

# Potencial antitumoral de *Lansbermin-II*, una toxina aislada del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii*

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Javeriana Cali, Facultad de Ingeniería y Ciencias

## Resumen

El cáncer es considerado la segunda causa más común de muerte a nivel mundial. Los tratamientos existentes como la quimioterapia pueden llegar a afectar células sanas en el proceso, resultando en efectos secundarios negativos que reducen la calidad de vida de los pacientes. En el presente trabajo se evaluó, por primera vez, el potencial antitumoral de *Lansbermin-II*, una desintegrina obtenida a partir del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii lansbergii* en diversas líneas cancerígenas, incluyendo células adherentes (Neuroblastoma, Caski, Hela y Fibroblastos Gingivales) y no adherentes (U937, molt-4, K562 y Linfocitos sanos). *Lansbermin-II* presentó un efecto citotóxico bajo en las líneas celulares no adherentes, comparado con el efecto sobre las líneas celulares adherentes. Particularmente, la desintegrina redujo la viabilidad de células de Neuroblastoma hasta en un 90% a una dosis de 200 µg/mL e inhibió la migración celular a 80 µg/mL. *Lansbermin-II* no presentó citotoxicidad hacia las células no tumorales de Fibroblastos Gingivales. Estos resultados muestran un alto potencial antitumoral de *Lansbermin-II*, el cual merece ser estudiado en más detalle en posteriores investigaciones en la búsqueda de tratamientos selectivos para el cáncer.

Palabras Clave: Veneno de serpiente, Integrinas, Agentes antitumorales.

## Abstract

Cancer is considered the second most common cause of death worldwide. Existing treatments such as chemotherapy are not selective and attack tumor cells and healthy cells alike, resulting in negative side effects that reduce patients' quality of life. In the present work, was evaluated for the first time the antitumor potential of *Lansbermin-II*, a disintegrin obtained from the venom of the snake *Porthidium lansbergii lansbergii* in various cancer lines, including adherent cells (Neuroblastoma, Caski, Hela and Gingival Fibroblasts) and non-adherent (U937, molt-4, K562 and healthy lymphocytes). *Lansbermin-II* exhibited a low cytotoxic effect on non-adherent cell lines, compared to the effect on adherent cell lines. In particular, this disintegrin reduced Neuroblastoma cell viability by up to 90% at a dose of 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and inhibited cell migration to 80  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . *Lansbermin-II* did not show cytotoxicity to non-tumor cells of Gingival Fibroblasts. These results show a high antitumor potential of *Lansbermin-II*, which deserves to be further explored in the search for selective cancer treatments.

Keywords: Snake venoms, Integrins, Antitumor agents.

## Introducción

El cáncer ocurre debido a distintas alteraciones moleculares y celulares, permitiendo que las células proliferen acumulando mutaciones que no pudieron ser reparadas, adquiriendo un fenotipo maligno (Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, & Mukhtar, 2015). Este proceso se conoce como carcinogénesis y generalmente consta de tres fases: iniciación, promoción y progresión. La fase de iniciación consta de cambios genotípicos irreversibles y puede ocurrir por la mutación de varios genes o de un gen crítico sin que las células sufran cambios morfológicos. La promoción, a diferencia de la iniciación, es reversible y es un proceso que involucra factores epigenéticos y ocurre cuando células iniciadas se expanden por clonación formando un tumor benigno visible. Por último, la fase de progresión es donde ocurre la transformación del tumor benigno a un tumor maligno, debido a la acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas que las células adquirieron en las fases anteriores (Barrett, 1993; Glick & Yuspa, 1993; Siddiqui et al., 2015).

Debido al aumento acelerado en los casos de cáncer, con un estimado de 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes para el 2018 (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2015), se ha incrementado la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos capaces de proporcionar un tratamiento más seguro en comparación con los tratamientos actuales. Estos en su mayoría incluyen procedimientos invasivos en los pacientes, como la cirugía para la extracción de tumores, la aplicación de quimioterapia con catéter y el uso de fármacos citotóxicos no selectivos como el Cisplatino<sup>®</sup>, el Paclitaxel<sup>®</sup> y la Doxorubicina<sup>®</sup>, los cuales generan efectos secundarios negativos para la salud de los pacientes (Calderon et al., 2014; Singla, Garg, & Aggarwal, 2002; Yoo & Park, 2000).

Los venenos de serpiente constituyen una fuente de moléculas con propiedades potencialmente farmacológicas. En éstos se pueden encontrar péptidos, enzimas, aniones, aminoácidos, carbohidratos, y lípidos. Algunos de los componentes proteicos incluyen fosfolipasas A2 (PLA2), L-aminoácido oxidasas, C-lectinas, desintegrinas y metaloproteasas (SVMP) (Calvete et al., 2005; Cañas et al.; 2016). Un creciente número de estos componentes ha demostrado efectos antitumorales *in vitro* selectivos sobre diferentes líneas cancerígenas. Un ejemplo es la *Pllans-II*, una PLA2 del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* (Schlegel, 1841), que mostró efectos pro-apoptóticos sobre líneas de cáncer cervical (Hela) sin afectar células no tumorigénicas MCF 10A y HUVEC (Jiménez-Charris et al., 2019), y la desintegrina *Lansbermin-1* aislada del mismo veneno, la cual inhibió la adhesión y la migración de células de cáncer de mama, sin afectar células no tumorigénicas de mama y pulmón (Montealegre-Sánchez et al., 2019). Esta inhibición se asoció con la interacción de la desintegrina con integrinas con subunidades tipo  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  mediante su motivo RGD.

En ese sentido, diversos estudios han demostrado la actividad antitumoral de desintegrinas de venenos de serpiente como *Tzabcanin*, *Lebein*, *Vicrostatin* y *Obtustatin*. Estas toxinas han presentado propiedades antitumorales sobre líneas celulares de Melanoma(A-375) y Pulmón (A-549), Melanoma(SK-MEL-28 y LU-1205), Ovario (OVCAR3, SKOV3), y Fibroblasto (S-180) respectivamente ((Ghazaryan et al., 2015; Hammouda et al., 2016; Saviola, Burns, Mukherjee, & Mackesy, 2016; Swenson, Markland, & Minea, 2016), inhibiendo la migración, viabilidad, y adhesión celular, Teniendo en cuenta estos antecedentes en este estudio se planteó purificar una desintegrina del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii* y evaluar su actividad antitumoral sobre líneas celulares de leucemia (no adherentes), y células de cáncer adherentes (HeLa, Caski y Neuroblastoma), con respecto a células no tumorigénicas como los Linfocitos y los Fibroblastos Gingivales.

