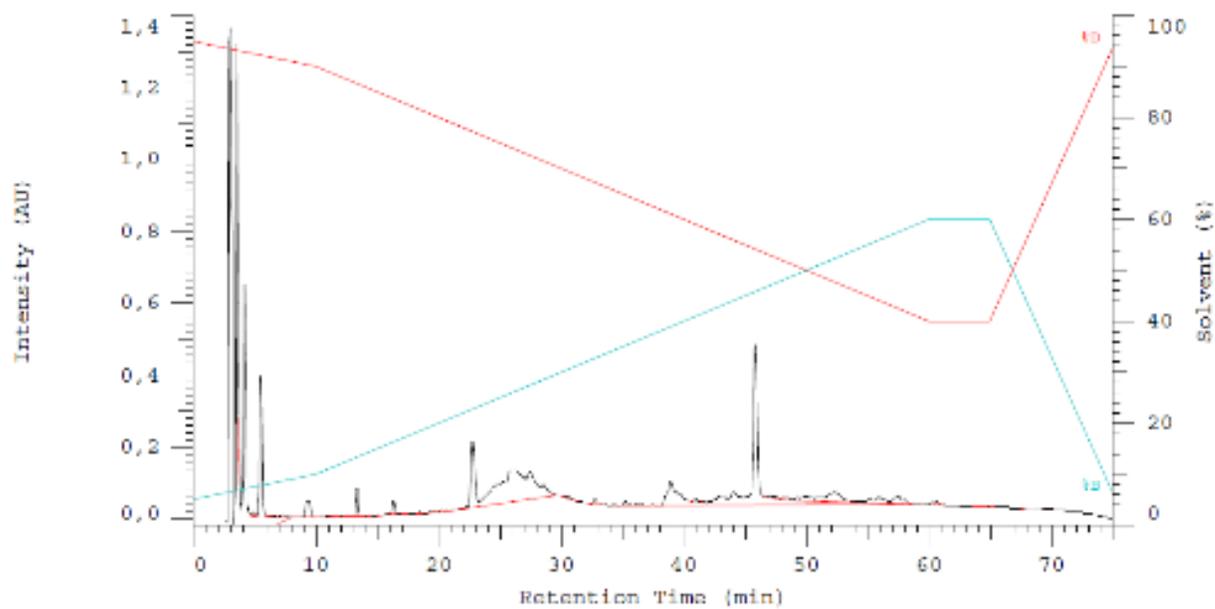


Figura B-5: Cromatograma individual del extracto de veneno realizado con PBS 1X cComplete®

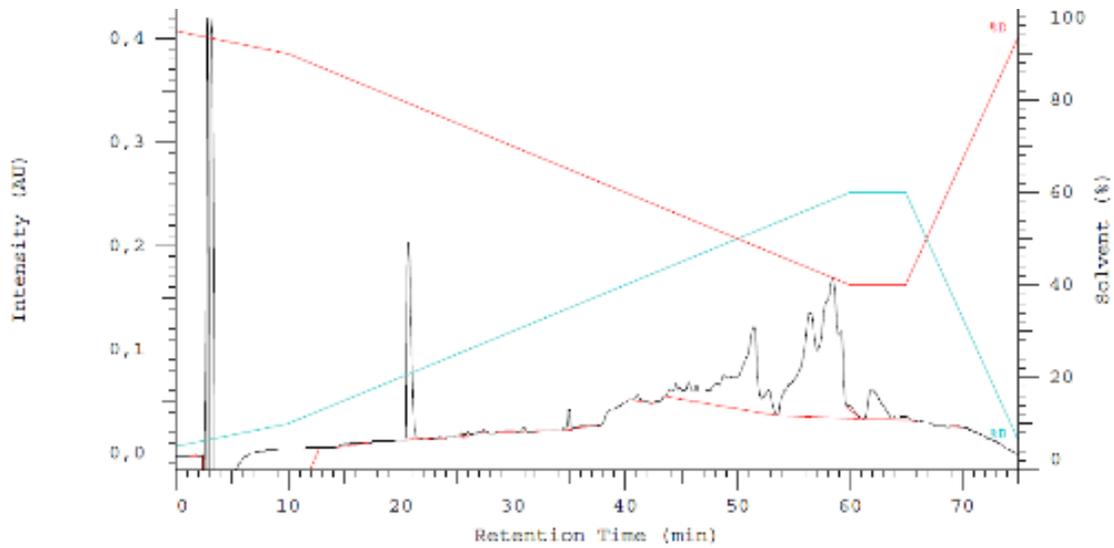


Figura B-6: Cromatograma individual del blanco de PBS 1X cComplete®

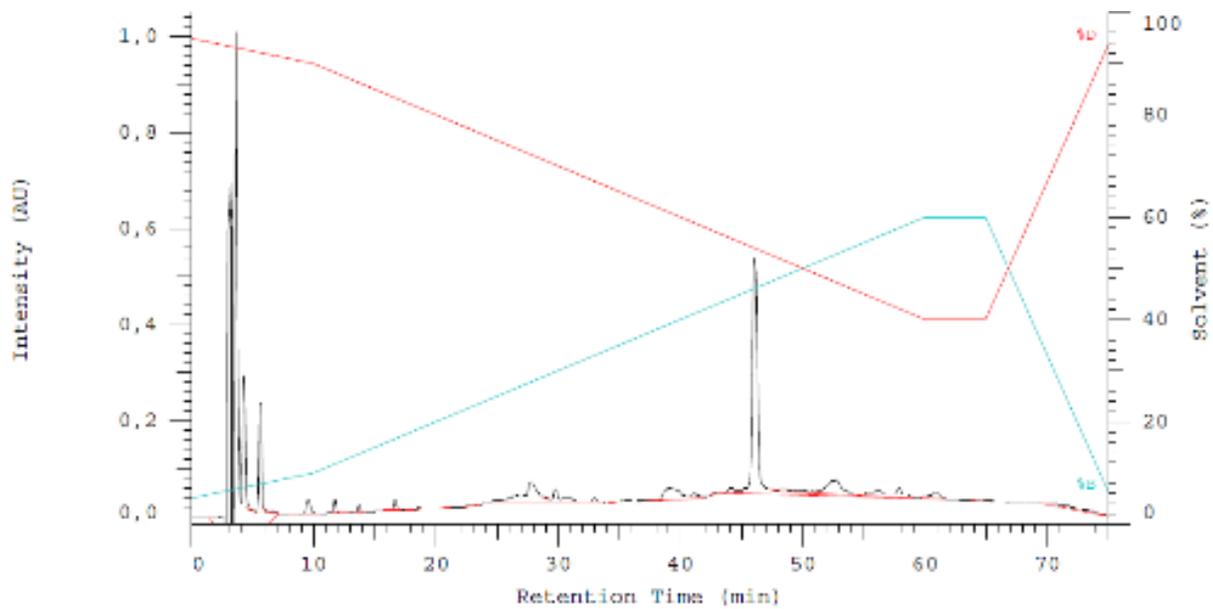


Figura B-7: Cromatograma individual del extracto de veneno realizado con Glicerol 10 %

