



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

---

*Análisis In Silico* de toxinas animales con potenciales aplicaciones biotecnológicas

---

Trabajo de titulación Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** María Belén Álvarez Robles

**Tutor:** PhD. Mario Daniel García Solís

**Ambato – Ecuador**

**Marzo - 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Título y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 24 de enero del 2023

---

PhD. Mario Daniel García Solís

CC: 110360547-1

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María Belén Álvarez Robles, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de ingeniera bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

María Belén Álvarez Robles

CC: 131186285-6

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

**Presidente del Tribunal**

---

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis  
C.I. 180425690-5

---

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza  
C.I. 180316027-2

Ambato 2 de marzo, del 2023.

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

María Belén Álvarez Robles

**C.I. 131186285-6**

**AUTOR**

## DEDICATORIA

*Dedicado a mi pequeña gran familia*

*Mi madre Sonia Robles por siempre ser un gran modelo que seguir, mujer admirable, de carácter fuerte y luchadora.*

*Mi padre Edison Álvarez por apoyarnos siempre con amor incondicional frente a cualquier adversidad.*

*A mi querida hermanita Naomi, espero poder ser tu guía y pilar con el que puedas contar eternamente.*

*A mis angelitos peludos Negra, Garfield y Monamour, por su amor desinteresado y noble compañía.*

*A todos aquellos que me han acompañado en el camino: familiares, amigos y profesores; llevaré un recuerdo de cada uno en mi memoria y corazón.*

*Con amor*

*Belén*

## AGRADECIMIENTO

*Vive como si fueras a morir mañana y aprende como si fueras a vivir por siempre.*

Mahatma Gandhi

Agradezco especialmente a mis padres por haberme apoyado a la distancia, por su arduo trabajo en favor de garantizar mi educación. A mi hermana por haber sido paciente en todo el tiempo que estuvimos separadas, espero ser tu inspiración y apoyarte a cumplir tus metas y sueños propios. Son mi motor de vida, los amo infinitamente.

A mis compañeros universitarios que fueron mi segunda familia en la maravillosa ciudad de Ambato: Raquel, Karina, Alejandro, Ma José, Julissa, Javier, Tamara. Las aulas de clases nos unieron y compartimos en ellas experiencias que nos convirtieron no solo en colegas sino también amigos. Especialmente agradezco a Christian por haber sido mi confidente; por apoyarme en las responsabilidades académicas y cuidarme en los momentos de vulnerabilidad. A mi amiga Sarahy por consolarme y sacarme una sonrisa en los momentos grises. Los tendré presente en mis recuerdos con mucho cariño. Les deseo éxito profesional y mucha felicidad.

A mi tutor Dr. Mario García por su sabia guía en el último capítulo de mi vida universitaria. Es un honor haber desarrollado este proyecto bajo su tutela. Le agradezco por su paciencia y por compartir su pasión por la materia en las aulas de clases es una inspiración para todos nosotros los estudiantes de la UTA.

A la Universidad Técnica de Ambato, por abrirme las puertas de la Facultad de ciencias e ingeniería en alimentos y Biotecnología. En sus aulas puede conectarme con personas maravillosas, vivir experiencias gratificantes y enriquecerme de conocimientos que me han permitido desarrollarme como persona y profesional.

## ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iv
DERECHOS DE AUTOR .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1 Introducción.....	1
1.1.2 Venenos y ponzoñas animales .....	2
1.1.2.1 Clases de venenos y Ponzoñas animales.....	3
1.1.3 Venómica.....	6
1.1.4 Familias y superfamilias .....	7
1.1.4.1 Familia $\alpha$ .....	8
1.1.4.2 Familia $\beta$ .....	8



1.1.4.3	Familia $\alpha$ y $\beta$ .....	9
1.1.4.4	Familia sin $\alpha$ y $\beta$ .....	9
1.1.5	Mecanismo de acción.....	10
1.1.5.1	Regulación de canales iónicos.....	10
1.1.5.2	Afinidad por líneas celulares específicas.....	10
1.1.6	Aplicaciones Terapéuticas.....	11
1.1.6.1	Status quo de las enfermedades crónicas.....	12
1.1.6.2	Toxinas como herramientas moleculares.....	12
1.1.6.3	Fármacos clínicamente Aprobadas y/o comercializados.....	13
1.2	Objetivos.....	20
1.2.1	Objetivo General.....	20
1.2.2	Objetivo Específicos.....	20
CAPÍTULO II.....		21
METODOLOGÍA.....		21
2.1	Materiales y equipos.....	21
2.1.1.	Materiales.....	21
2.1.2.	Equipos.....	21
2.2	Método.....	22
2.2.1	Recopilación de secuencias y estructuras tridimensionales de toxinas peptídicas.....	22
2.2.2	Evaluación De Homología De Secuencias.....	22
2.2.3	Evaluación De Homología Estructural.....	23
2.2.4	Alineamiento Múltiple de Secuencias.....	24
2.2.5	Determinación de la filogenia.....	25

CAPÍTULO III .....	26
RESULTADOS Y DISCUSION .....	26
3.1 Péptidos Antinociceptivos.....	26
3.1.1 Recopilación de secuencias con homología secuencia y estructural .....	26
3.1.2 Análisis de Alineamiento múltiple de secuencias.....	29
3.1.3 Análisis Filogenético .....	33
3.2 Péptidos Antiepilépticos .....	35
3.2.1 Recopilación de secuencias con homología secuencia y estructural .....	35
3.2.2 Análisis de Alineamiento múltiple de secuencias.....	39
3.2.3 Análisis Filogenético .....	43
3.3 Péptidos Anticancerígenos .....	45
3.3.1 Recopilación de secuencias con homología secuencia y estructural .....	45
3.3.2 Análisis de Alineamiento múltiple de secuencias.....	48
3.3.3 Análisis Filogenético .....	52
CAPÍTULO IV .....	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
4.1 Conclusiones .....	55
4.2 Recomendaciones.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
5.1 Bibliografía .....	57
ANEXOS .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Categorías de toxinas biológicas</i> .....	5
<b>Tabla 2.</b> <i>Medicamentos derivados de toxinas animales aprobados por la FDA</i> .....	15
<b>Tabla 3.</b> <i>Toxinas peptídicas con actividad Antinociceptiva</i> .....	27
<b>Tabla 4.</b> <i>Toxinas peptídicas con actividad Antiepiléptica</i> .....	36
<b>Tabla 5.</b> <i>Toxinas peptídicas con actividad Anticancerígenas</i> .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Categoría de agentes, sustancias toxicas o venenos</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> <i>Clasificación estructural</i> .....	9
<b>Figura 3.</b> <i>Proteína de tres dedos: Citotoxina de cobra</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> <i>Análisis secuencial y estructural de péptidos Antinociceptivos.</i> .....	30
<b>Figura 5.1</b> <i>Alineación de péptidos Antinociceptivos: cyriotoxin-1a y Mu-terapotoxina-Tp1a</i> .....	31
<b>Figura 6.</b> <i>Estructuras tridimensionales de toxinas peptídicas con actividad antinociceptiva</i> .....	32
<b>Figura 7.</b> <i>Árbol filogenético del grupo de toxinas antinociceptiva</i> .....	35
<b>Figura 8.</b> <i>Análisis secuencial y estructural de péptidos antiepilépticos</i> .....	40
<b>Figura 9.</b> <i>Estructuras tridimensionales de toxinas peptídicas con actividad antiepiléptica</i> .....	41
<b>Figura 10.</b> <i>Alineación de péptidos antiepilépticos: Delta-theraphotoxina -(Hm1b) y Kappa-theraphotoxina-Scg1a</i> .....	42
<b>Figura 11.</b> <i>Árbol filogenético del grupo de toxinas antiepiléptico</i> .....	44
<b>Figura 12.</b> <i>Análisis secuencial y estructural de péptidos anticancerígenos</i> .....	49

<b>Figura 13.</b> <i>Estructura tridimensionales de toxinas peptídicas con actividad anticancerígena</i> .....	50
<b>Figura 14.</b> <i>Alineación de péptidos antiepilépticos: Citotoxina 3 – CTX3 y Citotoxina IV - CTX4</i> .....	52
<b>Figura 15.</b> <i>Árbol filogenético del grupo de toxinas anticancerígenas</i> .....	53

## RESUMEN

Los medicamentos disponibles actualmente han incrementado la esperanza de vida; lo que resulta en el envejecimiento poblacional con un mayor número de pacientes geriátricos que aumentan la cultura de la prescripción y la automedicación originado virus y bacterias resistentes. Además, el desarrollo de nuevas enfermedades, como la reciente pandemia de Covid-19 producto de la interacción irresponsable del humano con el entorno, causa millones de muertes especialmente en los países más pobres sin acceso a medicinas paliativas. Esta realidad refleja una paradoja que acerca al sistema sanitario al borde del colapso. Para afrontar la crisis se buscan usos alternativos para las drogas conocidas o el desarrollo de nuevos medicamentos más efectivos y específicos para cada condición médica. Las investigaciones omisas han desarrollado nuevos fármacos aprovechando el gran potencial de los péptidos con actividad biotecnológica aislado de las secreciones biológicas tóxicas producidas por ciertos animales venenosos. En este trabajo se emplearon las bases de datos UNIPROT y RCSB PDB para agrupar péptidos con homología secuencial y estructural con tres diferentes actividades biológicas: Anticancerígenas, antiepiléptica y antinociceptivo. De la secuenciación de nucleótidos se obtuvo una estructura tridimensional base, con PyMOL, que confiere la actividad biológica para cada grupo. Además de un análisis filogenético con MEGA que muestra el arraigo evolutivo de los grupos. Con los resultados se espera incentivar investigaciones futuras, que utilicen como plantilla las estructuras base de estos péptidos aislados de toxinas animales y aprovechan su actividad biológica para la síntesis de nuevos fármacos terapéuticos.

Palabras clave: Toxinas animales, péptidos terapéuticos, anticancerígenos, antiepilépticos, antinociceptivos, bioinformática, Investigación Bibliográfica.

## **ABSTRACT**

Currently available drugs have increased life expectancy; resulting in population aging with a greater number of geriatric patients who increase the culture of prescription and self-medication originating resistant viruses and bacteria. In addition, the development of new diseases, such as the recent Covid-19 pandemic, a product of the irresponsible interaction of humans with the environment, causes millions of deaths, especially in the poorest countries without access to palliative medicines. This reality reflects a paradox that brings the health system closer to the brink of collapse. To face the crisis, alternative uses for known drugs are sought or the development of new, more effective and specific drugs for each medical condition. Omissive research has developed new drugs taking advantage of the great potential of peptides with biotechnological activity isolated from toxic biological secretions produced by certain poisonous animals. In this study, the UNIPROT and RCSB PDB databases were used to group peptides with sequence and structural homology with three different biological activities: anticancer, antiepileptic, and antinociceptive. From nucleotide sequencing, a three-dimensional base structure was obtained, with PyMOL, which confers the biological activity for each group. In addition to a phylogenetic analysis with MEGA that shows the evolutionary roots of the groups. The results are expected to encourage future research that uses the base structures of these peptides isolated from animal toxins as a template and takes advantage of their biological activity for the synthesis of new therapeutic drugs.

**Keywords:** Animal toxins, therapeutic peptides, anticancer, antiepileptic, antinociceptive, bioinformatics, bibliographic research.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

#### 1.1.1 Introducción

El avance biotecnológico e innovación biofarmacéutica han revolucionado el área de la salud humana al disminuir los índices de mortalidad. Esto se refleja en indicadores demográficos, como la tasa de muerte cruda por cada 1000 habitantes, que ha disminuido en más de la mitad, desde 1950 hasta 2020, pasando de 19.1 a 7.6, respectivamente (**United Nations, 2019**). Las investigaciones biofarmacéuticas también han mostrado un efecto positivo sobre la esperanza de vida al nacer de la población mundial, que pasó de 63.7 a 70.9 años, lo que representa un aumento de 7.9 años. Por otra parte, un estudio de **Buxbaum et al, (2020)** le atribuye un 35% de este incremento a los productos farmacéuticos consumidos por los estadounidenses entre 1990 a 2015 (**United Nations, 2019**). Aunque la tasa de crecimiento poblacional a nivel mundial muestra una disminución de más o menos el 1% en poco más de un siglo, pasando del 2.1% en 1970 a menos del 1.1% en 2021 (Anexos 1), se estima alcanzar los 8.5 billones de habitantes para 2030 (**United Nations, 2019**). Este crecimiento poblacional implica un mayor gasto público para el mantenimiento de la salud humana, el cual ha alcanzado los \$ 8.5 trillones de USD o 9.8% del PIB mundial en 2019 (**World Health Organization, 2021**).