## Métodos

### Venenos

El pool de venenos de *Porthidium lansbergii lansbergii* se hizo con cantidades iguales de venenos obtenidos de doce especímenes encontrados en tres municipios del Departamento del Atlántico (Colombia): Juan de Acosta, Piojó y Baranoa. El pool de venenos fue centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante con las proteínas fue secado mediante el uso de centrifugación al vacío (“SpeedVac”) y fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. La autorización para la recolección de veneno fue proporcionada por la Corporación Autónoma Regional del Atlántico - C.R.A., Resolución No. 000187-2015, para fines de investigación científica no comercial.

### Purificación de *Lansbermin-II*

Se disolvieron dos miligramos del pool de venenos en 200  $\mu\text{L}$  de agua que contenía ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA; solución A) y se sometieron a cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), en una columna Zorbax SB-C18 ( $250 \times 4,6$  mm, diámetro de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ; Agilent Technologies, Inc., EEUU), utilizando un

cromatógrafo Agilent 1260 Infinity. Las condiciones de elución se siguieron de acuerdo con el método descrito por Jiménez-Chárris *et al* (2015) con un flujo de 1 mL/min en un gradiente hacia la solución B (acetonitrilo que contiene 0.1% de TFA), como sigue: 0% B por 5 min, 0-15% B durante 10 min, 15-45% B durante 60 min, 45-70% de B durante 10 min y 70% de B durante 9 min. Los eluyentes se visualizaron a 215 nm usando el software EZ Chrom Elite (Agilent Technologies, Inc. 2006). La fracción correspondiente a *Lansbermin-II* se recogió manualmente, se secó por centrifugación al vacío y se almacenó a -20 °C. La pureza de *Lansbermin-II* se evaluó mediante SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida al 12%. Las muestras se procesaron en condiciones reductoras añadiendo 5% de 2-mercaptoetanol al buffer Laemmli e incubando a 100 °C durante 5 min. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y posteriormente con nitrato de plata.

### **Cultivos celulares**

Se obtuvieron líneas celulares de leucemia (Molt-4, U937, K562) y de carcinoma de cuello uterino (HeLa y CaSki) de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, EE. UU.). Las células de Linfocitos se adquirieron a través de la extracción de sangre del brazo de un donante aparentemente sano. A la muestra de sangre se añadió el doble del volumen de HBSS (2:1) y el volumen total se dividió en tubos falcon de 15 mL que poseían 3 mL de Histopaque®-1077 por cada 5 mL de HBSS añadido. Luego se centrifugó a 2500 rpm por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se descartó la fase amarilla en el tubo (macrófagos) y con micropipeta se extrajo la capa blanca (Linfocitos), la cual se depositó en un falcon de 50 mL, al que se le agregó el doble del volumen de HBSS de la cantidad de Linfocitos obtenidos y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante y los Linfocitos obtenidos se mantuvieron en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomycin. Adicionalmente, se utilizaron células de Neuroblastoma y Fibroblastos Gingivales no tumorigénicos los cuales fueron donados por el grupo de Farmacología de la Universidad del Valle a cargo del profesor Oscar Gutiérrez.

Todas las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. Las células de Fibroblastos Gingivales se mantuvieron como un cultivo en monocapa en medio EMEM suplementado con SFB al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 mg/mL. Las células HeLa se mantuvieron en medio DMEM, suplementado con EGF 100 µg/mL, hidrocortisona 1 mg/mL e insulina 10 mg/mL con SFB al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 mg/mL. Las células de neuroblastoma se mantuvieron en medio DMEM/F12, suplementado con EGF 100 µg/mL, hidrocortisona 1 mg/mL e insulina 10 mg/mL con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin. Las células de CaSki se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sodio, 1 mM de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin.

### **Ensayo de viabilidad celular**

La viabilidad de los cultivos celulares tratados con *Lansbermin-II* se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difenil tetrazolio). Las células adherentes ( $4 \times 10^4$  células / pozo) y las células no adherentes ( $1 \times 10^5$  células / pozo) se sembraron en microplacas de 96 pozos. Las células se incubaron con medio completo en ausencia (control negativo) o presencia de concentraciones seriadas de *Lansbermin-II* (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 o 1.6 y 0.8  $\mu\text{g/mL}$ ) para células adherentes, y (100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 y 1.6  $\mu\text{g/mL}$ ) para células no adherentes. Luego, se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> y se añadieron 20  $\mu\text{L}$  en cada pozo de MTT (5 mg/mL), y se incubaron durante 3 h a 37 °C. Los cristales de formazán se disolvieron agregando 100  $\mu\text{L}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía SDS al 10% y 0.01 M HCl. La absorbancia se leyó después de 18 h a 570nm en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad iMark microplate absorbance reader™ –EE. UU.). Cisplatin® (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 o 1.6 y 0.8  $\mu\text{g/mL}$ ), un medicamento comercial utilizado para el tratamiento del cáncer, se utilizó como control positivo, posteriormente se halló el porcentaje viabilidad celular usando la fórmula (KARAKAŞ et al 2017): % Viabilidad Celular = (Absorbancia tratamiento \*100) / Absorbancia Control). El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la fórmula % Citotoxicidad = 100- Viabilidad Celular).