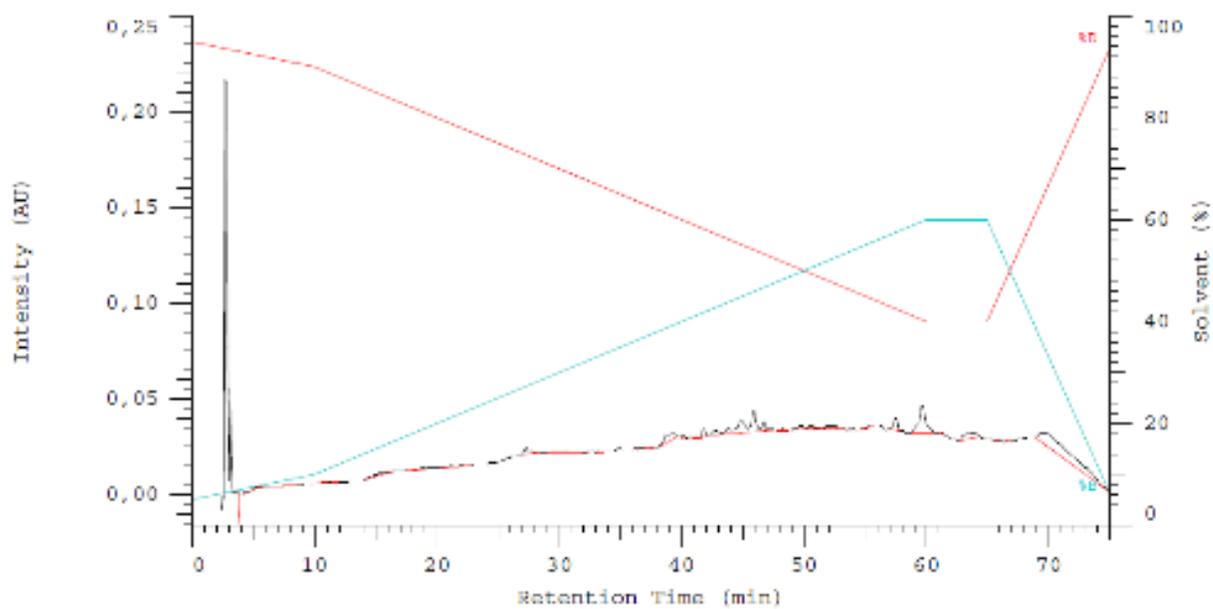


Figura B-8: Cromatograma individual del blanco Glicerol 10 %

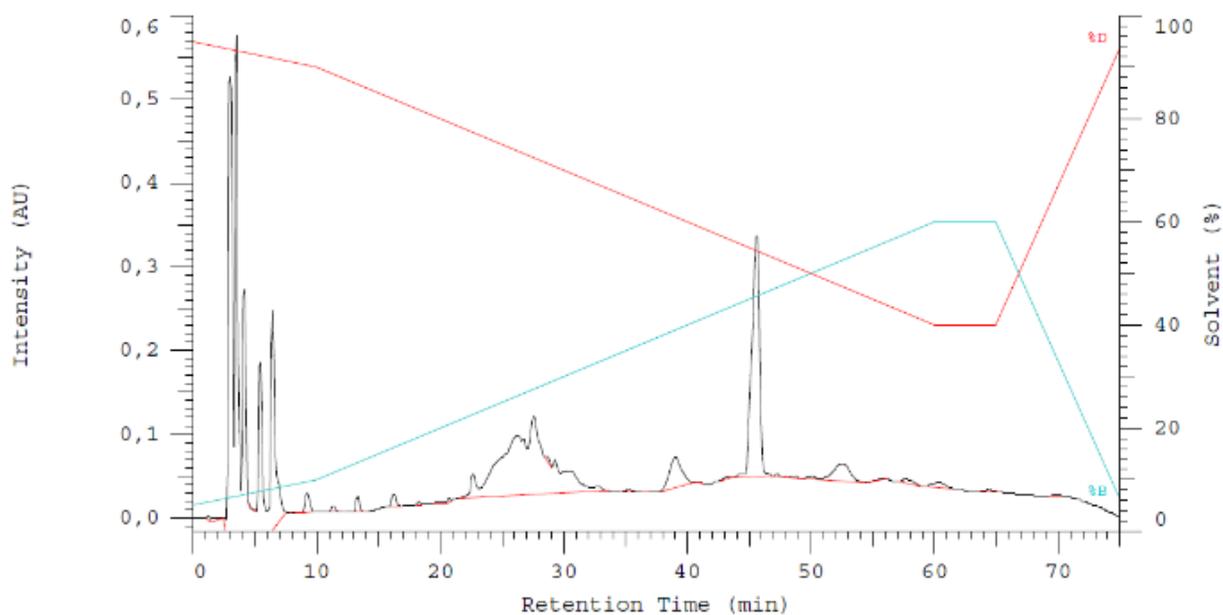


Figura B-9: Cromatograma individual del extracto de veneno realizado con glicerol 10 % CIP