Pese a la inversión para diseminar el acceso al sistema de salud pública, las principales causas de muerte a nivel global siguen siendo las enfermedades crónicas e infecciosas. De acuerdo con el último informe emitido por la OMS las enfermedades coronarias y derrames cerebrales ocupan el primer y segundo puesto con 9 y 6 millones de muertes, respectivamente, en el 2019; mientras que en tercer puesto se encuentran las muertes por infección de COVID-19, que se estima alcanzaron los 3 millones de muertes hasta finales del 2021 (**World Health Organization, 2021**). Es evidente que los gastos en salud pública se incrementarán a futuro y con ello la necesidad de mejores medicamentos que

se adapten al metabolismo de las personas, sean de bajo costo y accesibles para los diferentes sectores sociales. También serán necesarios nuevos tratamientos médicos para enfrentar enfermedades previamente intratables y las nuevas enfermedades que, como el COVID-19, puedan surgir por la interacción del humano con el ambiente (**Trevelyan, 2021**). En la actualidad las nuevas herramientas tecnológicas y las ciencias ómicas, abren posibilidades de estudiar, descubrir y desarrollar nuevos medicamentos a partir de diversos sustratos. Entre ellos, las plantas han sido uno de los más estudiados; sin embargo, existen otras fuentes potenciales de medicamentos que provienen de animales, como las toxinas en los venenos, las cuales han sido utilizadas empíricamente desde tiempos ancestrales, y que hoy pueden ser refinados en sus componentes individuales para dar origen a nuevas terapias médicas.

### **1.1.2 Venenos y ponzoñas animales**

Según la toxicología que es la ciencia encargada del estudio de los agentes químicos y su comportamiento en contacto con algún organismo. Entre estos se encuentran los venenos, definidos como cualquier sustancia tóxica que causa efectos nocivos y/o letales a un organismo vivo cuando se administra en dosis muy pequeña (**Roldán, 2016**). A lo largo de la historia, diferentes culturas, como la china, egipcia, griega, romana, entre otras, han aprendido sobre las propiedades de los venenos y su aplicación en la elaboración de armas, como lanzas con puntas recubiertas de venenos en animales, y productos para tratar ciertas enfermedades de la época con la medicina tradicional (**Pérez, Guirola, Fleites, & al., 2014**). Sin embargo, el uso de medicamentos tradicionales a base de venenos de animales o sus partes tiene una efectividad cuestionable, ya que su producción no es estandarizada y su uso consiste en la administración de un coctel de enzimas y péptidos pequeños tóxicos o no tóxicos que pueden tener un efecto tanto positivo como negativo en el usuario. Se estima que el 95% del peso seco de la mayoría de los venenos se compone de polipéptidos activos como enzimas, además de sales minerales, carbohidratos, entre otros (**Karalloedde, 1995**). Es decir, este porcentaje engloba desde cientos a varios millones de miles de péptidos activos según la complejidad de la especie o género del organismo del que provengan. Por ejemplo, solo en el veneno de la araña *Hadronyche versuta* se han

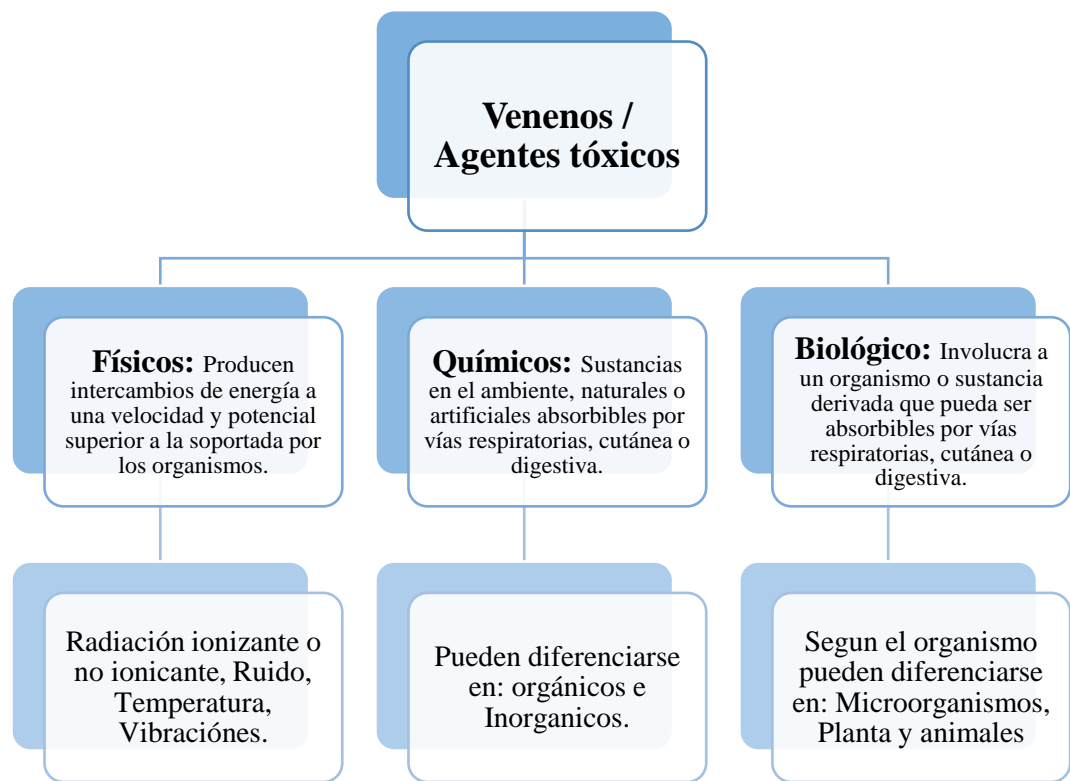


encontrado 1,000 péptidos activos, mientras que se estima que de varias especies de caracoles como de todo el mundo, miembros del género *conus*, se han estudiado hasta 80,000 conotoxinas (Escoubas, Sollod, & King, 2006) (Chen, Xu, Zhang, & Wang, 2018).

Actualmente los avances en tecnologías ómicas han permitido a la comunidad científica la separación, diferenciación y caracterización funcional de estos péptidos, lo que se traduce en nuevos fármacos comerciales efectivos. El Captopril, obtenido del veneno de la serpiente *Bothrops jararacá*, fue aprobado por la FDA en 1981 para tratar la hipertensión. Estos y muchos otros medicamentos son el resultado de las investigaciones impulsadas por la tecnología de la venómica (Rodríguez, Villarreal, & Corzo, 2019).

#### 1.1.2.1 Clases de venenos y Ponzañas animales

Históricamente la categorización de todos los agentes, sustancias tóxicas o venenos en general ha supuesto un reto para la comunidad científica. Actualmente, la clasificación varía según la rama de estudio. Así, de acuerdo con su acción farmacológica, los venenos tóxicos pueden agruparse en 3 categorías: Físicos, Químicos y Biológicos (Dawn, y otros, 2009). Los venenos animales se encuentran dentro de la última categoría mencionada como se aprecia en la Figura 1. Además, cabe mencionar que según las necesidades, resultados o enfoque de la investigación pueden surgir diferentes clasificaciones, ya que un mismo veneno puede formar parte de más de una categoría (Fidelis, Sunday, & Ugbong, 2021). Debido a la compleja composición de los venenos y ponzoñas animales, no existe un esquema de clasificación estandarizado. Es decir, cada autor puede tener clasificaciones simples, como por el animal de origen (serpientes, escorpiones, arañas, alacranes, entre otros), así como por sus efectos en el organismo (neurotóxicos, hemotóxicos, citotóxicos, etc.) (Utkin, 2015).



**Figura 1.** Categoría de agentes, sustancias tóxicas o venenos



*Definición de general de los venenos o agentes tóxicos según la farmacología y la seguridad e higiene. (Dawn, y otros, 2009) (Aljamali, El-Taei, & Alasady, 2021)*

En la naturaleza existen ciertas especies de animales que a través de miles de años de evolución han desarrollado mecanismos que favorecen su supervivencia. Entre estos la producción de un coctel de toxinas en sus tejidos (animales ponzoñosos) o en glándulas secretoras conjugadas con aparatos de suministro (animales venenosos). Además, los aparatos de suministros pueden ser pasivo por rocío o activo por inyección del veneno vía parenteral (Fidelis, Sunday, & Ugbong, 2021).

De acuerdo con el estudio bibliográfico de varias fuentes realizado por Nelsen et al, (2013), se clasificó a las secreciones biológicas tóxicas en: veneno, toxigeno y pozoña. Por

otra parte, **Nelsen et al**, (2013) indica que una sustancia tóxica está compuesta por una o más toxinas que causan daño fisiológico dependiente de la dosis. Como se aprecia en la Tabla 1, estas se diferencian en que la ponzoña involucra un mecanismo de entrega activo via parenteral que causa una lesión mecánica. Mientras que el veneno no necesita de un mecanismo de entrega ni provoca una lesión mecánica. Por ultimo, para acentuar la diferencia entre ponzoña y veneno, introducen el nuevo término “Toxungen” que abarca las secreciones que tienen un mecanismo de entrega pasivo; el cual no generan una lesión mecánica ya que no se produce el contacto fisico.

**Tabla 1.** *Categorías de toxinas biológicas*

<b>Toxina Biológica</b>	<b>Mecanismo de suministro</b>	<b>Lesión por penetración</b>	<b>Mecanismo de despliegue</b>	<b>Ejemplo representativo</b>
Veneno	Ausente	Ausente	Ingestión, inhalación, absorción cutánea	 Ranas Dendrobatidae
Toxungen	Presente	Ausente	Entrega a la superficie corporal sin producir herida	 Lagartos <i>Phrynosoma</i>

---

Ponzoña	Presente	Presente	Entrega a tejidos internos a través de una herida
---------	----------	----------	---



Culebras Viperidae

---

*Nota: Componentes críticos y características distintivas de las 3 categorías principales de secreciones biológicas de organismos biológicos de animales venenosos, tuxugenosos y ponzoñosos, modificado de: (Nelsen, y otros, 2013)*

### 1.1.3 Venómica

Se define como venómica a la especialidad en analizar los venenos de animales a través de la aplicación de las tecnologías ómicas, principalmente la proteómica, genómica y transcriptómica. Siendo el fin de esta rama analizar bioquímicamente los venenos de diferentes especies para la separación y diferenciación en sus péptidos individuales. Los análisis se complementan con una caracterización de los fenotipos peptídicos, para finalmente aplicar ensayos funcionales que permitan identificar sus aplicaciones biotecnológicas como medicamentos, insumos agrícolas, entre otros (**Wilson & Dally, 2018**). Históricamente en los años ´60 partieron los primeros estudios realizados principalmente sobre serpientes, ya que estas son las especies de animales conocidos como mayores productores de venenos. Entre las primeras familias estudiadas se encuentran la Elapidae, que engloba especies altamente venosas como la *Naja*, *Hemachatus*, *Ophiophagus*, *Bungarus*, *Dendroaspis* y *Pseudechis* (**Mebs, 1969**). Sin embargo, la ausencia de tecnologías sofisticadas fueron las grandes limitantes de la época.

Así los progresos en la venómica han permitido el desarrollo de técnicas para la diferenciación de los péptidos en familias y superfamilias según sus particularidades estructurales. Estos descubrimientos sobre los péptidos de toxinas animales son recopilados en bases de datos bioinformáticas como NCBI, Gene Bank, UniprotKB y Protein Data Bank (PDB), entre otras que exponen la información disponible hasta la

fecha sobre cada péptido particular (**Kaas & Craik, 2015**). Las investigaciones actuales se sirven de estas bibliotecas virtuales para recopilar compuestos con características de interés biomédico o biotecnológico, a los cuales se les aplica ensayos funcionales que determinen su actividad. Posteriormente, establecen protocolos estandarizados para escalar la producción a un nivel comercial, aplicando pruebas clínicas y preclínicas que respalden la inocuidad de estos péptidos para el consumo (**Calvete, y otros, 2015**).

Los desafíos actuales del área se basan en la identificación y estudio de las diferentes especies de animales productores de veneno, ya que según el origen de este varía la complejidad de las mezclas de péptidos, sus cualidades estructurales y funcionales (**Utkin, 2015**). Aunado a esto, la recolección de muestras representativas directamente de un solo ejemplar está limitada por su capacidad de producción de veneno, esta varía según la especie y estado de madurez. Para el caso de la especie *Vipera russelli* el rendimiento promedio de veneno en adultos es de 63 mg, mientras que en serpientes juveniles es de 41 mg (**Tun & Cho, 1968**). Posteriormente, estos cocteles deben atravesar los procesos de purificación por cromatografías como RP-HPLC, desorción de laser por Matriz MALDI-TOF, entre otros, para obtener las fracciones individuales de los péptidos; seguidos de electroforesis como SDS-PAGE para determinar los rangos de masa y la distribución de peso molecular. De modo que al final de procesos de purificación se obtiene apenas microgramos puros del péptido de interés, mientras que se necesitan entre 1 a 10 mg altamente puros para las pruebas de funcionalidad. Por lo que es necesario implementar sistemas de expresión en microorganismos modificados con ADN recombinante, lo que incrementa los consumos de tiempo y recursos de las investigaciones (**Hu, y otros, 2014**) (**Rodriguez, Villarreal, & Corzo, 2019**).