### **Ensayo del cierre de la herida (“wound healing”)**

La inhibición de *Lansbermin-II* sobre la migración de células de neuroblastoma se evaluó mediante el ensayo del cierre de la herida (“wound healing”) descrito en (Yue, Leung, Mak, & Wong, 2010). Brevemente, se sembraron un total de  $5 \times 10^4$  células por pozo, en placas de 24 pozos, hasta que alcanzaran la confluencia completa. Después de 24 h de incubación se realizó una herida sobre la monocapa con una punta de pipeta de plástico de 10  $\mu\text{L}$  y se realizó el cambio del medio de cultivo. Después de este proceso, se agregaron 80  $\mu\text{g/mL}$  de *Lansbermin-II* o medio de cultivo (grupo de control) a cada línea celular y se incubó durante 24 h. Se tomaron fotografías de cada pozo al inicio (t0) y a las 24 h utilizando un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100, Japón). Se utilizó el programa Image J para calcular el área inicial de la herida y el área a las 24 h de exposición al tratamiento y en las células control (sin tratamiento). Finalmente, se halló compararon las áreas de las heridas y se calculó el porcentaje de cierre usando la formula (Porcentaje de cierre = (área a las 0 h – área a las 24 h)/ área a las 0 h)\*100).

### **Análisis estadístico**

Todos los experimentos de citotoxicidad se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE. Las diferencias significativas entre los tratamientos con

*Lansbermin-II* y los controles se determinaron mediante la prueba ANOVA de dos vías, seguido de la prueba posterior de Bonferroni con el software GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EE. UU.), donde los valores de \*  $p < 0.05$ , y \*\*\*  $p < 0.001$  se consideraron significativos.

## Resultados

### Purificación de *Lansbermin-II*

La fracción que eluyó como un pico único a los 37 minutos en el perfil de cromatografía líquida en fase reversa RP-HPLC (Fig. 1), apareció como dos bandas en la electroforesis SDS-PAGE realizada en condiciones reducidas: la primera con un peso de 66 kDa y la segunda 14,2 kDa (Fig. 2). Esta proteína caracterizada como una desintegrina por Jiménez-Charris et al., (2015) y fue nombrada *Lansbermin-II* en secuencia a otra desintegrina del mismo veneno caracterizada previamente y siguiendo la nomenclatura propuesta por McLane y Paquette-Straub (McLane y Paquette-Straub 2007; McLane, 2008).

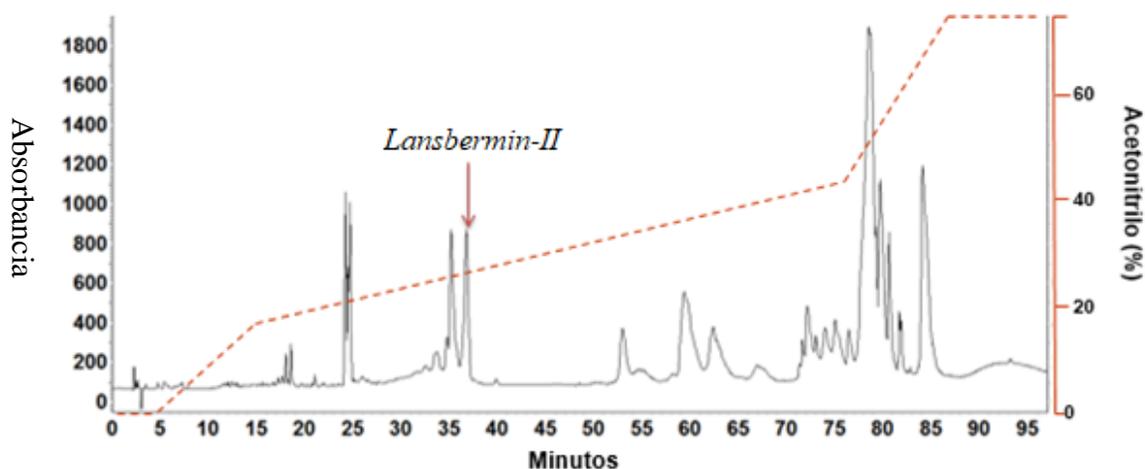


Figura 1. Aislamiento de *Lansbermin-II* a partir del veneno de *Porthidium lansbergii lansbergii*. El veneno (2 mg) se separó por HPLC de fase inversa en una columna C18 (4,6 x 250 mm) eluída con un gradiente de agua a acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% (línea discontinua) y se monitoreó la absorbancia a 215 nm. El tiempo de elución de *Lansbermin-II* (flecha) corresponde a 37 min.

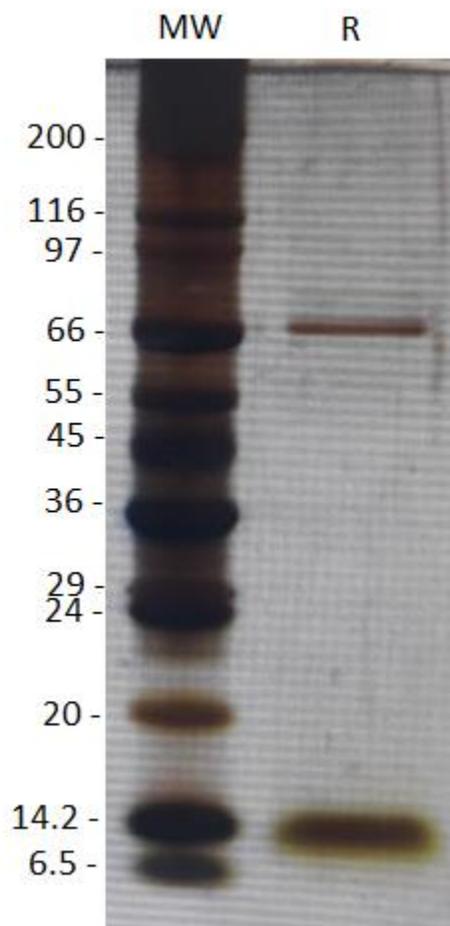


Figura 2. Análisis electroforético de *Lansbermin-II* por SDS PAGE. Las muestras se procesaron en condiciones (R) con 2- mercaptoetanol en un gel al 12% de poliacrilamida, y se tiñeron con nitrato de plata. El marcador de peso molecular (MW) en kDa, está etiquetado en el carril izquierdo.

### ***Lansbermin-II* induce citotoxicidad en líneas celulares de cáncer**

Usando el ensayo MTT, *Lansbermin-II* no mostró un fuerte efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares de leucemia (K562, Molt-4, U937) y Linfocitos sanos (no adherentes) (Fig. 3). El efecto más notorio se observó con la línea de leucemia U937 con una citotoxicidad del 20% en la concentración más alta (100  $\mu\text{g/ml}$ ), la cual se presentó de forma dosis-dependiente.