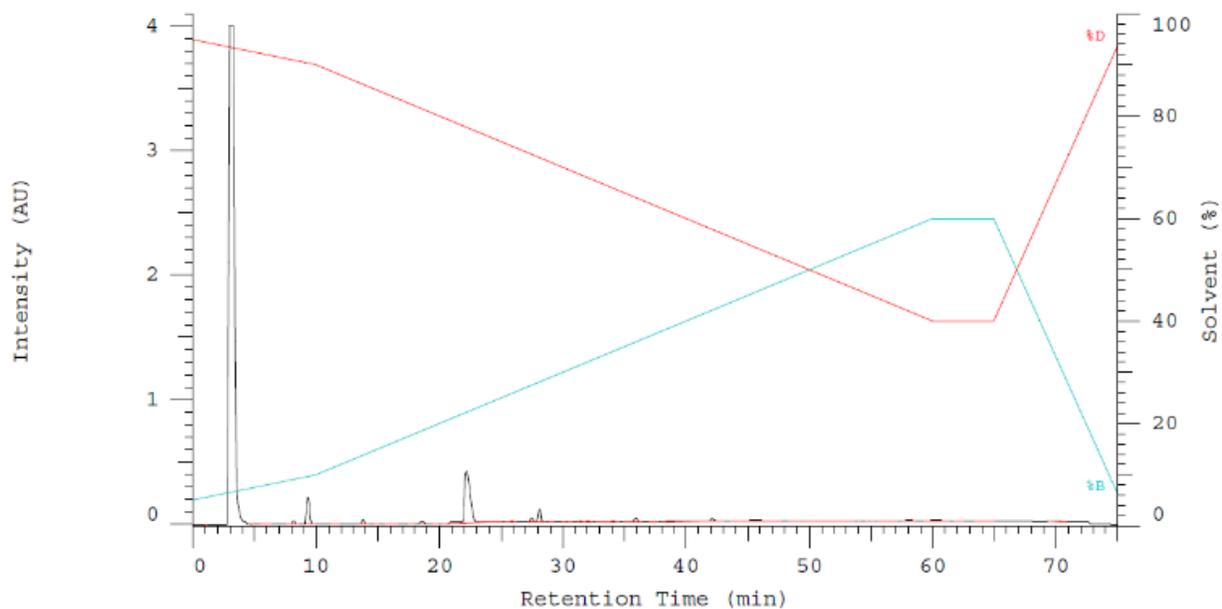


Figura B-10: Cromatograma individual del blanco Glicerol 10 % CIP

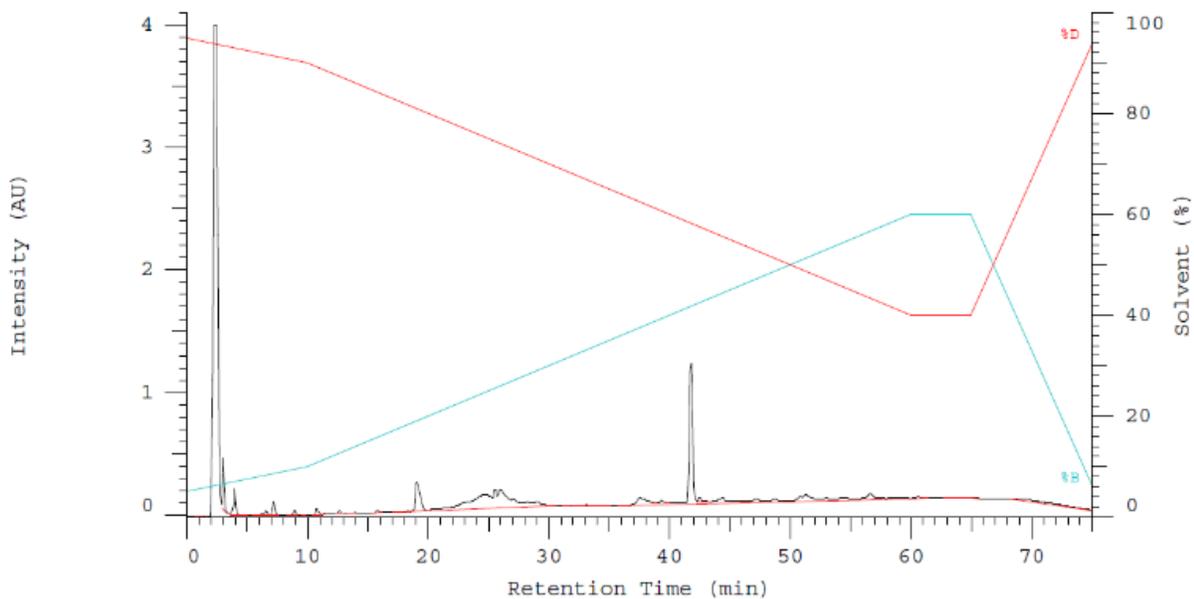


Figura B-11: Cromatograma individual del extracto de veneno realizado con Glicerol 10% Sigma®

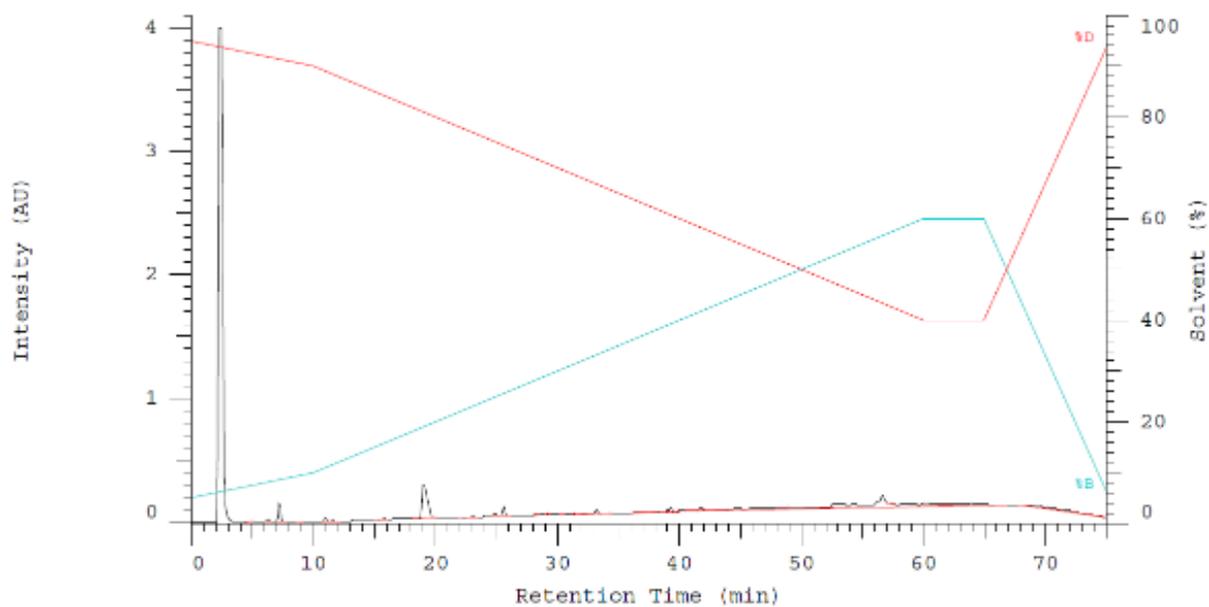


Figura B-12: Cromatograma individual del blanco Glicerol 10% Sigma®

C. Anexo: Cromatograma de Michael Choromanski

Figura C-1: Cromatografía de HPLC-RP C18 del veneno de *P. volitans* extraída con PBS 1X y coctel de inhibidores por Choromanski (82).