#### **1.1.4 Familias y superfamilias**

La clasificación de proteínas y péptidos, según sus características genéticas y actividades bioquímicas, permite a la comunidad científica organizar a estas moléculas en grupos. Primero en familia, luego estas familias con características comunes en grupos más grandes de superfamilias, y el conjunto de estas pueden llegar a formar un clado general.

Para identificar las características genéticas similares de un grupo de péptidos, se aplican análisis de similitud de secuencia y estructura, que determinan la homología entre estos. Además, se pueden tomar en consideración otras características bioquímicas como los mecanismos de acción de cada dominio proteico; por lo que se estima que podrían existir alrededor de 100 000 familias de proteínas agrupadas en 15 000 superfamilias (**Das, Dawson, & Orengo, 2015**). Las agrupaciones pueden variar según el autor y el criterio de análisis. Esto en vista de que las familias y superfamilias pueden ser clasificados de diversas maneras, tanto de acuerdo con sus características individuales como combinadas. Es decir que no bastaría con un análisis secuencial de contrastación de cada uno de sus aminoácidos, debido a que la ausencia o presencia de uno o más de ellos puede cambiar por completa o parcialmente su estructura, lo que generaría cambios también en su actividad o mecanismo de acción. Por lo antes mencionado se puede identificar de manera general las siguientes familias de acuerdo con su estructura:

#### **1.1.4.1 Familia $\alpha$**

La estructura secundaria de este tipo de familias se caracteriza por un enrollamiento denominado  $\alpha$ -helicoidal, tal y como se evidencia en la Figura 2a. El número de aminoácidos oscila de 25 a 40 aminoácidos. La estructura secundaria se debe a la predominancia de aminoácidos como Leu, Lys, y Gly. (**Beltrán, 2014**).

#### **1.1.4.2 Familia $\beta$**

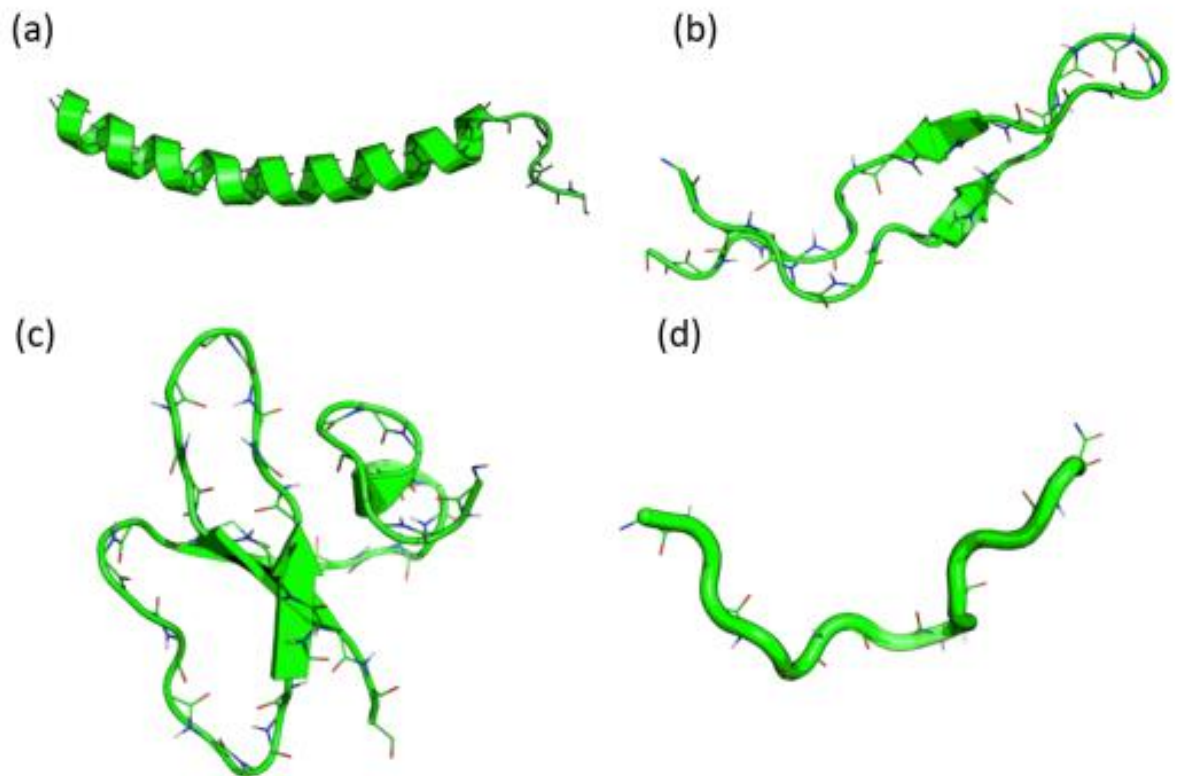
La familia  $\beta$  se diferencia principalmente por su plegamiento en forma de lámina, de allí su nombre. Esta hoja plegada  $\beta$  se encuentra presente en la mayoría de las estructuras proteicas de las toxinas de animales venenosos o ponzoñosos, además dichas estructuras forman puentes disulfuro, esto se debe a la presencia del aminoácido no esencial Cys (Figura 2b) (**Yeaman & Yount, 2004**).

### 1.1.4.3 Familia $\alpha$ y $\beta$

Este tipo de familia reúne las características antes mencionadas de manera alterna en la misma estructura. A menudo tienden a tener secuencias más extensas mayor a los 40 aminoácidos, Figura 2c (Beltrán, 2014).

### 1.1.4.4 Familia sin $\alpha$ y $\beta$

Por otro lado, las estructuras que carecen de  $\alpha$ -helices y hojas plegadas  $\beta$ , no forman estructura alguna, pero se caracterizan por estar presentes en alternancia con las anteriores mencionados. Por lo general son formadas por residuos de triptófano (Figura 2d) (Yeaman & Yount, 2004).



**Figura 2.** Clasificación estructural

(a)  $\alpha$  hélice, (b) hoja plegada  $\beta$ , (c)  $\alpha$  y  $\beta$ , (d) sin  $\alpha$  y  $\beta$ . Recuperado de: (Beltrán, 2014)

### **1.1.5 Mecanismo de acción**

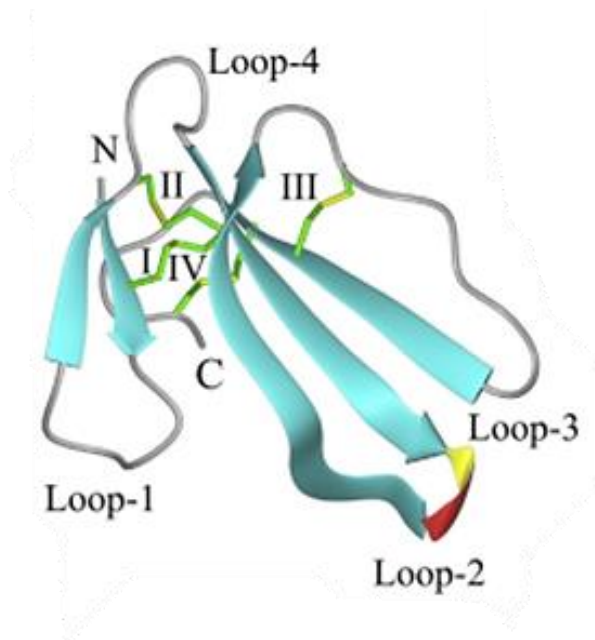
#### **1.1.5.1 Regulación de canales iónicos**

Como parte de toxinas de venenos de algunos animales como arañas, serpientes, alacranes, entre otros, los péptidos cumplen la función de bloquear o regular canales iónicos. Los mecanismo de acción que actúan sobre los canales iónicos (Na, Ca y K principalmente) tienen la particularidad de estar relacionado de manera directa con los dominios de las neuronas sensoriales. Cada uno de estos canales posee subtipos, generalmente nueve, que individualmente poseen propiedades diferentes y específicas (**Gonçalves, Benoit, & Kurz, 2018**). Otra de las características de este singular mecanismo, es la presencia de puentes disulfuro en su estructura peptídica, muy útiles en la unión de los dominios de los canales iónicos para su bloqueo o moderación, el número de aminoácidos bordea los 35 (**Vetter, Deuis, Mueller, & Israel, 2017**). Estos canales también están involucrados con afecciones del dolor, epilepsias, cáncer, entre otras; de aquí su potencial de ser empleados como tratamiento terapéuticos.

#### **1.1.5.2 Afinidad por líneas celulares específicas**

Otros péptidos pueden actuar directamente sobre las membranas de líneas celulares. Se ha observado que los péptidos denominados citotoxinas, abundantes en los venenos serpientes y cobras, se instalan directamente sobre la membrana celular. Donde inhiben el crecimiento de células por necrosis o apoptosis, por un proceso de despolarización que abre poros en la membrana (**Dubinnyi & Dubovskii, 2021**). La estructura de estos péptidos se caracteriza por tener cuatro puentes disulfuro conservados que unen en cadena a cinco laminas beta formando bucles a manera de “dedos”, los mismos que aportan cierta flexibilidad para incrustarse en los sitios de unión de las membranas lipídicas (Figura 3).





**Figura 3.** *Proteína de tres dedos: Citotoxina de cobra*  
Modificado de: (Dubinnyi & Dubovskii, 2021)

### 1.1.6 Aplicaciones Terapéuticas

El auge en desarrollo de nuevas técnicas de producción de antivenenos y la sofisticación de las tecnologías biotecnológicas, favorecieron el estudio individual de los componentes de los cocteles de toxinas animales. Develando el potencial y ventajas que presentan estos péptidos bioactivos de tener una alta actividad, especificidad, diversidad biológica, con objetivos amplios y baja toxicidad. Los péptidos, una vez aislados, caracterizados y purificados, se aplican con mayor frecuencia para el estudio y tratamiento de enfermedades crónicas como infecciosas; siendo utilizados para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas o fármacos aprobados por la FDA (Chen, Xu, Zhang, & Wang, 2018).

### **1.1.6.1 Status quo de las enfermedades crónicas**

Las enfermedades crónicas o no transmisibles se definen como condiciones que perduran por 1 año o más, requieren de atención médica continua y limitan las actividades de la vida diaria. Incluyen diversas condiciones de salud como enfermedades coronarias, respiratorias, diabetes, cáncer y muchas otras (**Airhihenbuwa, Tseng, Sutton, & Price, 2021**). Estadísticas del 2014 indican que en Estados Unidos un 60% de la población adulta tenía una condición crónica, y el 42% de estas habría desarrollado múltiples enfermedades crónicas (**Buttorff, Ruder, & Bauman, 2017**). Además, se estima que, en 2019, 42 millones de personas murieron de enfermedades crónicas a nivel mundial, por efecto de factores de cambios en la estructuras económicas, sociales, culturales y principalmente por el envejecimiento de la población al aumentar la esperanza de vida. En Ecuador las enfermedades isquémicas del corazón encabezan la lista de las causas de defunciones, causando 15.639 muertes en el año 2020 según los datos INEC (**Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020**). Este tipo de enfermedades requieren de un tratamiento diario y usualmente de largo plazo; por lo que su creciente incidencia aumenta la demanda de medicamentos para su control (**Kaplan, y otros, 2013**).

### **1.1.6.2 Toxinas como herramientas moleculares**

El afán de entender y contrarrestar eficazmente los efectos fisiológicos de los venenos, tóxicos, o ponzoñas animales ha bifurcado el interés de producir inmunoglobulinas por inoculación directa del veneno. Ampliando el foco de atención al estudio de los componentes individuales de estos cocteles tóxicos. De modo que actualmente se está buscando aprovechar las cualidades de estos péptidos como fármacos dependiendo de su actividad biológica o como herramientas moleculares para tratar enfermedades crónicas o infecciosas (**Herzig, y otros, 2020**). Por ejemplo, la serpiente *Bungarus multicinctus* es considerada una de las más venenosas del mundo, ya que de acuerdo con su dosis letal media ( $DL_{50}$ ) son necesarios 0,09mg/kg de veneno para provocar la mortalidad. Este veneno se caracteriza por tener una variedad de neurotoxinas, entre estas la bungarotoxinas, que bloquean los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)

encargados de transmitir señales sinápticas en el sistema nervioso central y regular la contracción muscular del musculo esquelético (**Gopalkrishnakone & Chou, 1996**) (**Mclane, Dunn, Manfredi, Conti-Tronconi, & Raftery, 1996**). La  $\alpha$ -bungarotoxina ha sido una de las neurotoxinas más estudiadas por su actividad antagonista competitiva, que obstaculiza la unión del activador ACh a los receptores nAChR inhibiendo su apertura y el flujo de iones; lo que resulta en una parálisis que puede terminar en la muerte. Sin embargo, se han realizado modificaciones conjugacionales de la  $\alpha$ -bungarotoxina con fluoróforos, para realizar tinciones inmunohistoquicas, que han arrojado luz sobre las características morfológicas de los receptores musculares y el mecanismo de unión de las toxinas de serpiente con los mismos (**Kullmann, Groat, & Artim, 2009**).