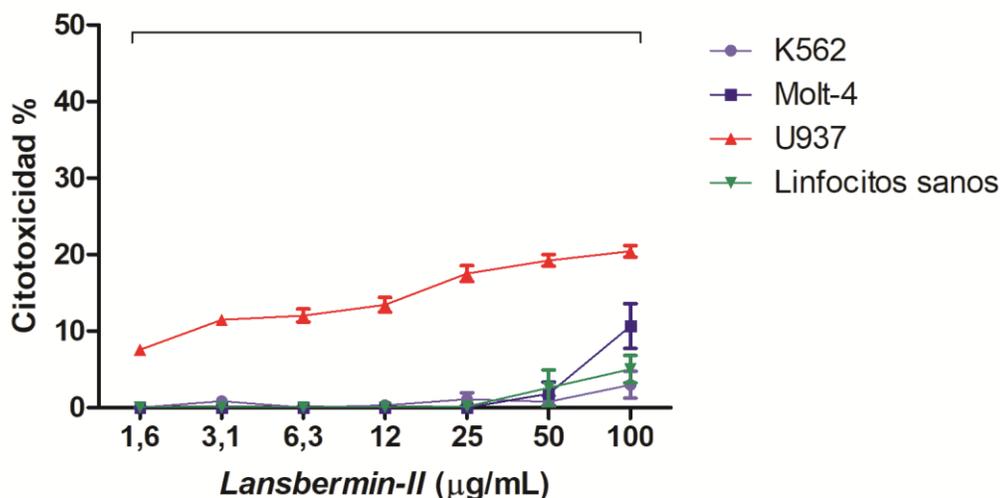
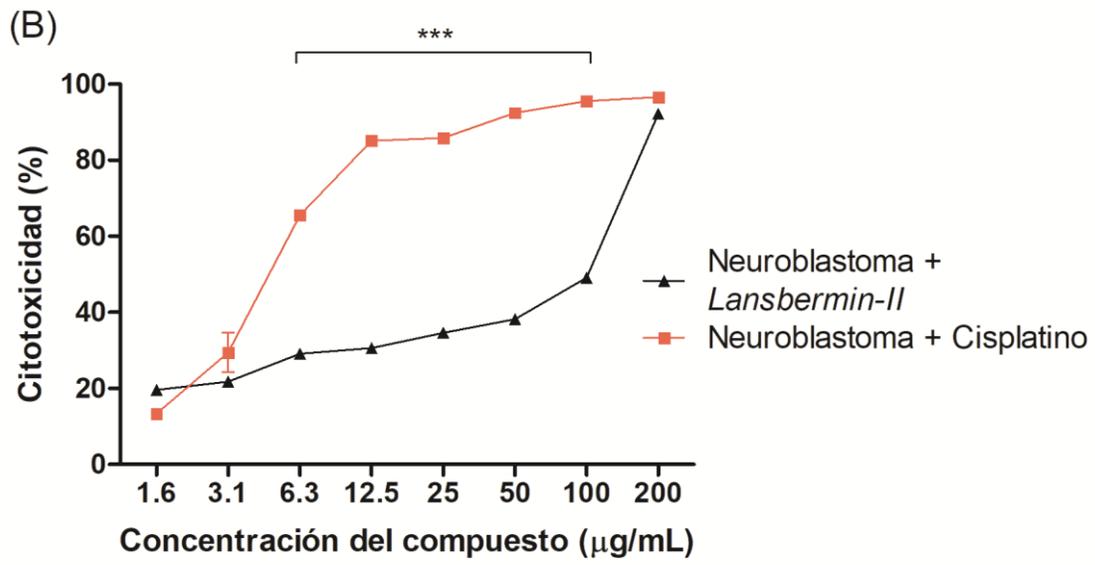
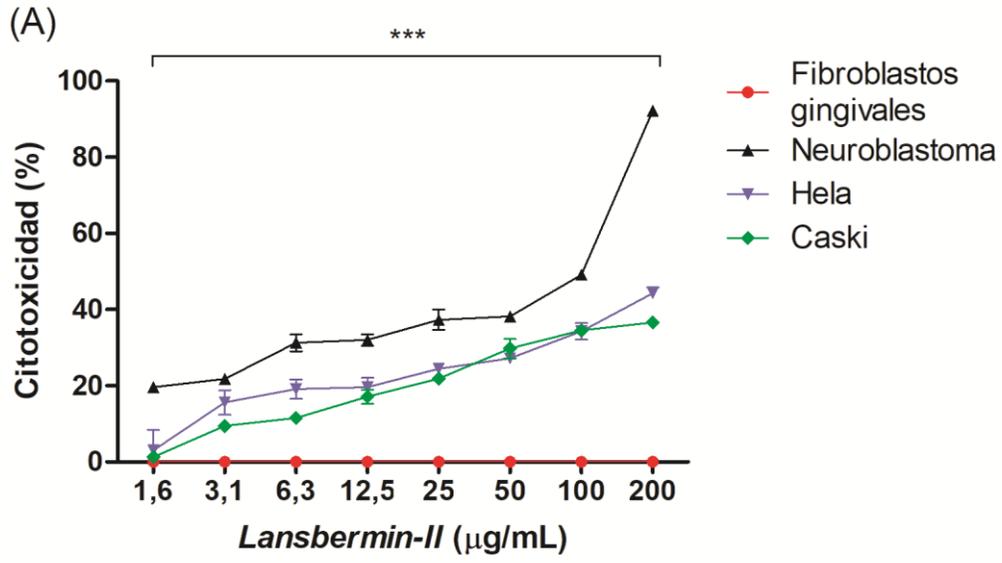


Figura 3. Actividad citotóxica de *Lansbermin-II* en células de leucemia y células no tumorales, determinado por ensayo de citotoxicidad con MTT. Las líneas celulares de leucemia K562, Molt-4, U937 se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células / pozo tratadas con diluciones seriadas (100-1,6 µg/mL) de *Lansbermin-II* durante 24 h. Los datos se expresan como medias  $\pm$  DE, y los procedimientos se realizaron por triplicado. Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a los Linfocitos sanos y U937 a un \*\*\*  $p < 0.001$ .