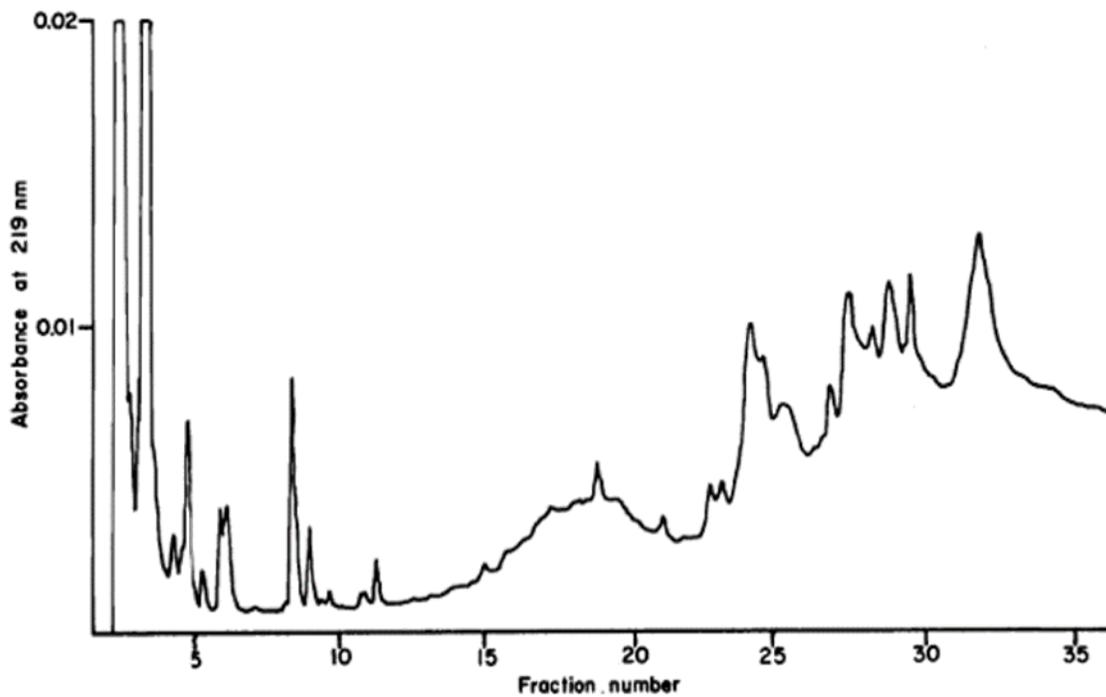
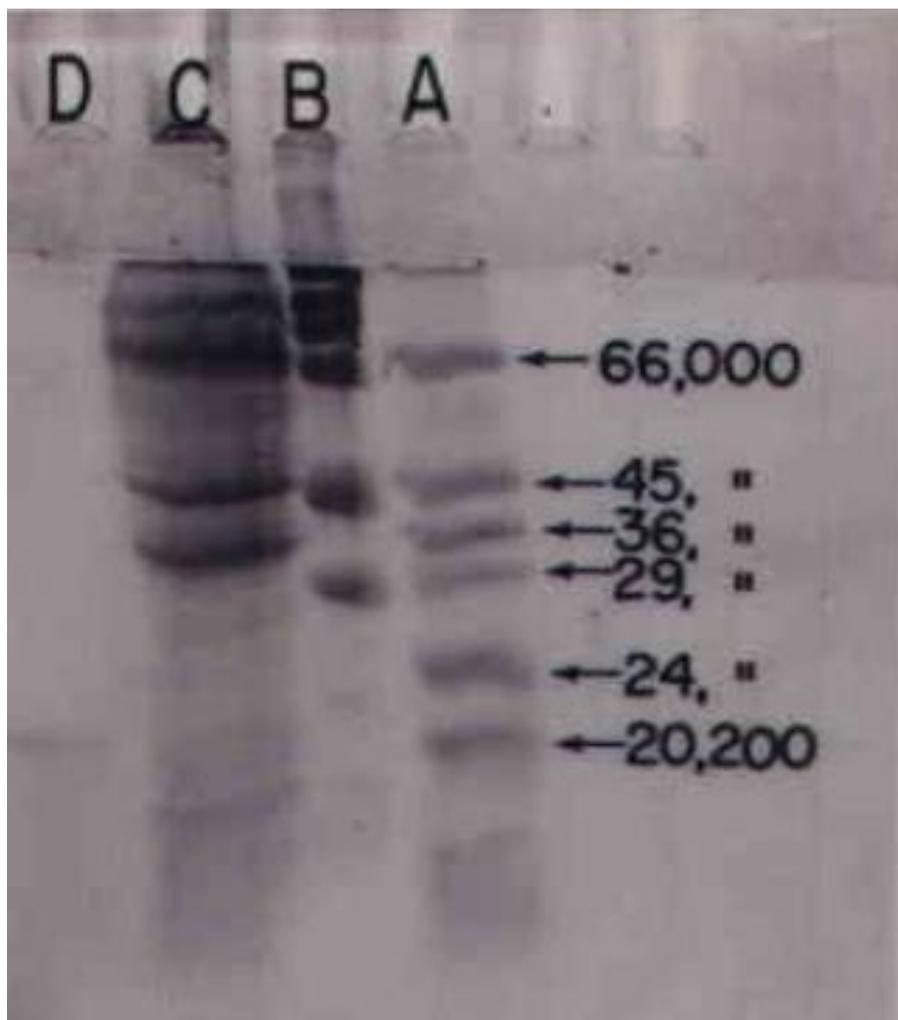


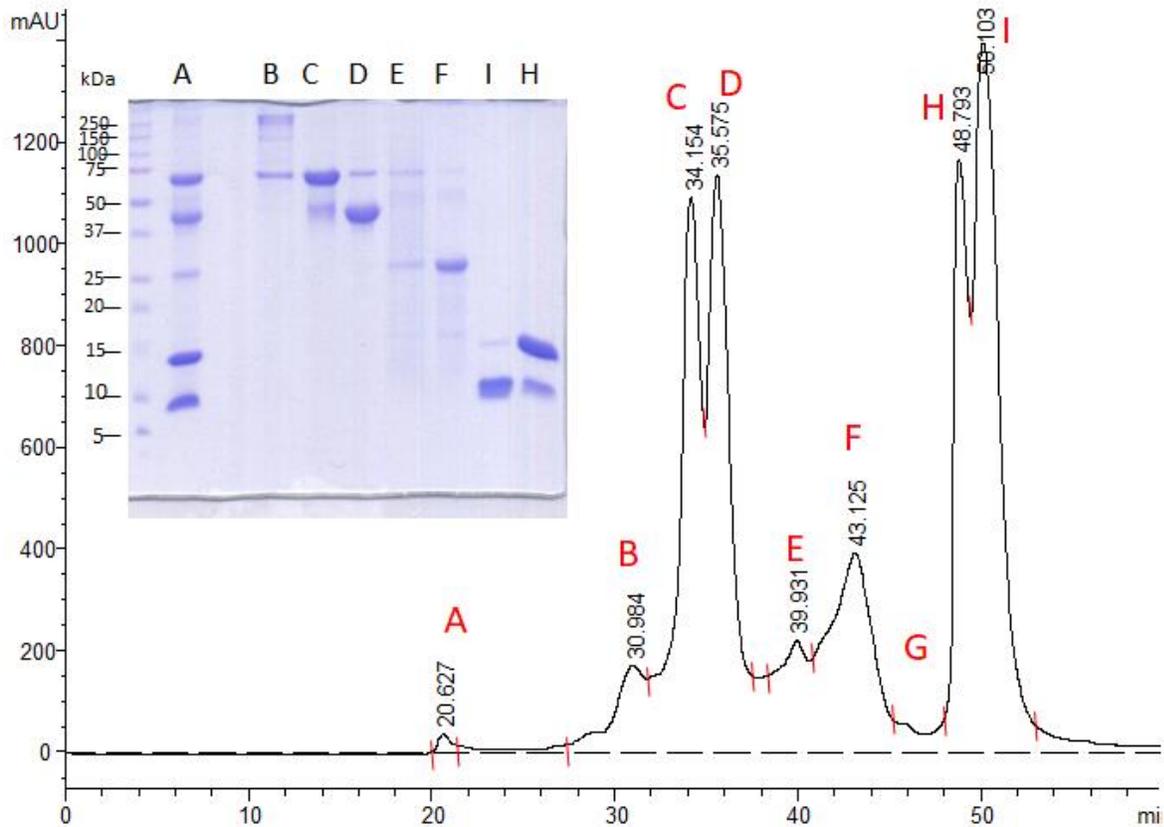
Figura C-2: SDS-PAGE extracto de veneno de Choromanski 1985



A y B. Marcador de peso molecular, C, extracto de veneno con inhibidores y liofilizado, D, coctel de inhibidores de proteasas (inhibidor de tripsina de soja (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) para inhibir serinproteasas, EDTA 1 mM para metaloproteasas, pepstatina A 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para inhibir carboxipeptidasas).