Actualmente estas toxinas peptídicas no solo sirven para entender la fisiología humana, también son instrumentos que pueden definir el éxito de cirugías tan complicadas como la extirpación de tumores cancerígenos. Se estima que ocurren metástasis, a partir de los bordes donde estaba el tumor extraído, en un 80% de los casos donde no se extirpa por completo las células cancerígenas, confundidas por el criterio del cirujano como tejido sano (**Cormier, 2020**). La clorotoxina Cy5.5, aislada del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* o acechador de la muerte, es el péptido utilizado para asistir en los procedimientos de neurocirugía. Este péptido se une específicamente a los canales iónicos de las células tumorales, mientras su fluoróforo conjugado emite los fotones visibles al espectro infrarrojo, delimitando el tejido sano del afectado. Esta herramienta es efectiva incluso si los tumores tienen un diámetro inferior a 1 milímetro de diámetro lo que se traduce como una herramienta 500 veces más sensible que una resonancia magnética (**Fernández, 2007**) (**Veiseh, y otros, 2007**).

### **1.1.6.3 Fármacos clínicamente Aprobadas y/o comercializados**

Los medicamentos aptos para el consumo humano, disponibles en el mercado, deben atravesar por rigurosas pruebas que corroboren su efecto terapéutico; con estudios que pueden llevar de 10 a 13 años. Se estima que de 5 000 moléculas con actividad anticancerígenas descubiertas, apenas 250 entran a ensayos preclínicos realizados en

animales y bacterias. De estas menos de 10 pasan a ensayos clínicos en humanos, y finalmente solo una llega a ser aprobada para su comercialización por autoridades reguladoras como la FDA (**Akhondzadeh, 2016**).

Desde su fundación en 1906 la FDA se encarga de evaluar los resultados de las pruebas preclínicas y clínicas de los medicamentos, para comprobar que los beneficios del uso superan los riesgos. Tan solo entre 1998 a 2007 esta organización aprobó hasta 252 medicamentos nuevos, constituyéndose como uno de los organismos más importantes para la aprobación de nuevos medicamentos y productos biológicos comercializados en el mercado (**Kneller, 2010**) (**Food and Drug Administration, 2022**). Las farmacéuticas han conseguido desarrollar compuestos sintéticos refinados que mimetizan la actividad de las moléculas nativas presentes en toxinas de animales como caracoles marinos, sanguijuelas y serpientes. Este último grupo mencionado es la principal fuente de los medicamentos aprobados debido a factores como la amplia distribución de especies venenosas conocidas y la alta producción de veneno (**Figueiredo, y otros, 2020**).

De acuerdo con los estudios moleculares, en los venenos de las serpientes estudiadas se pueden encontrar trece de las quince superfamilias de toxinas descritas en la literatura. Este es el mayor número encontrado tanto en el subfilo de animales vertebrata y otros subfilos de animales venenosos como Echinodermata, Arthropoda, Annelida, Mollusca y Cnidaria. Por lo que los venenos de serpiente comprenden por excelencia una buena base para el desarrollo de nuevos fármacos con diversas dianas terapéuticas (**Vivek, Achyuthan, & Kartik, 2018**). La FDA ha aprobado la comercialización de diez fármacos desarrollados a partir de toxinas animales. A continuación se muestra la Tabla 2, en donde se recopilan características como la especie animal de origen, el año de aprobación comercial, el mecanismo de acción y el uso frecuente de estos medicamentos.

**Tabla 2.** Medicamentos derivados de toxinas animales aprobados por la FDA

Molécula (Marca)	Especie	Año Aprobación FDA / Producción	Mecanismo de Acción	Uso	Referencia
Captopril (Capoten ®)	<i>Bathrops jaraca</i>	1981 / Sintética	Inhibidor de enzima convertidora de angiotensina (ECA)	Hipertensión, Disfunción Ventricular Izquierda Posterior a Infarto de Miocardio, Nefropatía diabética	(Food And Drug Organizati on, 2022)
Enalapril (Vasotec ®)	<i>Bathrops jaraca</i>	1985 / Sintético	Inhibidor de enzima convertidora de angiotensina (ECA)	Hipertensión, Disfunción Ventricular Izquierda Posterior a Infarto de Miocardio, Nefropatía diabética	(Food and Drug Administra tion, 2005)
Eptifibatid a (Integrilin ®)	<i>Sistrurus milarius</i>	1988 / Sintético	Previene la unión de fibrinógeno, factor de von willebrand y otros ligandos adhesivos a GPIIb/IIIa	Síndrome coronario agudo; intervención coronaria percutánea	(Food and Drug Administra tion, 2005)
Tirofiban	<i>Echis carinatus</i>	1999 / Sintética	Antagonista de la unión del	Síndrome coronario agudo	(Food and Drug

(Aggrastat®)			fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa		Adminitrat ion, 2001)
Bivalirudina (Angiomax®)	<i>Hirudo medicinalis</i>	2000 / Recombinante	Inhibidor directos de trombina específico y reversible	Antitrombótico o Anticoagulante en intervenciones percutáneas coronarias	(Food and Drug Administration, 2001)
Desirudina (Iprivask®)	<i>Hirudo medicinalis</i>	2003 / Sintética	Inhibidor irreversible selectivo de trombina	Previene eventos trombóticos venosos	(Food and Drug Administration, 2004)
Exenatida (Byetta®)	<i>Heloderma suspectum</i>	2003 / Sintética	Agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón	Diabetes mellitus tipo 2	(Food and Drug Administration, 2005)
Ziconotide (Prialt®)	<i>AConus magus</i>	2004 / Sintética	Agonista del canal Cav2.2	Dolor crónico severo	(Food and Drug Administration, 2005)

Lixisenati da (Adlyxin® )	<i>Heloderma a suspectum</i>	2016 / Sintética	Agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón	Diabetes mellitus tipo 2	(Food and Drug Administra- tion, 2016)
Exenatida de liberación prolongada (Byetta ®)	<i>Heloderma a suspectum</i>	2017 / Sintética	Agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón	Diabetes mellitus tipo 2	(Food and Drug Administra- tion, 2018)

*Nota: Medicamentos actualmente utilizados para el tratamiento de enfermedades crónicas y agudas aprobadas por la Administración de alimentos y medicamentos, modificado de: (Figueiredo, y otros, 2020).*

El Captopril aprobado en 1981 y Enalapril en 1985 son fármacos sintéticos que mimetizan la acción hipotensora del péptido nativo *teprotida*, presente en la ponzoña de la serpiente *Bathrops jaraca* cuya mordedura produce en las víctimas síntomas de hipotensión. Ambos medicamentos actúan como inhibidor de la enzimas convertidoras de angiotensina (ECA) suprimiendo el sistema renina-angiotensina-aldosterona, lo que evita la producción de angiotensina II y aldosterona. La ausencia de angiotensina II produce vaso constricción y la aldosterona reabsorción de agua por los riñones, lo que se traduce en aumento de la presión arterial; por lo que actualmente se aplican para combatir la hipertensión y los fallos cardiacos (Marte, Sankar, & Cassagnol, 2022). Cabe mencionar que el Captopril y el Enalapril siendo inhibidores de ECA se diferencian en su farmacocinética. El primero mencionado se administra en un estado activo, mientras el segundo es un profármaco inactivo que al pasar por un proceso metabólico químico u enzimático activara su farmacología (Reid, 1997).

Eptifibatida y el Tirofiban, aprobados desde 1988 y 1999 respectivamente, son dos de los tres inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa disponibles para su uso clínico como antiplaquetarios. Estos han sido desarrollados a partir de dos especies de serpientes diferentes: *Sistrurus milarius* y *Echis carinatus*. Si bien ambos medicamentos comparten la misma diana terapéutica que evita la agregación plaquetaria, difiere en su estructura química; por lo tanto, tienen diferentes patrones de inhibición y funcionalidad para cada síndrome coronario en particular **(Ortiz & Ibáñez, 2011)**.

La sanguijuela *Hirudo medicinalis* es una especie depredadora que se alimenta de la sangre de vertebrados. Este parásito aprovecha los compuestos de su mucosa salival que tiene propiedades anestésicas (para pasar desapercibidas), vasodilatadoras y anticoagulantes (para favorecer el flujo continuo de sangre). Históricamente ha tenido protagonismo en tratamientos médicos de sangrías comunes, desde las sociedades aristocráticas tradicionales. A partir de esta especie se consiguió producir sintéticamente la bivalirudina; un antitrombótico reversible con un perfil de seguridad mejorado, para reducir la incidencia de hemorragias frente a otros medicamentos como la heparina, la hirudina y deshirudina **(Alonso, Curcio, Graupner, Jiménez, & Talavera, 2011) (Vera, Blu, & Torres, 2005) (Carillo, Arias, & Sanchez, 2011)**.

Ziconotide es un fármaco utilizado para aliviar el dolor crónico desde el 2004, que mimetiza la acción de la conotoxina – MVIIA presente en el veneno del caracol marino *Conus magus*. Es el primer fármaco sintético derivado de un veneno animal aprobado que tiene un objetivo neuronal. Actúa como inhibidor selectivo del canal de calcio Cav2.2 de la médula espinal al ser administrado como infusión intratecal. Así, este fármaco sentó un precedente para la utilización de los canales iónicos del sistema nervioso central y periférico como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos analgésicos, antiepilépticos, anticancerígenos, entre otros **(Herzig, y otros, 2020)**.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico que produce insulinoresistencia, por secreción inadecuada de glucagón y aumento de la producción hepática de glucosa. Es el tipo más frecuente de diabetes; entre el 90 al 95% de casos



clínicos está muy arraigado a la obesidad y al estilo de vida sedentario. Para 2015 se estimó que 1 de cada 11 personas a nivel mundial padecía de DM2, y se proyecta que se alcanzaran los 642 millones de pacientes diabéticos para 2040 (**zheng, Ley, & Hu, 2018**).

La exenatida, lixisenatida y exenatida de liberación prolongada trabajan como agonistas del receptor GLP-1, ya que tienen un 53% de identidad con la hormona nativa incretina péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1). De manera que se emplean como tratamiento que compensa la deficiencia de la hormona en pacientes diabéticos con DM2. Entre sus efectos se le atribuye la reducción del apetito, por la producción de glucagón que incentiva la producción de insulina por el páncreas, para reducir los niveles de azúcar en sangre (**Uccellatore, Genovese, Dicembrini, Mannucci, & Ceriello, 2015**). Estos tres medicamentos fueron aislados del veneno de la serpiente *Heloderma suspectum*, pero se diferencian en las modificaciones estructurales de sus residuos que les confirman diferente afinidad y grado de homología con el receptor GLP-1 endógeno. En el caso de exenatida y lixisenatida ambos de acción corta, afectan principalmente la motilidad gástrica provocando sensación de saciedad. Mientras que la exenatida de liberación prolongada esta microencapsulada en polímeros biodegradables para activar al GLP-1 de forma continua, con una vida media de hasta 2 semanas, aumentando la secreción de insulina por el páncreas mientras se inhibe la secreción de glucagón (**Madsbad, 2015**).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Analizar *in silico* toxinas animales con potenciales aplicaciones biotecnológicas

### **1.2.2 Objetivo Específicos**

- Compilar secuencias de toxinas peptídicas animales con aplicaciones biotecnológicas.
- Identificar patrones estructurales conservados en las secuencias peptídicas que determinan su aplicación biotecnológica.
- Establecer un análisis filogenético entre las secuencias de toxinas peptídicas identificadas en función a su aplicación biotecnológica.

## **CAPÍTULO II METODOLOGÍA**

### **2.1 Materiales y equipos**

#### **2.1.1. Materiales**

##### **Programas digitales:**

Protein Data Bank

Uniprot

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB (RCSBPDB)

T – Coffe

MEGA X

ESPrpt 3

#### **2.1.2. Equipos**

Computadora personal

Módem de internet

## 2.2 Método

### 2.2.1 Recopilación de secuencias y estructuras tridimensionales de toxinas peptídicas

En este primer punto, se realizó una búsqueda bibliográfica de toxinas peptídicas presentes en venenos animales mediante una metodología similar a lo reportado previamente por **Sanchez y Garcia, (2021)**. La búsqueda se basó principalmente en toxinas peptídicas de las cuales se ha descrito aplicaciones biotecnológicas tales como: analgésicos, antipiréticos, anticancerígenos, y antimicrobianos. Una vez que se identificó los péptidos candidatos para el presente estudio, se realizó una búsqueda en la base de datos del “Reserch Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank” o por sus siglas RSCB PDB (**National Science Foundation; US Department of Energy; National Institutes of Health , 2021**).