Sin embargo, en las líneas celulares adherentes como HeLa, CaSki y Neuroblastoma, *Lansbermin-II* mostró mayores efectos inhibitorios, especialmente en Neuroblastoma con el efecto más potente, reduciendo la viabilidad hasta en un 90% a la concentración más alta (200 µg/mL) y en 50% a (100 µg/mL) y al igual que las líneas celulares no adherentes, *Lansbermin-II* presento una citotoxicidad dosis dependiente en las células adherentes. En las células HeLa y CaSki el tratamiento con *Lansbermin-II* mostró un efecto inhibitorio ligeramente menor con alrededor del 40% de citotoxicidad en las dosis más altas. En contraste, las diferentes concentraciones de *Lansbermin-II* no afectaron la viabilidad de las células no tumorigénica de Fibroblastos Gingivales (Figura 4A). La actividad citotóxica de *Lansbermin-II* fue menor en comparación a la del Cisplatino<sup>®</sup>, el cual inhibió incluso la viabilidad de las células de los Fibroblastos Gingivales (Fig. 4B-C.)



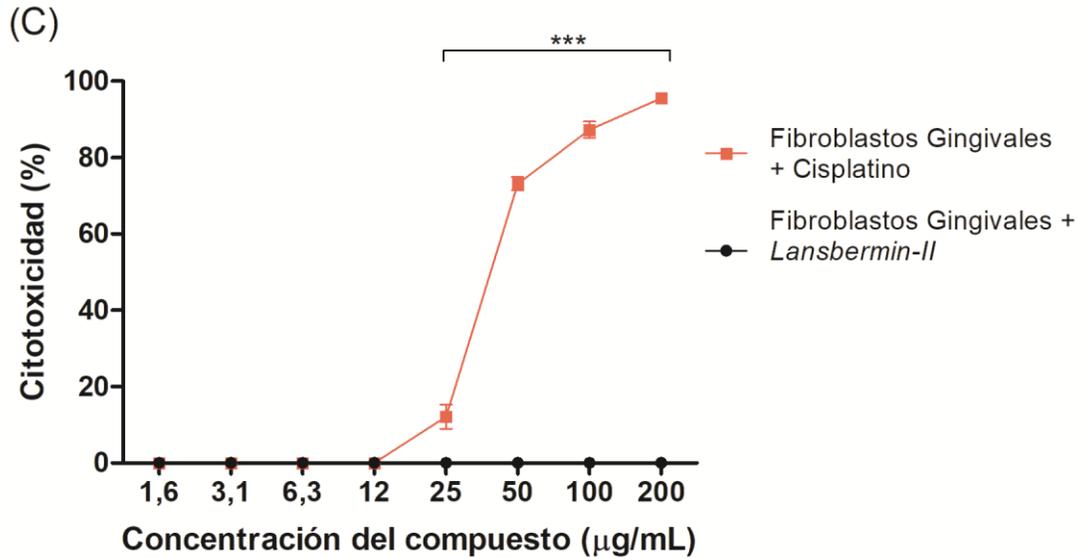


Figura 4 Actividad citotóxica de *Lansbermin-II* y Cisplatin® en diferentes células cancerosas y no tumorales, determinado por ensayo de citotoxicidad con MTT. (A) Se sembraron Fibroblastos Gingivales, neuroblastoma, adenocarcinoma de cuello uterino (HeLa), carcinoma epidermoide (CaSki) en placas de 96 pozos a una densidad de  $4 \times 10^4$  células / pozo tratadas con diluciones de concentraciones en serie (200-1.6 µg/mL) de *Lansbermin-II* por 24 h. La actividad citotóxica de *Lansbermin-II* se comparó con Cisplatin® el cual es un medicamento quimioterapéutico, utilizando células de neuroblastoma(B) y fibroblastos gingivales(C) a una densidad celular de  $4 \times 10^4$  células / pozo. Al final del tiempo de incubación se calculó la viabilidad celular. Los datos muestran la media  $\pm$  DE (n = 3). En A las diferencias fueron estadísticamente significativas a \*\*\* p <0,001 cuando se comparó con la línea celular no tumorigénica (Fibroblastos Gingivales). Para B y C las diferencias fueron significativas a \*\*\* p <0.001.

### Efecto inhibitorio de *Lansbermin-II* sobre la migración de células de Neuroblastoma

Se investigó el potencial de *Lansbermin-II* para inhibir la migración celular de Neuroblastoma usando el ensayo de *wound healing*. En la figura 5 se muestran imágenes tomadas a las 0 h y 24 h después del tratamiento con *Lansbermin-II* (Fig. 6C-D) o con medio de cultivo como control negativo (Fig. 6A-B). La herida cerro casi por completo después de 24 h de incubación en las células de control (Fig. 6B), mientras que el tratamiento con *Lansbermin-II* (80 µg/mL) redujo la migración celular de Neuroblastoma completamente después de 24 h (Fig. 6D).