D. Anexo: Calibración de la columna de cromatografía de exclusión por HPLC

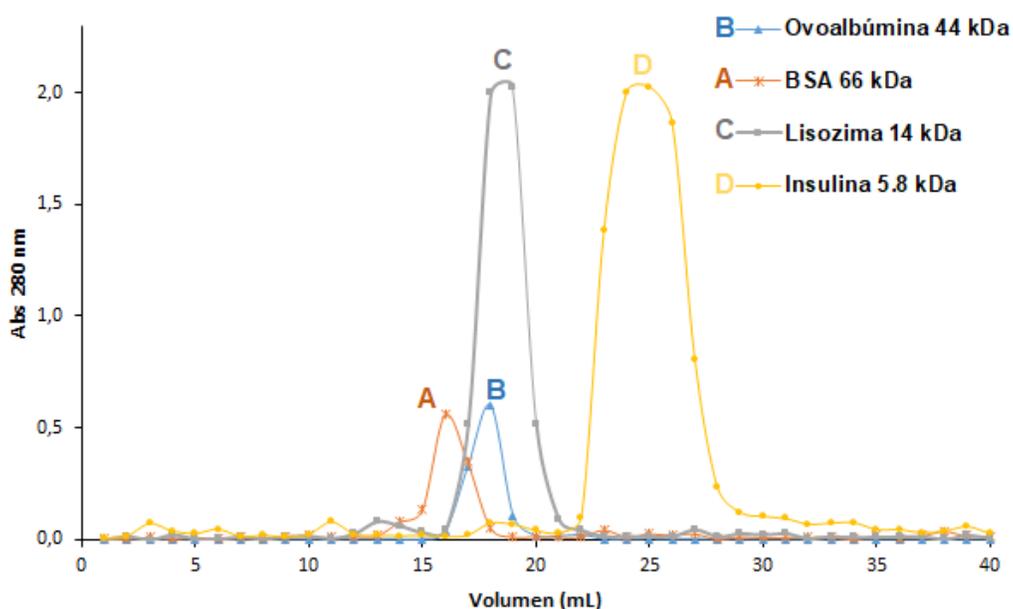
Figura D-1: Calibración con patrones moleculares de la columna de exclusión HPLC



A. Marcadores combinados, B/C. BSA 66 kDa, D. Ovoalbúmina 48 kDa, E/F. Tripsinógeno 29 kDa, H. Lisozima 14 kDa, I. Crotamina 4.8 kDa. Columna: 5Diol 300 Waters 7.5 x 600mm Flujo: 0.5 ml/min Buffer: Acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. La calibración de la columna fue realizada por investigadores del IBT en el grupo de investigación del Dr. Gerardo Corzo. El rango de exclusión de la columna es de 10-700 kDa.

E. Anexo: Calibración de columna abierta de exclusión Sephadex G-75

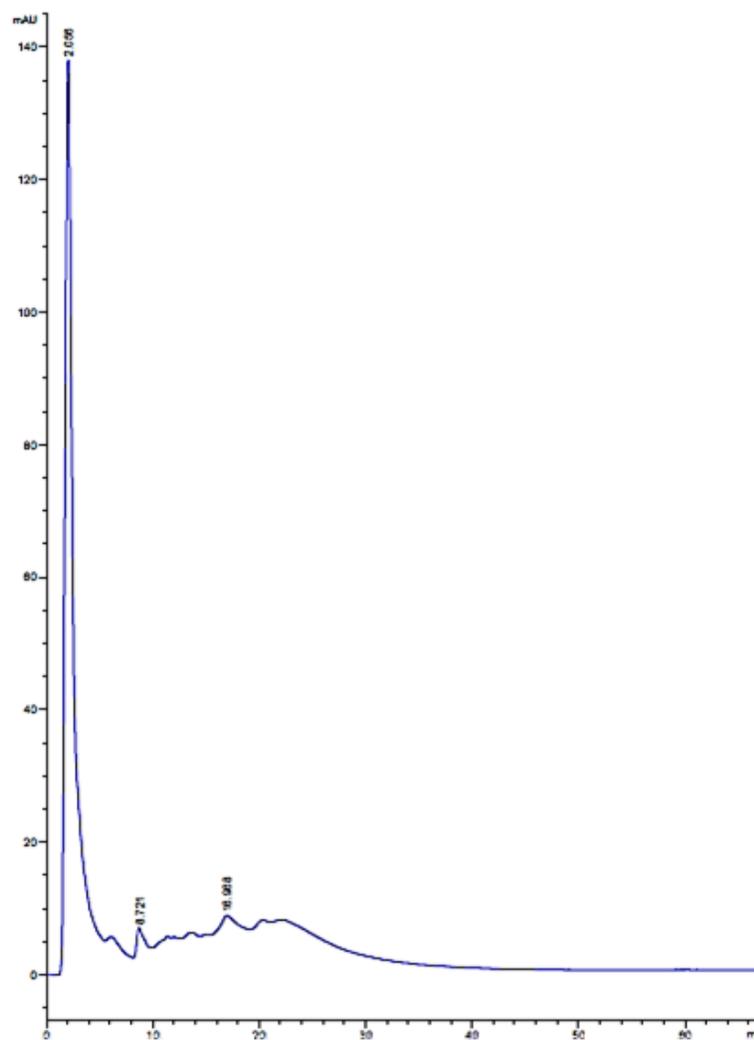
Figura E-1: Calibración con patrones moleculares de la columna abierta de exclusión Sephadex G-75



A. BSA 66 kDa, B. Ovoalbúmina 44 kDa, C. Lisozima 14 kDa, D. Insulina 5.8 kDa 21 mL de Sephadex G-75 en una columna con dimensiones de 10X310 mm, a un flujo de 1 mL/ 8,5 min con acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Límite de exclusión 80 kDa y rango de exclusión 3 – 80 kDa.

F. Anexo: Cromatografía intercambio aniónico

Figura F-1: Cromatografía de intercambio aniónico de SobEVT de *P. volitans*



G. Anexo: Inhibidor de proteasas Sigma®

Los componentes del coctel inhibidor de proteasas son: AEBSF – 4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato – serinproteasas, Aprotinina – serinproteasas, Clorhidrato de bestatina – aminopeptidasas, E-64 – N-(trans-Epoxy succinyl) -L-leucine 4-guanidinobutylamide, Sal de leupeptina hemisulfato – serin y cistein proteasas, Pepstatina A – proteasas ácidas.

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sigma-aldrich.com

Product Information

**Protease Inhibitor Cocktail
for use with mammalian cell and tissue extracts**

Catalog Number **P8340**
Storage Temperature –20 °C

Product Description

Crude cell extracts contain a number of endogenous enzymes, such as proteases and phosphatases, which are capable of degrading proteins in the extracts. The best way to increase the yield of intact proteins is to add inhibitors of those enzymes known to be present.

This protease inhibitor cocktail has been optimized and tested for mammalian cell and tissue extracts. It contains inhibitors with a broad specificity for serine, cysteine, and acid proteases, and aminopeptidases. This cocktail is supplied as a ready-to-use solution in DMSO.

Specific inhibitory properties of the components are:

- AEBSF – [4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride] – serine proteases, e.g., trypsin, chymotrypsin, plasmin, kallikrein and thrombin
- Aprotinin – serine proteases, e.g., trypsin, chymotrypsin, plasmin, and kallikrein; human leukocyte elastase, but not pancreatic elastase.
- Bestatin hydrochloride – aminopeptidases, e.g., leucine aminopeptidase and alanyl aminopeptidase.^{1,4}
- E-64 – [N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide] – cysteine proteases, e.g., calpain, papain, cathepsin B, and cathepsin L.
- Leupeptin hemisulfate salt – both serine and cysteine proteases, e.g., plasmin, trypsin, papain, and cathepsin B.
- Pepstatin A – acid proteases, e.g., pepsin, renin and cathepsin D, and many microbial aspartic proteases

Recommended Usage

One ml of the cocktail solution is recommended for the inhibition of endogenous enzymes found in 100 ml of lysate from 20 g (wet weight) of bovine liver or 10 ml of cell lysate obtained from CHO cells at a cell density of 10⁶ cells per ml. CHO cells were grown on DMEM with 10% FCS (heat inactivated).

Note: Not all lysates contain the same levels of endogenous enzymes, and it may be necessary to adjust the volume of cocktail required.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

Store the cocktail at –20 °C.