Dentro de esta plataforma de acceso libre se ingresó el nombre del péptido descrito en la literatura dentro de la casilla que indica “Enter Serch terms or PDB ID(s)”, para a continuación dar clic sobre el botón con el “icono de lupa”; lo que inició la búsqueda y arrojó los resultados de péptidos cuyas estructuras 3D formen parte de la base de dato del RSCB PDB. Se seleccionó el enlace de la estructura peptídica de interés, el cual redireccionó a una ventana que contiene todas las especificaciones estructurales, bibliográficas y cualquier información asociada con la misma. Además, en la misma ventana se encuentra un botón de nombre “Download Files”, desde donde se pudo descargar información del péptido. Como por ejemplo su secuencia de aminoácidos en formato FASTA, restricciones RNM y archivos de coordenadas tridimensionales en diferentes formatos.

### 2.2.2 Evaluación De Homología De Secuencias

Las secuencias de aminoácidos recopiladas en formato FASTA fueron clasificadas según sus aplicaciones biotecnológicas. Luego, estas secuencias FASTA sirvieron como base para identificar otras toxinas, mediante un análisis de la homología de las secuencias con

la asistencia de la plataforma virtual The Universal Protein Resource o UniProt (**Consorcio UniProt, 2002**). Una vez en la página UniProt se dio clic sobre la pestaña “BLAST”. A continuación, se desplegó una nueva ventana con un área rectangular en blanco donde se pegó la secuencia FASTA que se desea comparar. Los parámetros de búsqueda como “la base de datos de destino”, “E-Threshold”, “Matriz”, “Filtrado”, “Gapped” y “Hits” se mantuvieron en los valores preestablecidos. Una vez que se ingresó la secuencia y los parámetros de búsqueda se dio clic sobre el botón “Run BLAST”, para que la herramienta haga un alineamiento de la secuencia ingresada con todas las secuencias registradas en su base de datos. Terminado el BLAST, UniProt arrojó las secuencias homólogas ordenadas de acuerdo con su nivel de identidad de secuencia (porcentaje de identidad) e información relevante como: organismo de origen, valor-E y el puntaje de Hits.

A partir de estos criterios se seleccionó los péptidos de interés y se dio clic sobre el enlace *Query*, para acceder a toda la información de cada péptido, incluyendo su secuencia en formato FASTA. La secuencia FASTA podrá ser editada para tomar la sección de la secuencia que mantiene homología con la secuencia target. Este proceso se repitió con todas las toxinas de interés, hasta generar una base de datos lo suficientemente amplia para efectuar posteriores análisis propuestos en la presente investigación, similar a lo realizado previamente por (**Espín & García, 2021**).

### **2.2.3 Evaluación De Homología Estructural**

Para identificar péptidos de otros organismos de los cuales se dispone estructuras tridimensionales en la base de datos del PDB se hizo uso de la herramienta PDBeFold, siglas de “Protein structure comparison in 3D data base of secondary structure matching” ( Instituto Europeo de Bioinformática; EMBL-EBI, 2021). Una vez abierta la página, se dio clic en el botón “Launch PDB Fold”. En la nueva ventana se colocó el código de la proteína en el espacio “*PDB code*” o se cargará un archivo PDB al cambiar la configuración de *Source* de “PDB entry” a “Coordinate File”. En esta misma sección se encuentran los parámetros de búsqueda como: la coincidencia mínima aceptable (%),

precisión, alineamiento, por mencionar algunos; los cuales se mantendrán en sus valores preestablecidos.

A continuación, se da clic sobre “Submit your query” para que la herramienta realice un análisis de homología entre estructuras tridimensionales de hélices  $\alpha$  y laminas  $\beta$ ; es decir, que compara la identidad del plegamiento de las estructuras secundarias del péptido ingresado con otras estructuras registradas en la base de datos. La identidad de plegamiento no necesariamente corresponde a péptidos con secuencias de aminoácidos similares. A partir de los resultados arrojados se seleccionará estructuras de toxinas homólogas para su respectivo análisis, similar a lo realizado previamente (**Ramos & García, 2021**).

#### **2.2.4 Alineamiento Múltiple de Secuencias**

Una vez generada la base de datos de las toxinas peptídicas a analizar, se agrupó a las secuencias de los péptidos de acuerdo con su actividad. El alineamiento múltiple de secuencias se realizó empleando las secuencias de las toxinas peptídicas en su formato FASTA mediante la herramienta T-Coffee (**Centro de Regulación Genómica de Barcelona, 2021**), similar a lo realizado previamente (**Vizueta & García, 2021**). Posteriormente en la página se copió las secuencias FASTA compiladas en el archivo “.txt” y se subió al hacer clic en “Click here to upload a file”. Una vez cargadas las secuencias FASTA se dio clic sobre el botón “Submit”, y la herramienta inicia el alineamiento múltiple. Al final del proceso, los resultados del alineamiento se compilaron en un archivo de formato “.txt”.

A continuación, se analizó el alineamiento mediante la herramienta “ESript 3” (**Swiss Institute of Bioinformatics, 2021**). Dentro de esta plataforma se cargará el archivo “.txt” y el código PDB Fold y se ejecutó la herramienta para que se genere un archivo “.pdf”. En el archivo se pudo diferenciar el alineamiento por colores de acuerdo con la presencia de aminoácidos altamente, moderadamente y poco conservados, similar a lo previamente realizado (**Jaramillo & García, 2021**).

### **2.2.5 Determinación de la filogenia**

Para evaluar la relación filogenética entre las toxinas peptídicas analizadas se empleó el programa MEGA X (MEGA, 2021). Desde el servidor web MEGA se selecciona el paquete de instalación “MEGA X” disponible en diferentes versiones según el sistema operativo de nuestro ordenador, a continuación, se dio clic en el botón “DOWNLOAD” para descargar el paquete MEGA X y se ejecutó para que se realice la respectiva instalación. A continuación, se abrió el programa “MEGA X” que establece la filogenia de las toxinas peptídicas de acuerdo con su aplicación biotecnológica. Dentro del programa se dio clic sobre la pestaña “File” para cargar el archivo con las secuencias alineadas previamente; a continuación, se utilizarán los botones para seleccionar la prueba filogenética que se desea realizar. Se dio clic sobre el botón “Compute” para que el programa arroje los resultados en diferentes formatos se seleccionó la opción de árbol filogenético. Por último, se almacenó los resultados dando clic en el botón “Guardar análisis” similar a lo realizado previamente (Balseca & Cerda, 2021).

## CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Péptidos Antinociceptivos

#### 3.1.1 Recopilación de secuencias con homología secuencia y estructural

Como punto de partida de esta investigación se recopilaron toxinas peptídicas acorde a una misma actividad biológica mediante el uso de la base de datos de RSCB PDB. Se selecciono el péptido de 34 aminoácidos, Cyriotoxina-1a de la especie *Cyriopagopus schioedtei* como modelo principal, debido a las investigaciones que prueban su actividad como un potente antinociceptivo que actúa sobre los canales Nav 1.7 bloqueando la señalización del dolor (Gonçalves T. C., y otros, 2019). Como se aprecia en la Tabla 3, la Cyriotoxina-1a identificada en RSCB PDB con el código **6GFT**, tiene una secuencia de 34 aminoácidos que fue ingresada como plantilla en UNIPROT (homología secuencias) y PDBeFold (Homología estructural). El análisis de homología realizado en ambas plataformas generó un set de resultados que incluyó a los péptidos que comparten semejanza de secuencia y estructural. En el primer puesto se ubicó el péptido Cyriotoxina-1a con código **A0A4V8GZX0** (Código UNIPROT) y un 100% de homología al ser la plantilla ingresada. A partir de esta plantilla, en ambas plataformas, aparecieron cientos de resultados de péptidos nativos y sintéticos en orden descendente de acuerdo con el porcentaje de identidad de secuencia (**%seq**).

Los resultados obtenidos fueron filtrados en base a péptidos nativos y un porcentaje de identidad no menor al 40%, de modo que la actividad biológica de Cyriotoxina-1a pueda ser extrapolada a los demás péptidos seleccionados. Los péptidos seleccionados mantienen un número de aminoácidos que varía entre 32 a 36 aminoácidos. Además, provienen ya sea de la misma o diferente especies de arácnidos procedentes de distintos lugares alrededor del mundo. Cabe recalcar que no todos los péptidos encontrados por homología de secuencia en UniProt pudieron ser encontrados en PDBeFold por homología estructural. La tabla 3 muestra con un sombreado gris a los casos donde se encontró el



mismo péptido en ambas bases de datos, de acuerdo con el Statu quo de los datos presentes en ambas bases de datos que puede estar sujeto a actualizaciones. Además, se expone los valores de la Raíz de desviación cuadrática media (RMSD), determinados por la herramienta PyMold, que compara el péptido plantilla con cada péptido del grupo. Este descriptor molecular determina la desviación con respecto a la trayectoria que tienen los átomos de cada péptido con respecto al otro. De manera mientras el RMSD sea más cercano a cero indica una mayor similitud entre las conformaciones tridimensionales de los péptidos comparados (identidad estructural) (**Laura Tintaya & Gémez, 2018**).

Otra de las características para tener en cuenta es el mecanismo de acción que presenta cada toxina encontrada y seleccionada para el primer grupo (Antinociceptivo). La función que ejerce estas estructuras repercute de manera significativa en los canales iónicos (Sodio, Calcio y Potasio principalmente) de las células del sistema nervioso central (neuronas), ya que es aquí donde se genera la transmisión del dolor, mediante la conexión intercelular (**Ferrat G. , y otros, 2005**).

**Tabla 3.** *Toxinas peptídicas con actividad Antinociceptiva*

Especie	Péptido	Código PDB/ Uniprot	aa	%se q	%sse	RMSD	Mecanismos de acción	Referencias
<i>Cyriopagopus schioedtei</i>	Cyriotoxina-1a	<b>6GFT</b> <b>A0A4V8GZX0</b>	34	100	100	0.0	Bloqueador del canal de señalización del dolor Na V 1.7 altamente expresado en los ganglios de la raíz dorsal del sistema nervioso sensorial.	( <b>Ferrat G. , y otros, 2005</b> ) ( <b>Gonçalves T. C., y otros, 2019</b> )
<i>Haplopelma hainanum</i>	Hainantoxina-I	<b>1NIX</b> <b>D2Y1X6</b>	34	81.8	100	0.614	Puede bloquear rNa (v) 1.2 / beta (1) y el canal de sodio de insectos para / tipE	( <b>Li, y otros, 2003</b> )
<i>Cyriopagopus hainanus</i>	Mu-terafotox	<b>2MQF</b>	34	81.8	100	0.579	Inhibe de forma potente el NaV1.7	( <b>Klint, Chin,</b>

	ina-Hhn2b	<b>D2Y1X8</b>							<b>&amp; Mobli, 2015)</b>
<i>Haplopelma hainanum</i>	Hainantoxina-III 1	<b>2JTB</b> <b>D2Y1X9</b>	33	76.7	-	0.572	Inhíbe los canales de sodio sensibles a Tetrodotoxina Neuronal (TTX) dependientes de voltaje y Nav1.1, 1.2, 1.3 y 1.7	<b>(Liu, y otros, 2013)</b>	
<i>Cyriopagopus schmidti</i>	Huwentoxina-I	<b>1QK6</b> <b>P56676</b>	33	66.7	100	0.546	Inhíbe los canales de sodio sensibles a TTX dependientes de voltaje y Nav1.7/SCN9A	<b>(Chen, Zhang, Dai, Luo, &amp; Liang, 2005)</b>	
<i>Cyriopagopus doriae</i>	Mu-terapotoxina-Hd1a	<b>2MPQ</b> <b>A0A0J9X1W9</b>	36	64.5	100	0.624	Inhíbe de forma reversible e independiente del voltaje Nav1.1 / SCN1A y Nav1.7 / SCN9A humanos	<b>(Klint, y otros, 2015)</b>	
<i>Cyriopagopus lividus</i>	Beta / kappa-terapotoxina-Hlv1a	<b>B3EW</b> <b>N3</b>	33	63.3	-	0.557	Bloquea el canal de sodio Nav1.3	<b>(Jerusalem Patente n° WO 2011/033358 A2, 2011)</b>	
<i>Orphnaecus sp</i>	Mu-terapotoxina-Osp1a	<b>P0DP95</b>	33	62.5	-	0.518	Inhibidor Nav1.7 / SCN9A del canal de sodio controlado por voltaje.	<b>(Klint, y otros, 2015)</b>	
<i>Cyriopagopus hainanus</i>	Mu-terapeotoxina-Hhn1b 1	<b>1NIY</b> <b>D2Y232</b>	32	59.4	100	0.664	Bloquea selectivamente los canales neuronales tetrodotoxina sensibles de voltaje de sodio Nav1.2, Nav1.6 / y Nav1.7	<b>(Klint, y otros, 2015) (Liu, y otros, 2003)</b>	