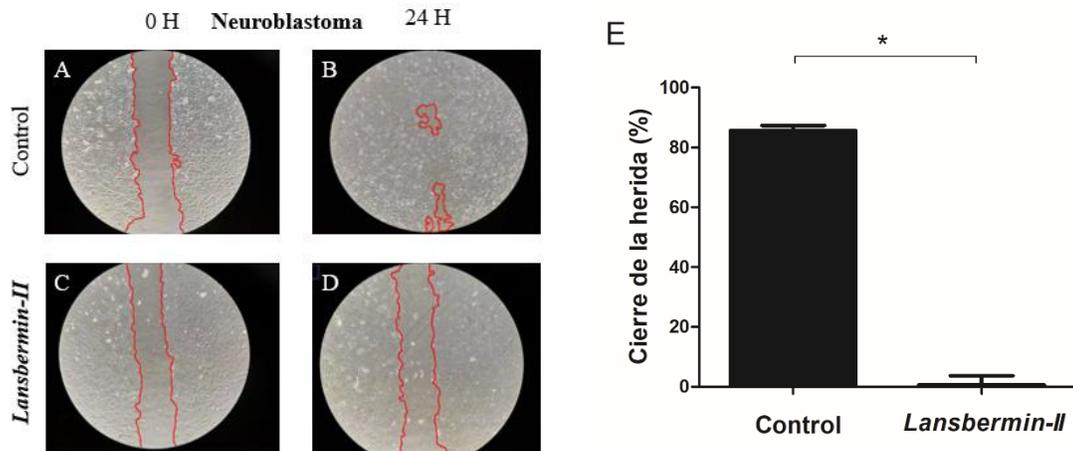


Figura 5. Efecto de la migración de *Lansbermin-II* en células de neuroblastoma por el ensayo de cierre de herida. Las células se sembraron a  $5 \times 10^4$  células / pozo en placas de 24 pozos hasta obtener la confluencia completa. Después de 24 h, se desechó el medio y se hirió la monocapa confluyente con una punta de pipeta de  $10 \mu\text{L}$  para crear un área desprovista de células (0 h) (A y C). Después de este proceso, las células se trataron en ausencia (A y B) o en presencia de *Lansbermin-II* a  $80 \mu\text{g/ml}$  (C y D), y pasadas las 24 h se observó el cierre de la herida con un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100). El área de las heridas se calcularon mediante el programa Image J y se calculó el porcentaje de cierre con respecto al tiempo cero. (E) El gráfico de barras muestra el promedio de los porcentajes de migración de las células después de 24 h  $\pm$  S.D. Las diferencias fueron significativas a un \*  $p < 0.05$ , en comparación con el control.

## Discusión

*Porthidium lansbergii lansbergii* es una serpiente perteneciente a la familia Viperidae que se distribuye desde las tierras bajas de la región Caribe hasta el Valle del Río Magdalena, alcanzando los 1270 m.s.n.m (Infante-Rivero, 2008). Esta especie presenta morfotipos con coloraciones distintas, aunque un análisis de los perfiles proteicos, letalidad y actividad bioquímica, demostraron que los venenos no son significativamente diferentes (De arco-Rodríguez et al., 2019).



Figura 6. Los dos morfotipos de *P. lansbergii lansbergii* que se encuentran en la región caribe colombiana (A) morfotipo amarillo y (B) morfotipo gris.

Su veneno está compuesto principalmente por SVMP (35.5%), PLA2 (16.2%) y desintegrinas (12.9%), y algunos de ellos han mostrado propiedades antitumorales selectivas (Jiménez-Charris et al., 2015; Jiménez-Charris et al., 2019; Montealegre-Sánchez et al., 2019). Por esta razón, este trabajo planteó aislar otra toxina de este veneno mediante cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) y evaluar sus efectos citotóxicos sobre diversas líneas celulares de cáncer adherentes y no adherentes.

Bajo condiciones reducidas, la electroforesis en gel de poliacrilamida mostró que la fracción obtenida a partir de RP-HPLC correspondiente a la proteína *Lansbermin-II*, está compuesta por dos bandas de distinto peso molecular (Fig. 3). Estos resultados indican que esta proteína, identificada previamente como una desintegrina por (Jiménez-Charris et al., 2015), podría hacer parte de una proteína de mayor tamaño como las SVMP, las cuales pueden presentar dominios de desintegrina, que son objeto de clivaje por proteasas del veneno y se liberan como proteínas/péptidos aislados (Calvete et al., 2005; Takeda et al., 2012). Sin embargo, se necesita obtener la secuencia completa de la proteína para confirmar este resultado y determinar el tipo SVMP al que podría pertenecer *Lansbermin-II*.

Por otro lado, *Lansbermin-II* presentó un efecto citotóxico bajo en las líneas celulares no adherentes de leucemias (~20%; Fig.4), y un mayor efecto para líneas celulares adherentes, en especial para las células de Neuroblastoma (~50-90%). Además, no fue citotóxica para las células adherentes no tumorigénicas (Fibroblastos Gingivales; Fig. 5A). Estos efectos selectivos de *Lansbermin-II* resaltan sobre la inespecificidad de compuestos que se usan para el tratamiento del cáncer como el Cisplatino<sup>®</sup>, el cual es tóxico tanto para las líneas tumorales como no tumorales (Figs. 5B y 5C, respectivamente). La alta especificidad de las desintegrinas se ha reportado previamente y se ha asociado con su capacidad de interactuar con receptores de membrana llamados integrinas, las cuales son glicoproteínas heterodiméricas presentes en la superficie celular, constituidas por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  (esta familia de proteínas forma al menos 24 pares conocidos diferentes en humanos). Estos receptores participan en la regulación de diversos procesos que se asocian con la adhesión celular a sustratos de la matriz extracelular (MEC) y a otras células (Calderón et al., 2014; Seguin et al., 2015; Cheah & Andrews, 2018; Aplin et al., 1999). Las desintegrinas como *Lansbermin-II* logran interactuar con las integrinas por medio de motivos específicos (*motifs*) como el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD), desencadenando señales intracelulares que afectan la supervivencia, la movilidad, la proliferación y la diferenciación celular, entre otros (Cheah y Andrews 2018). En el caso de células cancerígenas, pueden afectar el inicio, la promoción y la progresión del tumor (Guo & Giancotti, 2004). Algunas desintegrinas con otros *motifs* como la *Lebestatina* (KTS) y la *Jerdostatina* (RTS), también pueden interactuar con las integrinas (Olfá et al., 2005; Sanz et al., 2005).

De esta manera, existe un gran interés por investigar los roles de las integrinas en la carcinogénesis y la progresión tumoral, ya que se han encontrado patrones de expresión diferenciales de integrinas en diferentes tejidos cancerosos (Desgrosellier & Cheresch, 2010; McLane, 2008). Por ejemplo, en las líneas celulares de leucemia evaluadas en este estudio (molt-4, U937 y K562), se ha reportado la expresión de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , y  $\alpha 4\beta 1$  (Arroyo et al., 1992; Monti et al., 2017; Murakami et al., 1993). En las células de Neuroblastoma, también se expresa la integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Matter, Zhang, Nordstedt, & Ruoslahti, 1998), con la cual parece no tener una fuerte interacción con *Lansbermin-II*, dada la baja citotoxicidad ejercida sobre las líneas celulares de leucemia, aunque también podría deberse a la baja expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en las líneas celulares de leucemia.