References

1. Umezawa H., *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**, 75-99 (1982).
2. Aoyagi T., et al, *Biochem. Int.*, **9**, 405-411 (1984).
3. Aoyagi T., and Umezawa, H., *Acta Biol. Med. Ger.*, **40**, 1523-1529 (1981).
4. Mumford, R. A., et al, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **103**, 565-572 (1981).

CP,AP,NDH,PHC,MAM 01/10-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

H. Anexo: Inhibidor de proteasas cOplete, EDTA-free[®]

cOplete, EDTA-free

Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in *EASYpack*

For the complete inhibition of serine and cysteine proteases during extractions from animal and plant tissues or cells, yeast and bacteria

Cat. No. 04 693 132 001

20 tablets

 Do not eat

 Version 04

Content version: January 2013

Store at +2 to +8°C

1. What this Product Does

1.1 Properties

cOplete, EDTA-free tablets inhibit a broad spectrum of serine and cysteine proteases. In contrast to other cOplete tablets they do not contain EDTA leaving the stability and the function of metal dependent proteins unaffected. The affinity purification of Poly-His tagged fusionproteins via IMAC (immobilized metal affinity chromatography) is also facilitated (no dialysis necessary).

Due to the optimized composition of the tablets they show excellent inhibition of serine and cysteine proteases and are therefore very well suited for the protection of proteins isolated from animal tissues, plants, yeast and bacteria. cOplete, EDTA-free tablets contain both irreversible and reversible protease inhibitors. Metallo and aspartic proteases are not inhibited.

1.2 Contents

20 individually packed cOplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets in foil blisters. Each tablet is sufficient for a volume of 50 ml solution.

1.3 Stability

- The tablets are stable at +2 to +8°C, stored dry, until expiration date.
- The stock solution is stable for 1–2 weeks, stored at +2 to +8°C, or at least for 12 weeks at –15 to –25° C.

1.4 Application

Used for the inhibition of serine and cysteine proteases in bacterial, yeast, plant and animal cell extracts.

For the inhibition of proteolytic activity in larger volumes, in which EDTA may interfere with protein stability or subsequent assays or purification methods (e.g., Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography [IMAC]).

2. How to Use this Product

2.1 Handling

Carefully push the tablet through the foil packaging using the base of your thumb (and not your finger nail) to prevent the breakage of tablets.

 Do not eat the tablets.

2.2 Preparation of Working Solutions

One cOplete, EDTA-free tablet is sufficient for the inhibition of the proteolytic activity in 50 ml extraction solution. If very high proteolytic activity is present, one tablet should be used for 25 ml extraction buffer. The tablets can be added directly to the extraction medium. Alternatively a stock solution (25 × conc.) can be prepared.

If it is necessary to inhibit proteolytic activity in a smaller volume we recommend to use cOplete, Mini, EDTA-free tablets (1 tablet for 10 ml extraction solution, see "Ordering Information").

2.3 Stock solution (25 × conc.)

Dissolve one cOplete, EDTA-free tablet in 2 ml redist. H₂O or in 100 mM phosphate buffer, pH 7.0.

3. Results

cOplete, EDTA-free tablets are applied to stabilize those extracts where the stability or activity of metal containing proteins should not be effected. Since EDTA interferes with IMAC (immobilized metal affinity chromatography) cOplete, EDTA-free tablets are preferentially used in the isolation process of Poly-His tagged fusion proteins. cOplete, EDTA-free tablets inhibit efficiently serine and cysteine proteases in a broad range but not metalloproteases.

Occasionally, aspartic proteases ("acid proteases") can interfere upon isolations from animal tissues or bacterial extracts (1). These proteases, however, exhibit pronounced activities only at low pH values. If extraction or single isolation steps have to be performed at this pH range the addition of pepstatin* is recommended to inhibit aspartic protease activity as a precaution.

Typical values for the inhibition of different proteases and protease mixtures by cOplete, EDTA-free tablets are shown in table 1.

Protease resp. protease mixture	Enzyme concentration (mg/ml)	pH-value	% inhibition after immediate addition to the protease	% inhibition after 60 min incubation (protease + cOplete) at +15 to +25° C
Pancreas-extract	0.02	7.8	84%	94%
Thermolysin (Metalloprotease)	0.0005	7.8	7%	10%
Chymotrypsin	0.002	7.8	90%	100%
	0.02	7.8	60%	98%
Trypsin	0.02	7.8	70%	74%
	0.002	7.8	81%	86%
Papain	0.33	7.8	74%	87%

Table 1: Inhibition of different proteases by cOplete Protease Inhibitor Tablets.

One cOplete, EDTA-free tablet was added per 50 ml incubation solution. Proteolytic activity was determined with the Roche Applied Science Universal Protease Substrate (casein, resorufin-labeled*). When extractions or single-step isolations are necessary in the acid pH range, simply include pepstatin* along with cOplete, EDTA-free tablets to ensure aspartic (acid) protease inhibition. All experiments were performed at +15 to +25°C.

* available from Roche Applied Science

I. Anexo: Análisis estadístico

Tabla I-1: ANOVA de dos vías HTR8

Table Analyzed	HTR8			
Two-way ANOVA	Ordinary			
Alpha	0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	12,29	< 0,0001	****	Yes
Tratamiento	48,38	< 0,0001	****	Yes
Dosis	35,65	< 0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	2971	20	148,5	F (20, 60) = 10,02	P < 0,0001
Tratamiento	11695	5	2339	F (5, 60) = 157,8	P < 0,0001
Dosis	8619	4	2155	F (4, 60) = 145,4	P < 0,0001
Residual	889,5	60	14,82		

Tabla I-2: Estadística HTR8, test de Dunnett múltiples comparaciones tratamientos vs. controles

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
PBS 1X cOplete®				
Control vs. 1 mg/mL	10,55	2,662 to 18,43	Yes	**
Control vs. 4 mg/mL	11,44	3,558 to 19,33	Yes	**
Control vs. 29 mg/mL	12,34	4,454 to 20,23	Yes	***
Control vs. 200 mg/mL	14,85	6,963 to 22,74	Yes	****
PBS 1X CIP				
Control vs. 1 mg/mL	18,04	10,16 to 25,93	Yes	****
Control vs. 4 mg/mL	6,753	-1,134 to 14,64	No	ns
Control vs. 29 mg/mL	14,56	6,674 to 22,45	Yes	****

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
Control vs. 200 mg/mL	6,992	-0,8945 to 14,88	No	ns
PBS 1X Sigma®				
Control vs. 1 mg/mL	4,817	-3,069 to 12,70	No	ns
Control vs. 4 mg/mL	2,309	-5,578 to 10,19	No	ns
Control vs. 29 mg/mL	32,98	25,10 to 40,87	Yes	****
Control vs. 200 mg/mL	22,47	14,58 to 30,36	Yes	****
Glicerol 10% CIP				
Control vs. 1 mg/mL	14,64	6,758 to 22,53	Yes	****
Control vs. 4 mg/mL	14,64	6,758 to 22,53	Yes	****
Control vs. 29 mg/mL	30,28	22,39 to 38,16	Yes	****
Control vs. 200 mg/mL	31,48	23,60 to 39,37	Yes	****
Glicerol 10%				
Control vs. 1 mg/mL	8,71	0,8234 to 16,60	Yes	*
Control vs. 4 mg/mL	16,42	8,529 to 24,30	Yes	****
Control vs. 29 mg/mL	39,53	31,65 to 47,42	Yes	****
Control vs. 200 mg/mL	37,03	29,14 to 44,91	Yes	****
Glicerol 10% Sigma ®				
Control vs. 1 mg/mL	16,92	9,035 to 24,81	Yes	****
Control vs. 4 mg/mL	18,83	10,95 to 26,72	Yes	****
Control vs. 29 mg/mL	30,63	22,74 to 38,52	Yes	****
Control vs. 200 mg/mL	36,72	28,84 to 44,61	Yes	****