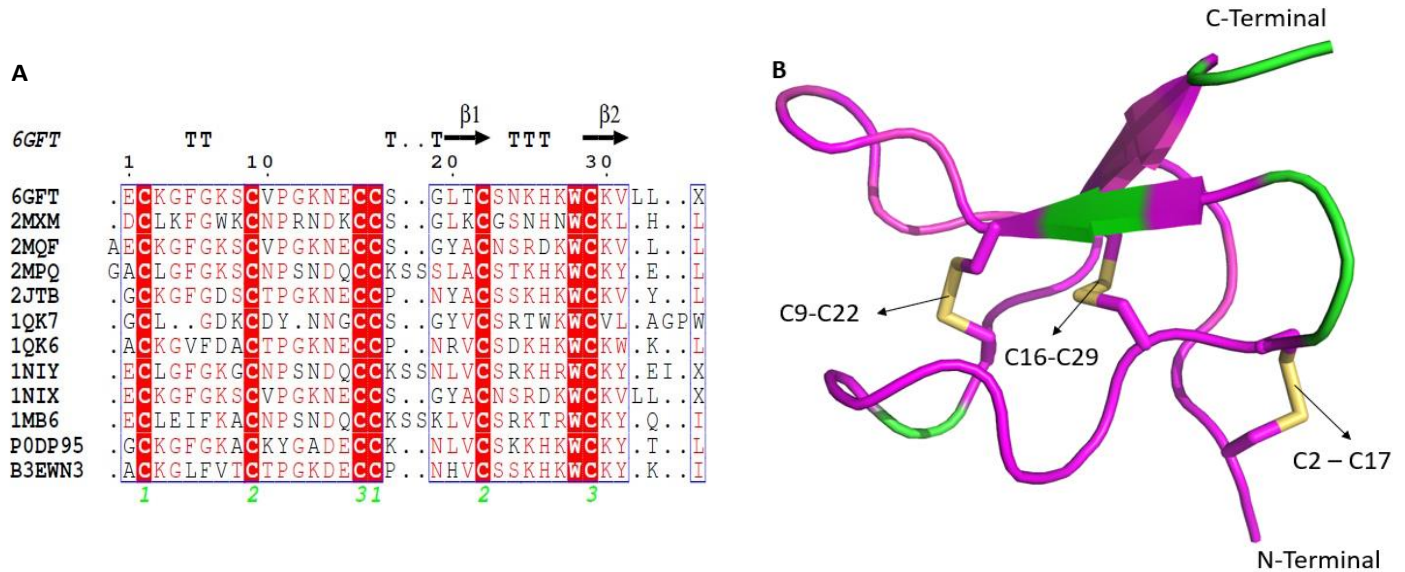
<i>Thrixopelma pruriens</i>	Mu- terapotox ina-Tp1a	<b>2MXM</b> <b>P0DL64</b>	33	57.1	100	0.630	Inhibe preferentemente los canales hNav1.7, Nav1.6, Nav1.2, Nav1.1 y Nav1.3	<b>(Cardoso, y otros, 2015)</b>
<i>Cyriopagopus schmidtii</i>	U5- terafotox ina - Hs1a 1	<b>1QK7</b> <b>Q86C51</b>	32	42.9	100	1.528	Aglutina eritrocitos humanos y de ratón, con toxicidad muy baja tanto en mamíferos e insectos.	<b>(Lü, Liang, &amp; Gu, 1999)</b>
<i>Cyriopagopus schmidtii</i>	Huwento xin-IV	<b>1MB6</b> <b>P83303</b>	35	41.9	100	0.591	Inhibe preferentemente los canales hNav1.7, Nav1.6, Nav1.2 y Nav1.3	<b>(Minasian, y otros, 2013)</b>

*Nota: aa: Número de aminoácidos, seq%: Porcentaje de identidad de secuencia. sse%: Porcentaje de identidad de estructura secundaria. RMSD: Desviación cuadrática media de la posición de los C $\alpha$  que componen cada secuencia. Las celdas sombreadas con gris corresponden a péptidos encontradas tanto en UNIPROT (homología secuencia) como en PDBefold (homología secuencial).*

### 3.1.2 Análisis de Alineamiento múltiple de secuencias

Del alineamiento múltiple de secuencia realizado con la herramienta T-coffee, de las 12 toxinas antiepilépticas seleccionadas que fueron ingresadas en ESript 3.0, se logra evidenciar una alta similitud global entre todos los aminoácidos coloreados de color rojo y agrupados en cajas de similitud color azul. Incluso encontrándose regiones de identidad estricta del aminoácido Cisteina (Cys) que posee un 100% de similitud entre las columnas de los 12 péptidos alineados (Figura 4A). Estos aminoácidos interactúan entre si formando tres puentes disulfuro que resultan en el motivo estructural de proteína conocido como nudo de cistina, de los que se conocen tres tipos: Factor de crecimiento del nudo de cistina (GFCK), Inhibidor del nudo de cistina (ICK) y Nudo cíclico de cistina o ciclotide (Anexo 2). De estos el motivo ICK es comúnmente adoptado por los péptidos de toxinas de arácnidos y moluscos **(Dabrowski-Tumanski, y otros, 2018)**. Se puede apreciar la

conformación ICK en la representación 3D del péptido de araña Cyriotoxina-1a (6GFT) en la Figura 5-B, para este péptido en particular se aprecia que los puentes disulfuro enumerado con un subíndice verde 1, 2 y 3 en el alineamiento de Figura 4B es producto de la interacción entre la Cys (2-17), Cys (9-22) y Cys (16-29) respectivamente.

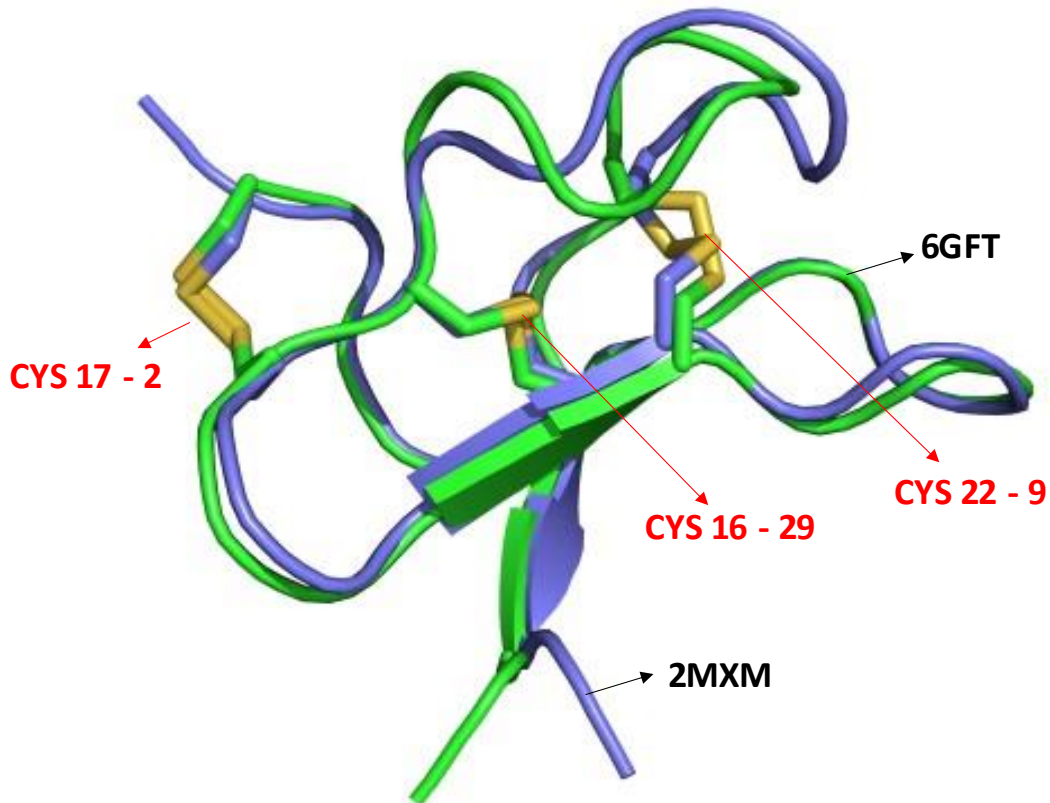


**Figura 4. Análisis secuencial y estructural de péptidos Antinociceptivos.**

(A). Alineamiento múltiple de secuencias antinociceptivas con un parámetro de puntaje de global de identidad mínimo del 50% utilizando plataforma bioinformática ESript 3.0. (Robert & Gouet, 2014). (B). Modelo tridimensional de cyriotoxin-1a (Código PDB: 6GFT) región conservada en “rosa” región no conservada en “verde” y tres puentes disulfuro en “amarillo”.

En la Figura 5 se demuestra la superposición espacial entre péptidos de especies tarántulas diferentes: Cyriotoxina-1a (6GFT) y Mu-terapotoxina-Tp1a (2MXM). El primero aislado de *Cyriopagopus schioedtei*, tarántula de tierra originario de Malasia; mientras que el segundo corresponde *Thrixopelma pruriens* exclusiva de América del sur, principalmente en Chile y Perú. Ambas provienen de regiones geográficas muy distante; sin embargo, a pesar de ello los péptidos de cada una de estas especies son muy similares. Tanto así que en ambos péptidos los puentes disulfuro 1, 2 y 3 coinciden entre la interacción de Cys (2-17), Cys (9-22) y Cys (16-29) respectivamente. Además, la desviación cuadrática media (RMSD) determinada con PYMOL es tan solo de 0.630, lo que sugiere una elevada similitud estructural. Esto indica que no necesariamente existe una proporcionalidad entre

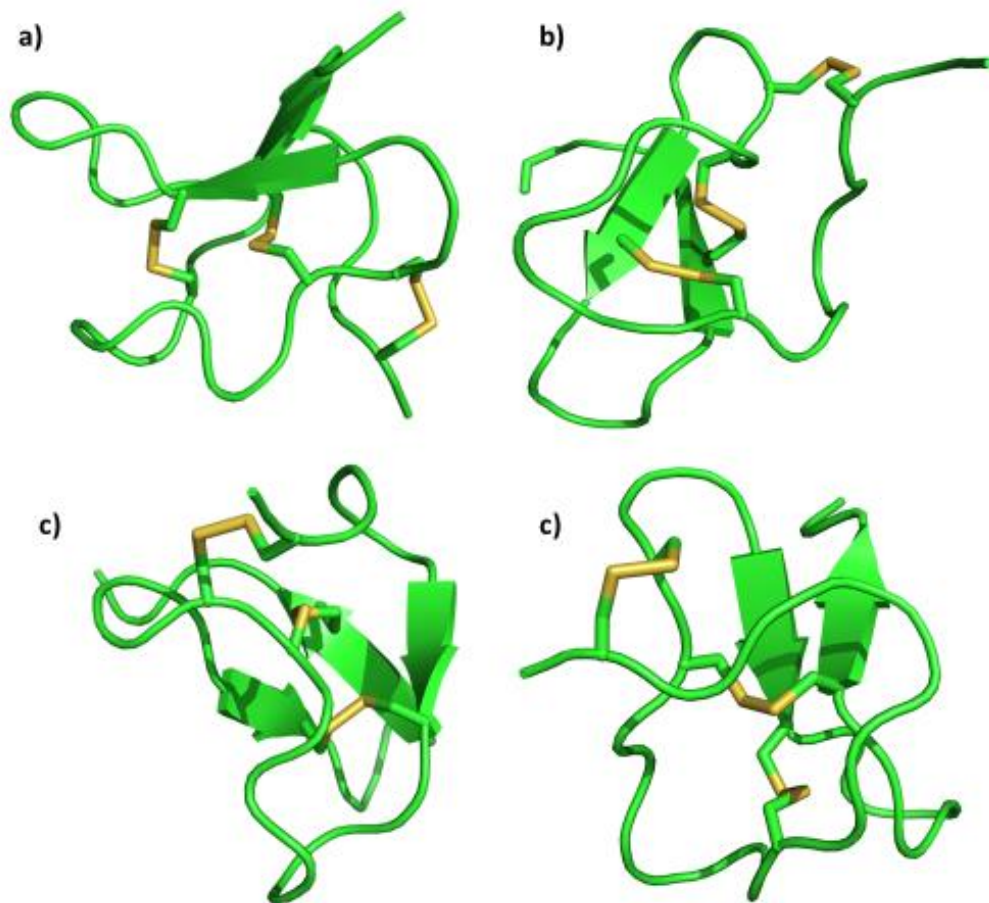
la similitud secuencial 57.1%, (tabla 3) con la similitud de la estructura tridimensional (Museo de Historia Natural de Berna, 2022).