Por otra parte, otros tipos de integrinas se expresan en líneas celulares adherentes. En HeLa, se ha reportado la expresión de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$  (Bax et al., 2004; Riikonen, Vihinen, Potila, Rettig, & Heino, 1995), mientras que en la línea celular CaSki se ha reportado la integrina  $\alpha v\beta 3$  (Stuardi, M.O. Phipps, & O. Tollefsbol, 2006). En células indiferenciadas de Neuroblastoma se ha informado una alta expresión de las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$ , las cuales son esenciales en procesos para la supervivencia de estas células (Erdreich-Epstein et al., 2000), como la migración celular, la cual se ve regulada por la expresión de la integrina  $\alpha v\beta 3$ , causando un fenotipo altamente móvil e invasivo cuando se sobre-expresa. (Meyer, Van Golen, Kim, Van Golen, & Feldman, 2004). Por su lado, la integrina  $\alpha v\beta 5$  desempeña un papel más importante en la angiogénesis y la metástasis del cáncer (Brooks et al., 1997). Por lo tanto, la interacción de estas integrinas con anticuerpos o péptidos que las reconocen y bloquean su sitio de unión a ligandos de la MEC resulta en la inhibición de la adhesión de células endoteliales y la inducción de apoptosis (Erdreich-Epstein et al., 2000).

En ese sentido, se han reportado efectos inhibitorios de la adhesión y la migración celular por parte de toxinas aisladas de venenos de serpiente que interactúan con integrinas que contienen subunidades tipo  $\alpha v$ , como  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$  (Bazaa et al., 2009; Jiménez-Charris et al., 2019). Por ejemplo, la *Tzabcanina*, una desintegrina aislada del veneno de *Crotalus simus tzabcan*, ha demostrado inhibir la adhesión y la migración en las líneas celulares de melanoma (A-375) y pulmón (A-549) (Saviola et al., 2016). Otro ejemplo es la *Contortrostatina*, obtenida del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, que se une tanto a  $\alpha v\beta 3$  como a  $\alpha v\beta 5$ , e inhibe la adhesión de células endoteliales (HUVEC) a la Vitronectina e induce la apoptosis en las células desprendidas. Esta desintegrina también fue capaz de inhibir la migración, la invasión y la formación de tubos *in vitro*, y también presentó efectos antiangiogénicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Golubkov, Hawes, & Markland, 2003), todas estas funciones celulares dependientes de integrinas.

Puesto que *Lansbermin-II* también la migración de células de Neuroblastoma (Fig. 6), las cuales también expresan integrinas tipo  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$  (Erdreich-Epstein et al., 2000), se podría proponer que estas integrinas podrían ser uno de los posibles blancos de esta desintegrina para efectuar sus efectos antitumorales. Sin embargo, aunque la expresión diferencial de las

integrinas en diferentes líneas celulares podría explicar la selectividad de *Lansbermin-II* por células adherentes y en particular, por las de Neuroblastoma, se requieren de más estudios que evalúen específicamente las interacciones de esta desintegrina con las integrinas expresadas por este tipo de células. De esta manera se espera que esta información pueda ayudar a explicar los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales *Lansbermin-II* inhibe la migración, y reduce la viabilidad celular.

Los resultados de este estudio sobre *Lansbermin-II* mostraron un alto potencial antitumoral contra la línea celular de Neuroblastoma. Las futuras investigaciones sobre esta toxina estarán enfocadas en la obtención de su secuencia completa, la posibilidad de producir una versión recombinante de la desintegrina y la evaluación de sus interacciones con integrinas expresadas por células de Neuroblastoma tales como la  $\alpha v \beta 3$  y la  $\alpha v \beta 5$ , mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia, citometría de flujo y microscopía confocal.

## Conclusión

En este estudio se evaluó el potencial anticancerígeno de la proteína *Lansbermin-II* en diversas líneas celulares de cáncer, adherentes y no adherentes. Esta toxina, identificada previamente como una desintegrina, podría hacer parte de un complejo proteico más grande que incluye una metaloproteínasa. Por otro lado, *Lansbermin-II* mostró un efecto altamente citotóxico sobre células adherentes, principalmente sobre células de Neuroblastoma, sin afectar la viabilidad de células no tumorigénicas de Linfocitos o Fibroblastos Gingivales, mostrando potencial como tratamiento selectivo. Sin embargo, se necesita realizar la secuenciación completa de *Lansbermin-II* para conocer su motivo de unión a integrinas y realizar experimentos más específicos para determinar con mayor exactitud el mecanismo de acción por el cual *Lansbermin-II* logra inhibir la migración y la viabilidad de células de neuroblastoma y confirmar la interacción con integrinas como la  $\alpha\beta3$  y la  $\alpha\beta5$ .