Tabla I-3: Estadística HTR8, test de Tukey múltiples comparaciones tratamientos vs. tratamientos

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
PBS 1X cOmlplete® vs. PBS 1X CIP	3,766	-0,3723 to 7,905	No	ns
PBS 1X cOmlplete® vs. PBS 1X Sigma®	25,35	21,21 to 29,48	Yes	****
PBS 1X cOmlplete® vs. Glicerol 10% CIP	24,71	20,57 to 28,84	Yes	****
PBS 1X cOmlplete® vs. Glicerol 10%	24,17	20,03 to 28,31	Yes	****
PBS 1X cOmlplete® vs. Glicerol 10% Sigma ®	28,79	24,65 to 32,92	Yes	****
PBS 1X CIP vs. PBS 1X Sigma®	21,58	17,44 to 25,72	Yes	****
PBS 1X CIP vs. Glicerol 10% CIP	20,94	16,80 to 25,08	Yes	****
PBS 1X CIP vs. Glicerol 10%	20,4	16,26 to 24,54	Yes	****
PBS 1X CIP vs. Glicerol 10% Sigma ®	25,02	20,88 to 29,16	Yes	****
PBS 1X Sigma® vs. Glicerol 10% CIP	-0,6397	-4,778 to 3,499	No	ns

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
PBS 1X Sigma® vs. Glicerol 10%	-1,179	-5,318 to 2,960	No	ns
PBS 1X Sigma® vs. Glicerol 10% Sigma ®	3,439	-0,6993 to 7,578	No	ns
Glicerol 10% CIP vs. Glicerol 10%	-0,5391	-4,678 to 3,600	No	ns
Glicerol 10% CIP vs. Glicerol 10% Sigma ®	4,079	-0,05958 to 8,218	No	ns
Glicerol 10% vs. Glicerol 10% Sigma ®	4,618	0,4796 to 8,757	Yes	*

Tabla I-4: ANOVA de una vía línea HeLa

Repeated measures ANOVA summary	
Assume sphericity?	No
F	38,67
P value	0,0086
P value summary	**
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,2413
R square	0,9508

Was the matching effective?	
F	0,5608
P value	0,585
P value summary	ns
Is there significant matching (P < 0.05)?	No
R square	0,004575

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	2218	6	369,7	F (1,448, 2,896) = 38,67	P = 0,0086
Individual (between rows)	10,72	2	5,361	F (2, 12) = 0,5608	P = 0,5850
Residual (random)	114,7	12	9,559		
Total	2344	20			

Tabla I-5: Estadística HeLa, test de Dunnett múltiples comparaciones control vs. tratamientos

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 4	0,479	-10,75 to 11,71	No	ns
Control vs. 20	-2,521	-10,09 to 5,045	No	ns
Control vs. 40	13,87	-3,760 to 31,50	No	ns
Control vs. 60	13,3	-0,9295 to 27,52	No	ns
Control vs. 80	22,62	2,480 to 42,77	Yes	*

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 100	24,4	10,64 to 38,16	Yes	*

Tabla I-6: ANOVA de una vía línea HT-29

Repeated measures ANOVA summary	
Assume sphericity?	No
F	44,99
P value	0,0088
P value summary	**
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,2255
R square	0,9574

Was the matching effective?	
F	11,74
P value	0,0015
P value summary	**
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
R square	0,07689

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	3229	6	538,2	F (1,353, 2,706) = 44,99	P = 0,0088
Individual (between rows)	280,9	2	140,5	F (2, 12) = 11,74	P = 0,0015
Residual (random)	143,6	12	11,96		
Total	3654	20			

Tabla I-7: Estadística HT-29, test de Dunnet múltiples comparaciones control vs. tratamientos

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 4	6,476	-14,80 to 27,76	No	ns
Control vs. 20	10,69	-7,260 to 28,64	No	ns
Control vs. 40	24,66	5,263 to 44,05	Yes	*
Control vs. 60	6,152	-0,2684 to 12,57	No	ns
Control vs. 80	28,69	9,105 to 48,28	Yes	*
Control vs. 100	35,2	22,46 to 47,93	Yes	**

Tabla I-8: ANOVA de una vía neuronas hipocampales ratas Wistar

Repeated measures ANOVA summary	
Assume sphericity?	No

Repeated measures ANOVA summary	
F	83,39
P value	0,0016
P value summary	**
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,273
R square	0,9766

Was the matching effective?	
F	0,05978
P value	0,9423
P value summary	ns
Is there significant matching (P < 0.05)?	No
R square	0,0002333

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	9006	6	1501	F (1,638, 3,276) = 83,39	P = 0,0016
Individual (between rows)	2,152	2	1,076	F (2, 12) = 0,05978	P = 0,9423
Residual (random)	216	12	18		
Total	9224	20			

Tabla I-9: Estadística neuronas hipocampales, test de Dunnet múltiples comparaciones control vs. tratamientos

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 4	13,79	-4,288 to 31,87	No	ns
Control vs. 20	16,01	6,091 to 25,92	Yes	*
Control vs. 40	32,23	20,69 to 43,76	Yes	**
Control vs. 60	52,53	19,18 to 85,87	Yes	*
Control vs. 80	49,99	24,22 to 75,77	Yes	*
Control vs. 100	57,42	40,96 to 73,88	Yes	**

Tabla I-10: ANOVA de una vía HTB-26

Repeated measures ANOVA summary	
Assume sphericity?	No
F	202,1
P value	0,0016
P value summary	**
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,2141

Repeated measures ANOVA summary	
R square	0,9902

Was the matching effective?	
F	0,09442
P value	0,9106
P value summary	ns
Is there significant matching (P < 0.05)?	No
R square	0,0001541

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	13429	6	2238	F (1,284, 2,569) = 202,1	P = 0,0016
Individual (between rows)	2,091	2	1,045	F (2, 12) = 0,09442	P = 0,9106
Residual (random)	132,9	12	11,07		
Total	13564	20			

Tabla I-11: Estadística HTB-26, test de Dunnet múltiples comparaciones control vs. tratamientos

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 6,25	4,197	-5,458 to 13,85	No	ns
Control vs. 12,5	7,148	-5,656 to 19,95	No	ns
Control vs. 25	10,49	-2,590 to 23,57	No	ns
Control vs. 50	13,44	0,2857 to 26,60	Yes	*
Control vs. 100	51,67	19,09 to 84,26	Yes	*
Control vs. 200	70,69	69,45 to 71,92	Yes	****

Tabla I-12: ANOVA de una vía PC3

Repeated measures ANOVA summary	
Assume sphericity?	No
F	12,44
P value	0,0268
P value summary	*
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,2898
R square	0,8615

Was the matching effective?	
F	0,6507

Was the matching effective?	
P value	0,5392
P value summary	ns
Is there significant matching ($P < 0.05$)?	No
R square	0,01479

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	954,6	6	159,1	$F(1,739, 3,477) = 12,44$	$P = 0,0268$
Individual (between rows)	16,64	2	8,318	$F(2, 12) = 0,6507$	$P = 0,5392$
Residual (random)	153,4	12	12,78		
Total	1125	20			