**Figura 5.** Alineación de péptidos Antinociceptivos: *cyriotoxin-1a* y *Mu-terapotoxina-Tp1a*

*Alineación por superposición de 6GFT en “Verde” y 2MXM en “purpura” con PYMOL; puentes disulfuro en “amarillo”.*

En la Figura 6 se puede apreciar a la *cyriotoxina-1a* (a.6GFT), *Mu-terapeotoxina-Hhn2b* (b.2MQF), *Mu-terapotoxina-Tp1a* (c.2MXM) y *Huwentoxina-I* (d.1QK6). Estos 4 péptidos tomados como referencia de las 12 toxinas alineadas comparten la misma conformación estructural “típica de Knottina” que, de acuerdo con Ferrat, et al. (2005), consta de dos hojas beta antiparalelas acompañado de 2 o 3 hilos de residuos unidos a través de tres puentes disulfuro. Como se mencionó anteriormente, este tipo de estructura confiere la estabilidad necesaria para que dicho péptido logre desactivar o bloquear los canales iónicos transmembrana de las células del sistema nervioso central (SNC).



**Figura 6.** Estructuras tridimensionales de toxinas peptídicas con actividad antinociceptiva

a) *cyriotoxin-1a* (6GFT), b) *Mu-terapeotoxina-Hhn2b* (2MQF), c) *Mu-terapotoxina-Tp1a* (2MXM) y d) *Huwentoxin-I* (1QK6); puentes disulfuro en “amarillo”.

Las toxinas peptídicas han mostrado la capacidad de inhibir los 9 subtipos de canales iónicos detectados en la última década, siendo los subtipos 1.1 al 1.3 y 1.6 al 1.9 los que intervienen en la transmisión del dolor en el SNC. El canal 1.7 se posiciona como el principal objetivo o “target” de selectividad para reducir el dolor; mientras que el resto de los canales se relacionan con problemas cardiacos y neuromusculares (1.4, 1.5, y 1.6), la intervención inadecuada de estos puede ocasionar parálisis, inactividad e incluso la muerte al ser inhibidos (Gonçalves, Benoit, & Kurz, 2018).

Por lo tanto, es necesario identificar toxinas peptídicas que tengan como target principal los canales del dolor, característica que tienen en común los 12 péptidos recopilados en la tabla 3. Además, como se aprecia en las Figuras 5 y 6 estos péptidos tienen motivos estructurales muy similares. Coinciden espacialmente en los plegamientos de la hoja beta antiparalelas, los dos o tres hilos de residuos y los tres puentes de disulfuro. Esta estructura les confiere estabilidad al inhibir total o parcialmente los canales, evitando que los receptores capturen la señal del dolor, lo que resulta en un efecto antinociceptivo. Este mecanismo ha sido estudiado para el péptido cyriotoxin-1a (6GFT), por lo que esta actividad farmacodinámica puede ser extrapolable a los 12 péptidos agrupados, ya sea por su alta homología secuencial o estructural (**Gonçalves T. C., y otros, 2019**).

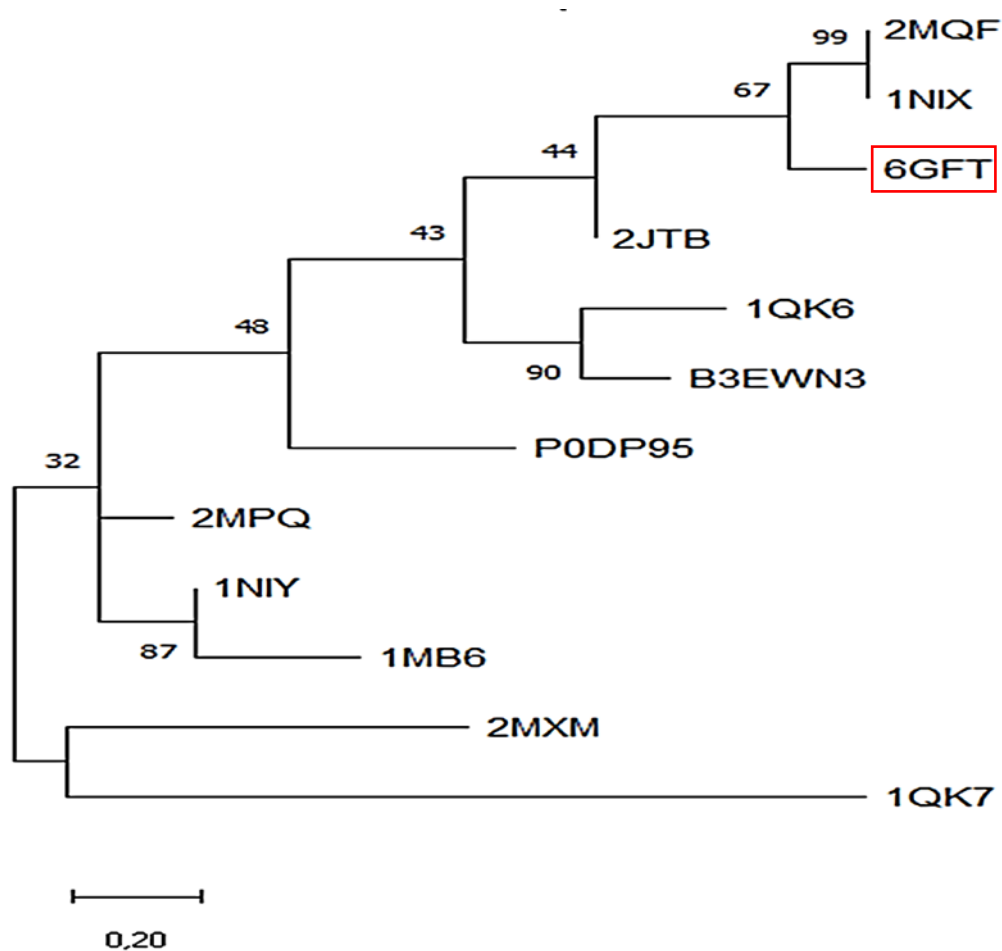
### **3.1.3 Análisis Filogenético**

En la representación del árbol filogenético Figura 7 se evidencia dos grupos muy diferenciados. El primero de ellos formado por diez péptidos, entre los que se encuentra el péptido plantilla cyriotoxin-1a (6GFT), el cual se encuentra estrechamente relacionado con los péptidos Mu-terapeotoxina-Hhn2b (2MQF) y Hainantoxina-I (1NIX). Los estudios del péptido plantilla 6GFT indican que actúa sobre los canales Nav (1.1-1.3; 1.6,11.7) en rangos nanomolares y en los canales NaV (1.4,1.5,1.8) en rangos micromolares, mostrando efectos analgésicos en las pruebas *in vivo* e *in vitro*. De acuerdo con las conclusiones de la investigación, el perfil farmacológico del péptido puede ser optimizado con ingeniería molecular (**Gonçalves T. C., y otros, 2019**). Este es un enfoque que ha sido aplicado sobre el péptido Mu-terapeotoxina-Hhn2b (2MQF) cuyo perfil farmacológico muestra actividad analgésica sobre los 100  $\mu$ M; por lo que se le introdujeron mutaciones que aumentaron su actividad a rangos nanomolares (**Klint, Chin, & Mobli, 2015**). En el caso de Hainantoxina-I (1NIX) este se encuentra estrechamente relacionado con 2MQF y 6GFT en el árbol filogenético, por lo que se podría inferir que comparten un perfil farmacológico similar. Los estudios de 1NIX indican que actúa como bloqueador del canal NaV 1.2 en insectos, pero sería necesario aplicar estudios sobre los canales del dolor NaV de mamíferos para corroborar su perfil farmacológico como antinociceptivo.

Por otro lado, la segunda rama está formada por tan solo dos péptidos, Mu-terapotoxina-Tp1a (2MXM) y U5- terafotoxina-Hs1a 1 (1QK7), nativos de las especies *Thrixopelma pruriens* y *Cyriopagopus schmidtii*, respectivamente. Además, se aprecia que, aunque ambos forman un grupo diferenciado, se encuentran separados por una apreciable distancia evolutiva, ya que ambas tarantulas corresponden a regiones geográficas distantes. El género *Thrixopelma* se distribuye por Chile y Perú, mientras que *Cyriopagopus* es común de China y Vietnam (**Natural History Museum Bern, 2022**) (**SpidCat, 2008**). Se puede destacar que 1QK7 es el péptido con mayor RSMD de 1.528 y menor similitud secuencial 42.9% respectivamente (tabla 3), por lo que dentro del árbol en general tiene el mayor distanciamiento con respecto a los 12 péptidos del grupos.

Cabe mencionar que el estado evolutivo se observa por la longitud de cada ramal, mientras más longitud posee menos conservación tiene con respecto a las características del ancestro común. De manera análoga si se tiene una distancia muy corta entre péptidos del mismo grupo o ramal, como ocurre entre 1NIX y 2MQF, son toxinas con una gran distancia evolutiva del ancestro común, pero entre ellas tiene una alta conservación entre sus características fisicoquímicas. Mientras que los péptidos Mu-terapotoxina-Hd1a (2MPQ) y Mu-terapeotoxina-Hhn1b 1 (1NIY) serían los más cercanos con el ancestro común de todos los péptidos, con la menor distancia evolutiva hacia el nodo central del árbol. Se puede apreciar que, aunque la mayoría de los péptidos provienen del género *Cyriopagopus* propia de Asia, la formación de grupos o clados se ve afectada por la distancia evolutiva de las diferentes especies adaptadas a las condiciones de su región específica por lo que puede ser indicios de una evolución divergente.





**Figura 7.** Árbol filogenético del grupo de toxinas antinociceptiva

Árbol filogenético generado de las secuencias de aminoácidos de péptidos Antinocieptivos, por el modelo Dayhoff; método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud). Péptido plantilla cyriotoxina-1<sup>a</sup> (6GFT) resaltado en recuadro rojo, a partir del cual se seleccionaron los demás péptidos de secuencia y estructura semejante. Mu-terapeotoxina-Hhn2b (2MQF). Hainantoxina-I (1NIX). Hainantoxina-III 1 (2JTB). Huwentoxina-I (1QK6). Beta / kappa-terapotoxina-Hlv1a (B3EWN3). Mu-terapotoxina-Osp1a (P0DP95). Mu-terapotoxina-Hd1a (2MPQ). Mu-terapeotoxina-Hhn1b 1 (1NIY). Huwentoxin-IV (1MB6). Mu-terapotoxina-Tp1a (2MXM). U5-terafotoxina-Hs1a 1 (1QK7).

## 3.2 Péptidos Antiepilépticos

### 3.2.1 Recopilación de secuencias con homología secuencia y estructural

El estudio del péptido plantilla Delta- terafotoxina –Hm1b (6V6T) aislado *Heteroscodra maculata* ha evidenciado su capacidad para inhibir o disminuir el denominado Síndrome

de Dravet (SD), una encefalopatía epiléptica severa y farmacorresistente. Los estudios sobre estos péptidos, recopilados en la Tabla 4, muestran que actúan por un mecanismo dual de “activación” del canal iónico de sodio transmembrana (NaV) o “inhibición” del canal de potasio transmembrana (KV). Los péptidos antiepilépticos con efecto farmacológico por mecanismo de activación tienen como target principal a los subtipos 1.1 y 1.3 de los canales (NaV); ya que la mutación de los canales NaV dependientes de voltaje está estrechamente relacionada con el SD. También, se estima que 10% de los canales de potasio están asociados con la epilepsia en humanos; por lo que se estudia la capacidad de ciertos péptidos de actuar por mecanismo de inhibición del canal de potasio (Kv2.1) (Köhling & Wolfart, 2016). Ambos mecanismos mostrando efectos terapéuticos efectivos para contrarrestar los síntomas del mencionado SD.