## Bibliografía

- Arroyo, A. G., Sanchez-Mateos, P., Campanero, M. R., Martin-Padura, I., Dejana, E., & Sanchez-Madrid, F. (1992). Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the  $\beta 1$  subunit. *Journal of Cell Biology*, *117*(3), 659–670. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.3.659>
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, *100*(12), 9–20. <https://doi.org/10.1289/ehp.931009>
- Bax, D. V., Messent, A. J., Tart, J., Van Hoang, M., Kott, J., Maciewicz, R. A., & Humphries, M. J. (2004). Integrin  $\alpha 5\beta 1$  and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(21), 22377–22386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400180200>
- Bazaa, A., Luis, J., Srairi-Abid, N., Kallech-Ziri, O., Kessentini-Zouari, R., Defilles, C., ... Marrakchi, N. (2009). MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina* transmediterranea venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. *Matrix Biology*, *28*(4), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.03.007>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brooks, P. C., Klemke, R. L., Schön, S., Lewis, J. M., Schwartz, M. A., & Cheresch, D. A. (1997). Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin  $\alpha v\beta 5$  to promote tumor cell dissemination in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, *99*(6), 1390–1398. <https://doi.org/10.1172/JCI119298>
- Calderon, L. A., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., De Moura, A. A., Grabner, A. N., Mazzi, M. V., ... Soares, A. M. (2014). Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in cancer therapy. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/203639>
- Cheah, M., & Andrews, M. (2018). Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration. *Cells*, *7*(3), 20. <https://doi.org/10.3390/cells7030020>
- Desgrosellier, J. S., & Cheresch, D. A. (2010). Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, *10*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>
- Erdreich-Epstein, A., Shimada, H., Groshen, S., Liu, M., Metelitsa, L. S., Kim, K. S., ... Durden, D. L. (2000). Integrins  $\alpha(v)\beta 3$  and  $\alpha(v)\beta 5$  are expressed by endothelium of high- risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide. *Cancer Research*, *60*(3), 712–721.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Ghazaryan, N. A., Ghulikyan, L. A., Kishmiryan, A. V., Kirakosyan, G. R., Nazaryan, O. H., Ghevondyan, T. H., ... Ayyvazyan, N. M. (2015). Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina* obtusa venom in S-180 sarcoma bearing mice. *European Journal of Pharmacology*, *764*, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.011>
- Glick, A. B., & Yuspa, H. (1993). Critical Aspects of Initiation, Promotion, and Progression in Multistage Epidermal Carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, (3), 1–8. <https://doi.org/DOI:10.3181/00379727-202-43511a>
- Golubkov, V., Hawes, D., & Markland, F. S. (2003). Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix* snake venom. *Angiogenesis*, *6*(3), 213–224. <https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000021396.47009.b0>
- Guo, W., & Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(10), 816–826. <https://doi.org/10.1038/nrm1490>
- Hammouda, M. B., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., Zakraoui, O., Aloui, Z., Riahi-Chebbi, I., ... Essafi-Benkhadir, K. (2016). Lebein, A snake venom disintegrin, Induces apoptosis in human melanoma cells. *Toxins*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/toxins8070206>
- Jiménez-Charris, E., Lopes, D. S., Gimenes, S. N. C., Teixeira, S. C., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., ... Rodrigues Ávila, V. de M. (2019). Antitumor potential of Pllans–II, an acidic Asp49–PLA2 from *Porthidium*

- lansbergii lansbergii snake venom on human cervical carcinoma HeLa cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1053–1061. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.053>
- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sanchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F., ... Lomonte, B. (2015). Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.016>
- KARAKAŞ, D., ARI, F., & ULUKAYA, E. (2017). The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 41, 919-925. doi: 10.3906/biy-1703-10
- Matter, M. L., Zhang, Z., Nordstedt, C., & Ruoslahti, E. (1998). The  $\alpha 5\beta 1$  integrin mediates elimination of amyloid- $\beta$  peptide and protects against apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 141(4), 1019–1030. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.4.1019>
- McLane, M. A. (2008). A classification and nomenclature of disintegrins isolated from snake venoms. *Toxicon*, 51(5), 941. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.12.018>
- Meyer, A., Van Golen, C. M., Kim, B., Van Golent, K. L., & Feldman, E. L. (2004). Integrin expression regulates neuroblastoma attachment and migration. *Neoplasia*, 6(4), 332–342. <https://doi.org/10.1593/neo.03445>
- Montealegre-Sánchez, L., Gimenes, S. N. C., Lopes, D. S., Teixeira, S. C., Solano-Redondo, L., de Melo Rodrigues, V., & Jiménez-Charris, E. (2019). Antitumoral Potential of Lansbermin-I, a Novel Disintegrin from *Porthidium lansbergii lansbergii* Venom on Breast Cancer Cells. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(22), 2069–2078. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190806151401>
- Monti, M., Iommelli, F., De Rosa, V., Carriero, M. V., Miceli, R., Camerlingo, R., ... Del Vecchio, S. (2017). Integrin-dependent cell adhesion to neutrophil extracellular traps through engagement of fibronectin in neutrophil-like cells. *PLoS ONE*, 12(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171362>
- Murakami, S., Saho, T., Shimabukuro, Y., Isoda, R., Miki, Y., & Okada, H. (1993). Very late antigen integrins are involved in the adhesive interaction of lymphoid cells to human gingival fibroblasts. *Immunology*, 79(3), 425–433.
- Olf, K. Z., José, L., Salma, D., Amine, B., Najet, S. A., Nicolas, A., ... Naziha, M. (2005). Lebestatin, a disintegrin from *Macrovipera* venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. *Laboratory Investigation*, 85(12), 1507–1516. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700350>
- Riikonen, T., Vihinen, P., Potila, M., Rettig, W., & Heino, J. (1995). Antibody against human  $\alpha 1\beta 1$  integrin inhibits hela cell adhesion to laminin and to type I, IV, and V collagens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 209, pp. 205–212. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1490>
- Sanz, L., Chen, R. Q., Pérez, A., Hilario, R., Juárez, P., Marcinkiewicz, C., ... Calvete, J. J. (2005). cDNA cloning and functional expression of jerdostatin, a novel RTS-disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* and a specific antagonist of the  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40714–40722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509738200>
- Saviola, A. J., Burns, P. D., Mukherjee, A. K., & Mackessy, S. P. (2016). The disintegrin tzabcanin inhibits adhesion and migration in melanoma and lung cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.008>
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12811>
- Singla, A. K., Garg, A., & Aggarwal, D. (2002). <IC204-Ref-003- 2002-Art-Int J Pharm\_Paclitaxel and its formulations.pdf>. 235, 179–192. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00986-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00986-3)
- Stuardi, T., M.O. Phipps, S., & O. Tollefsbol, T. (2006). Integrins and Cancer: Gene Expression, Epigenetics and Metastasis. *Current Genomics*, 7(5), 323–331. <https://doi.org/10.2174/138920206778604377>
- Swenson, S. D., Markland, F. S., & Minea, R. (2016). A Novel, Non-Cytotoxic, Anti-Invasive Therapeutic Agent for Ovarian Cancer. (Bbe), 159–165. <https://doi.org/10.2991/bbe-16.2016.27>
- Takeda, S., Takeya, H., & Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1824(1),

164–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>

Yoo, H. S., & Park, T. G. (2000). In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry*, 41(1), 992–993.

Yue, P. Y. K., Leung, E. P. Y., Mak, N. K., & Wong, R. N. S. (2010). A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. *Journal of Biomolecular Screening*, 15(4), 427–433.  
<https://doi.org/10.1177/1087057110361772>