Tabla I-13: Estadística PC3, test de Dunnett múltiples comparaciones control vs. tratamientos

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 6,25	-14,89	-37,21 to 7,443	No	ns
Control vs. 12,5	-12,98	-38,92 to 12,95	No	ns
Control vs. 25	-14,16	-21,88 to -6,445	Yes	*
Control vs. 50	-9,181	-25,69 to 7,332	No	ns
Control vs. 100	-5,934	-21,95 to 10,08	No	ns
Control vs. 200	3,803	-3,715 to 11,32	No	ns

J.Anexo: Spots determinados en electroforesis bidimensional del EV

El análisis del gel se realizó con el programa PDQuest Advanced 8.0.1

Figura J-1: Electroforesis bidimensional EV de *P. volitans* SSP

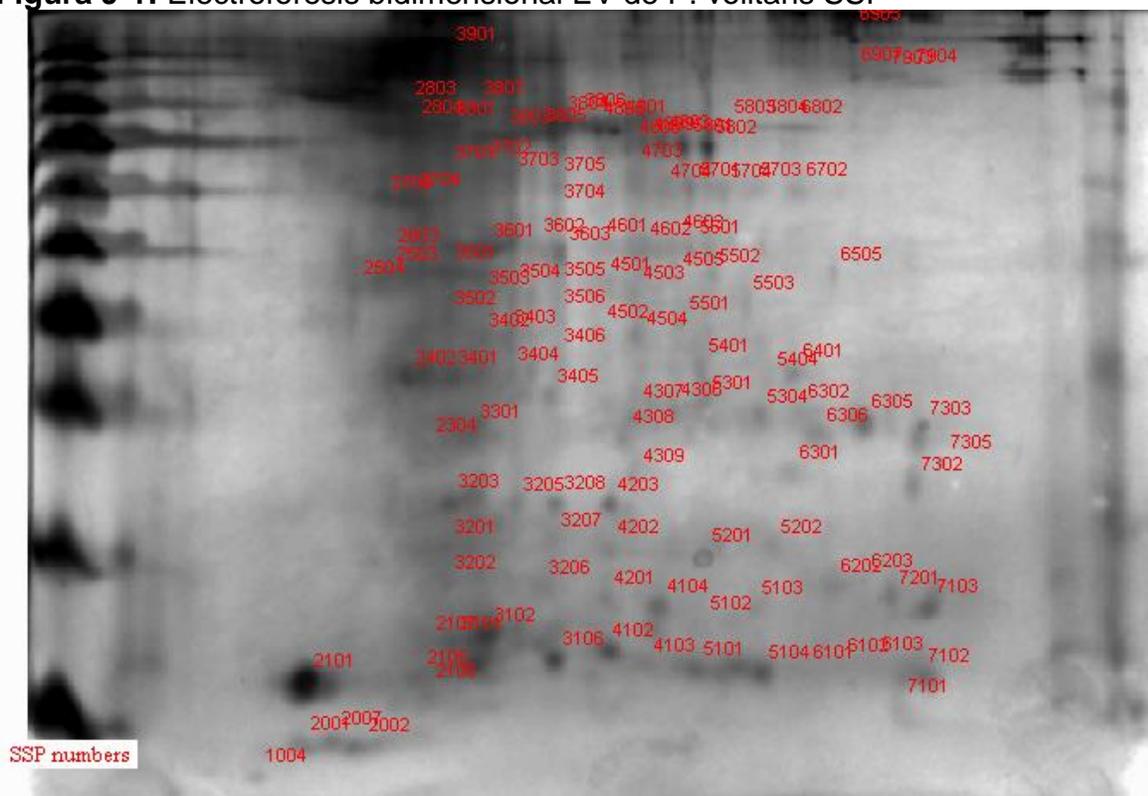


Figura J-2: Pesos moleculares y pI de spots identificados en electroforesis 2D

SSP	Da	pI	SSP	Da	pI	SSP	Da	pI
1004	111.023	3.0	3602	566.200	5.7	5104	129.000	7.6
2001	116.289	3.0	3603	550.513	6.0	4201	192.374	7.1
2002	116.033	4.5	3701	732.884	5.2	5202	199.000	7.7
2007	117.299	4.3	3702	746.787	5.4	5301	327.658	7.1
2101	127.000	4.1	3703	715.868	5.6	5304	314.176	7.6
2105	127.684	5.0	3704	638.140	5.9	5401	373.000	7.1
2106	126.000	5.1	3705	702.540	5.9	5404	357.234	7.6
2107	142.856	5.1	3801	843.164	5.2	5501	433.825	6.9
2304	282.990	5.1	3803	823.759	5.5	5502	510.853	7.2
2402	358.000	4.9	3804	856.323	6.0	5503	465.000	7.5
2503	513.225	4.7	3805	827.000	5.8	5601	563.940	7.0
2504	490.000	4.5	3806	866.061	6.1	5701	691.000	7.0
2503	548.854	4.7	3807	894.976	5.4	5703	689.420	7.5
2704	667.037	4.9	3901	1.047.293	5.2	5704	684.000	7.3
2705	657.936	4.7	4102	139.518	6.3	5801	804.894	6.9
2803	897.045	4.9	4103	132.000	6.7	5802	802.000	7.2
2804	849.718	4.9	4104	162.000	6.8	5803	849.909	7.3
2905	1.149.267	5.1	4201	167.000	6.3	5804	849.684	7.6
3101	142.856	5.2	4202	198.784	6.3	6101	129.000	8.0
3102	147.000	5.5	4203	229.000	6.4	6102	132.000	8.2
3106	135.378	5.9	4306	320.000	6.9	6103	133.000	8.5
3201	198.073	5.2	4307	318.012	6.5	6202	173.000	8.2
3202	175.439	5.2	4308	292.711	6.5	6203	176.260	8.3
3203	230.988	5.2	4309	252.800	6.5	6301	256.000	7.9
3205	228.530	5.6	4501	494.902	6.3	6302	318.249	7.9
3206	172.238	5.8	4502	420.000	6.3	6305	308.000	8.4
3207	202.585	5.9	4503	480.232	6.5	6306	293.000	8.1
3208	230.000	6.0	4504	411.000	6.6	6401	366.603	7.9
3301	297.000	5.4	4505	505.773	6.9	6505	513.832	8.1
3401	358.000	5.2	4601	568.858	6.2	6702	691.561	7.9
3402	408.522	5.4	4602	560.922	6.6	6802	848.227	7.9
3403	412.000	5.6	4603	573.164	6.9	6902	1.131.607	8.3
3404	363.122	5.6	4703	736.335	6.5	6903	1.109.912	8.3
4305	336.065	5.9	4704	686.105	6.8	6907	985.232	8.3
3406	387.915	5.9	4801	850.000	6.5	7101	123.000	8.7
3501	518.000	5.2	4803	810.924	6.8	7102	128.000	8.8
3502	441.928	5.2	4805	845.964	6.2	7103	162.377	8.8
3503	473.940	5.4	4808	800.090	6.5	7201	167.000	8.6

SSP	Da	pl	SSP	Da	pl	SSP	Da	pl
3504	483.051	5.6	4809	807.782	6.7	7302	245.698	8.7
3505	487.936	5.9	5101	130.179	7.0	7303	301.115	8.8
3506	443.977	5.9	5102	153.236	7.1	7305	266.000	9.0
3601	558.302	5.5	5103	161.000	7.6	7903	976.796	8.5
						7904	984.436	8.7