**Tabla 4.** *Toxinas peptídicas con actividad Antiepiléptica*

Espece	Péptido	Código PBD UniProt	aa	%seq	%sse	RMSD	Mecanismos de acción	Referencias
<i>Heteroscodra maculata</i>	Delta-terafotoxina – Hm1b	6V6T P0DOC5	35	100	100	0.0	Activador del canal de sodio 1.1 (NaV1.1)	(Chow, y otros, 2020)
<i>Stromatopelma calceatum griseipes</i>	Kappa-terafotoxina-SGTx1	1LA4 P56855	34	87.9	-	1.115	Inhibe de forma reversible los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2.1	(Lee, y otros, 2004)
<i>Grammostola rosea</i>	Kappa-terafotoxina-Gr1b	P56853	35	80.6	-	1.545	Inhibe los canales Kv2.1	(Swartz & MacKinnon, 1995)
<i>Heteroscodra maculata</i>	Delta-terafotoxina - Hm1a	2N6O P60992	35	79.4	100	1.331	Inhibe la inactivación del canal Nav1.1 y moderadamente la de Nav1.2	(Richards K. L., y otros, 2018)

								Bloquea moderadamente Kv2.1	
<b><i>Grammostola rosea</i></b>	Kappa-terafotolina a - Gr1a	1D1H P56852	35	77.8	-	1.497		Inhibe los canales de potasio activados por voltaje Kv2.1, Kv4.2 y Cav2.1	<b>(Takahashi, y otros, 2000)</b>
<b><i>Psalmopoeus cambridgei</i></b>	Tau / kappa-terafotolina - Pc1a	P0C244	35	71.4	-	1.501		Activa selectivamente el TRPV1 de mamífero Inhibe significativamente los canales de potasio Kv2.1	<b>(Siemens, y otros, 2006)</b>
<b><i>Monocentropus balfouri</i></b>	Mu / omega-terafotolina - Mb1a	P0DUC1	32	69.7	-	1.383		Toxina parálitica que inhibe los canales de sodio (Nav) y calcio (Cav) dependientes de voltaje.	<b>(Smith, y otros, 2017)</b>
<b><i>Chilobrachys guangxiensis</i></b>	Kappa-terafotolina - Cg1a 1	2A2V P0C247	34	67.6	100	1.144		Inhibe Nav1.5 y Kv2.1. Inhibe parcialmente Kv4.2 y Kv4.1	<b>(Tang, y otros, 2014)</b>
<b><i>Psalmopoeus cambridgei</i></b>	Tau-terafotolina - Pc1b	P0C245	35	66.7	-	1.343		Activa selectivamente el receptor de capsaicina de mamíferos TRPV1 y TRPV1 aviar	<b>(Siemens, y otros, 2006)</b>
<b><i>Pamphobeteus nigricolor</i></b>	Mu-terafotolina - Pn3a	5T4R P0DM12	35	61.8	-	1.283		Inhibe canal de Sodio	<b>(Nicola, y otros, 2017)</b>

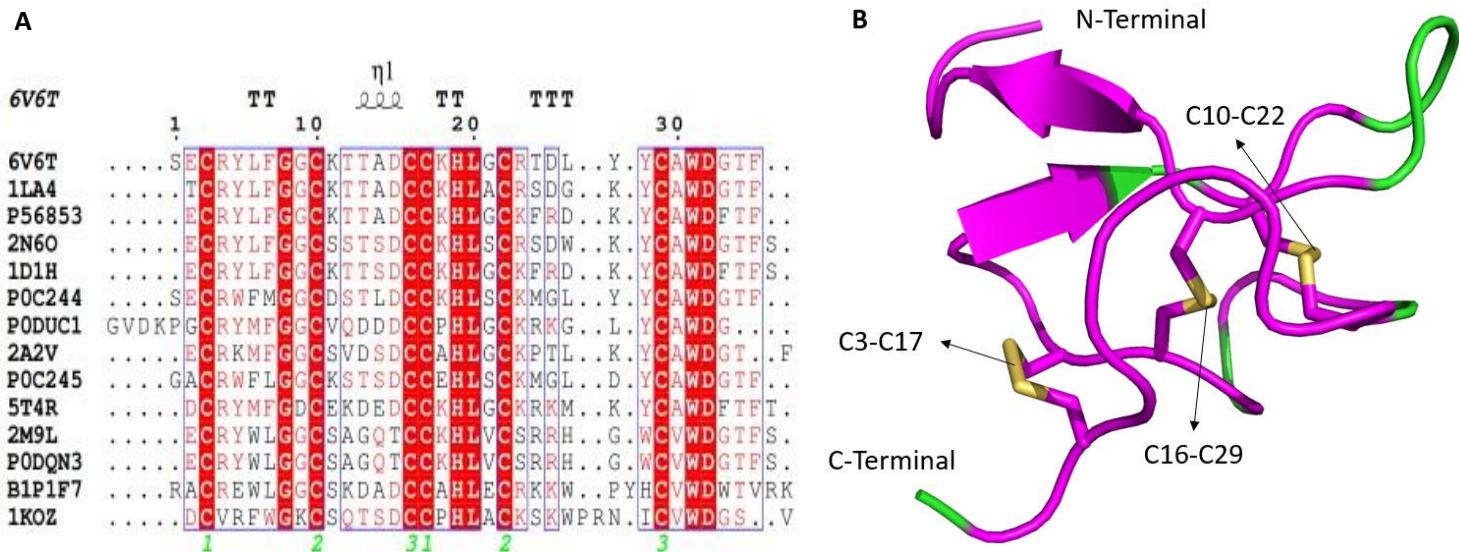
							dependiente de voltaje Nav1.7. Inhibe débilmente otros canales de Na.	<b>otros, 2019)</b>
<i>Thrixopelma pruriens</i>	Beta/omega-terafotoxina-Tp1a	2M9L P83480	35	55.6	-	2.043	Inhibe el canales dependiente de voltaje Cav3.1, Kv2.1, Nav1.2, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8. Inhibe canal catiónico nociceptor TRPA1	<b>(Nicola s, y otros, 2019)</b>
<i>Bumba pulcherrima klaasi</i>	Beta / omega-terafotoxina-Bp1a	P0DQN 3	35	55.6	-	2.095	Inhibe el canales dependiente de voltaje Cav3.1, Kv2.1, Nav1.2, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8. Inhibe canal catiónico nociceptor TRPA1	<b>(Rupasinghe, 2020)</b>
<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Mu-terafotoxina-Cg1a	B1P1F7	38	54.8	-	1.456	Inhibidor potente y selectivo de hNav1.7 y actividad débil hacia Nav1.3. Muestra actividad analgésica en tres modelos de dolor en roedores	<b>(zheng, Ley, &amp; Hu, 2018)</b>

<b><i>Grammostol a rosea</i></b>	Omega- terafoto xina- Gr1a	1KOZ P60590	37	41.9	-	1.474	Inhibe los canales de calcio dependientes de Cav2.1 y Cav2.2. Inhibe moderadamente Kv2.1 Inhibe débilmente Kv11.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.7.	(Corre nti, y otros, 2018)
--------------------------------------	-------------------------------------	----------------	----	------	---	-------	---	-------------------------------------

*Nota: aa: Número de aminoácidos, seq%: Porcentaje de identidad de secuencia. sse%: Porcentaje de identidad estructura secundaria. RMSD: Desviación cuadrática media de la posición de los C $\alpha$  que componen cada secuencia. Las celdas sombreadas con gris corresponden a péptidos encontradas tanto en UNIPROT (homología secuencia) como en PDBefold (homología secuencial).*

### 3.2.2 Análisis de Alineamiento múltiple de secuencias

En el análisis de las catorce toxinas peptídicas se evidencia la alta similitud entre los aminoácidos englobados en recuadros azules que indican una elevada identidad global o un motivo estructural conservado. Además, en este grupo de péptido podemos distinguir que existe una identidad estricta no solo en los puentes disulfuro de Cisteína (Cys); sino que también existe una identidad estricta en seis aminoácidos que corresponden a: Glicina (Gly), Histidina (His), Luecina (Leu), Triptofano (Trp), y Acido aspártico (Asp) (Figura 8a). En la figura de la derecha (Figura 8B) se refleja la estructura tridimensional de la toxina Delta- terafotoxina-Hm1b (6V6T) de la especie *Heteroscodra maculata*, tarántula originaria de África; donde la región conservada de la secuencia esta pintada en color rosa. La Ilustración B muestra un característico plegamiento alfa hélice que según lo descrito por varios autores son estructuras formadas por un número de entre 25 y 40 aminoácidos, entre los que predominan, lisina, leucina y glicina. Sin embargo, en estas toxinas se refleja también la presencia de histidina, asparagina y triptófano (Beltrán, 2014).



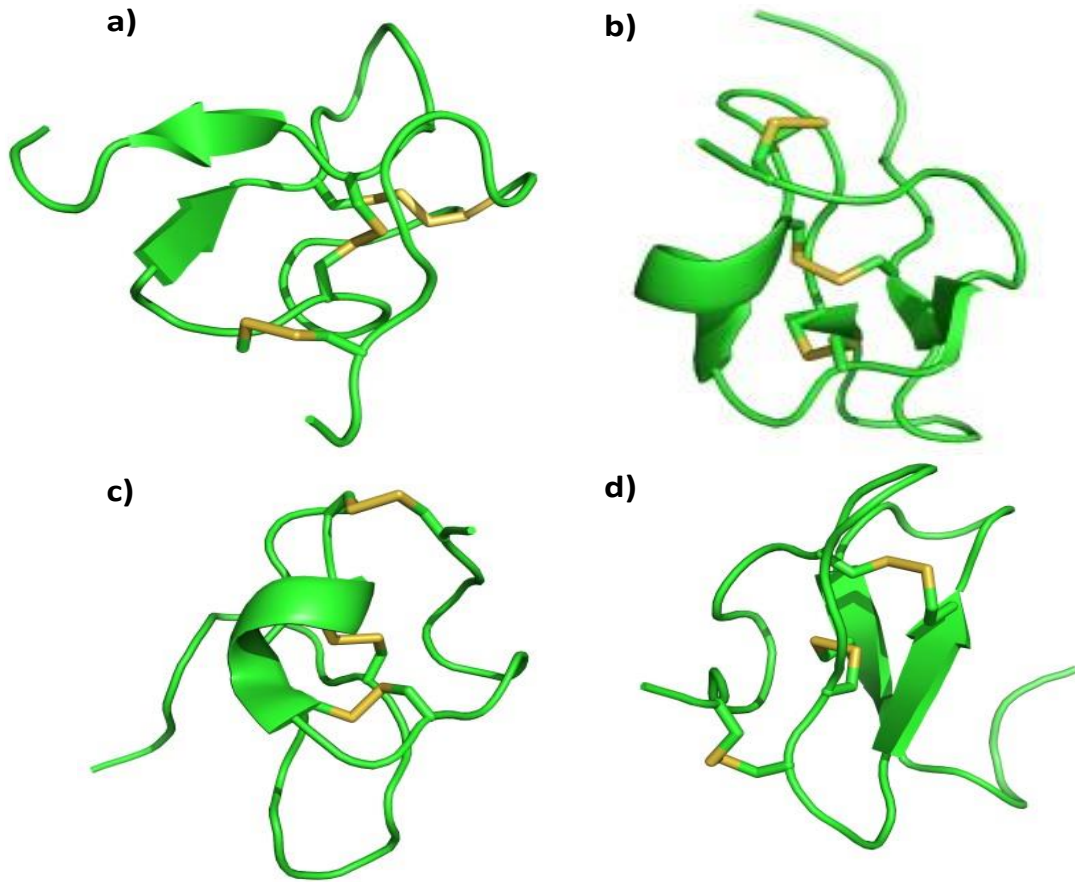
**Figura 8. Análisis secuencial y estructural de péptidos antiepilépticos**

(A). Alineamiento múltiple de secuencias antiepilepticas con un parámetro de puntaje de global de identidad mínimo del 50% utilizando plataforma bioinformática ESript 3.0. (Robert & Gouet, 2014). (B). Modelo tridimensional de Delta- terafotoxina-(Hm1b) (Código PDB: 6V6T) región conservada en “rosa” región no conservada en “verde” y tres puentes disulfuro en “amarillo”.

En la Figura 8B se aprecia que el péptido antiepiléptico Delta- terafotoxina–Hm1b (6V6T) adopta la conformación ICK. Se observa que los puentes disulfuro distinguidos con los subíndices en verde 1, 2 y 3 en el alineamiento de Figura 8A ocurren entre la Cys (3-17), Cys (10-22) y Cys (16-29) respectivamente. Estas son posiciones de interacción bastante similar con el péptido Antinociceptivos de araña cyriotoxina-1a (6GFT) anteriormente descrito que también adopta un motivo ICK. Este tipo de motivo estructural Knottina se caracteriza por ser muy estable a diferentes pH, calor y enzimas; además de que el resto de los componentes o residuos de los péptidos de venenosos actúan sobre canales iónicos activados por voltaje mostrando propiedades farmacodinámicas prometedoras para diversas terapias médicas (Kintzing & Cochran, 2016).

Estructuralmente las conformaciones de los péptidos de las toxinas comparten las características indispensables para su funcionamiento y estabilidad para lograr el mecanismo de acción de interés (antiepiléptico). Al igual que el anterior grupo comparte la singularidad de poseer tres puentes disulfuro, pero a diferencia del anterior estos poseen

2  $\alpha$ -hélices en lugar de hojas plegada  $\beta$ . Las estructuras de la Figura 9 a pesar de tener diferente similitud secuencial a) 100%, b) 79.4%, c) 55.6%, d) 87.9%, tiene conformaciones terciarias con características y mecanismos de acción similares; por ende, también podrían compartir los efectos terapéuticos del péptido plantilla 6V6T. (**Richards & Milligan, 2018**).

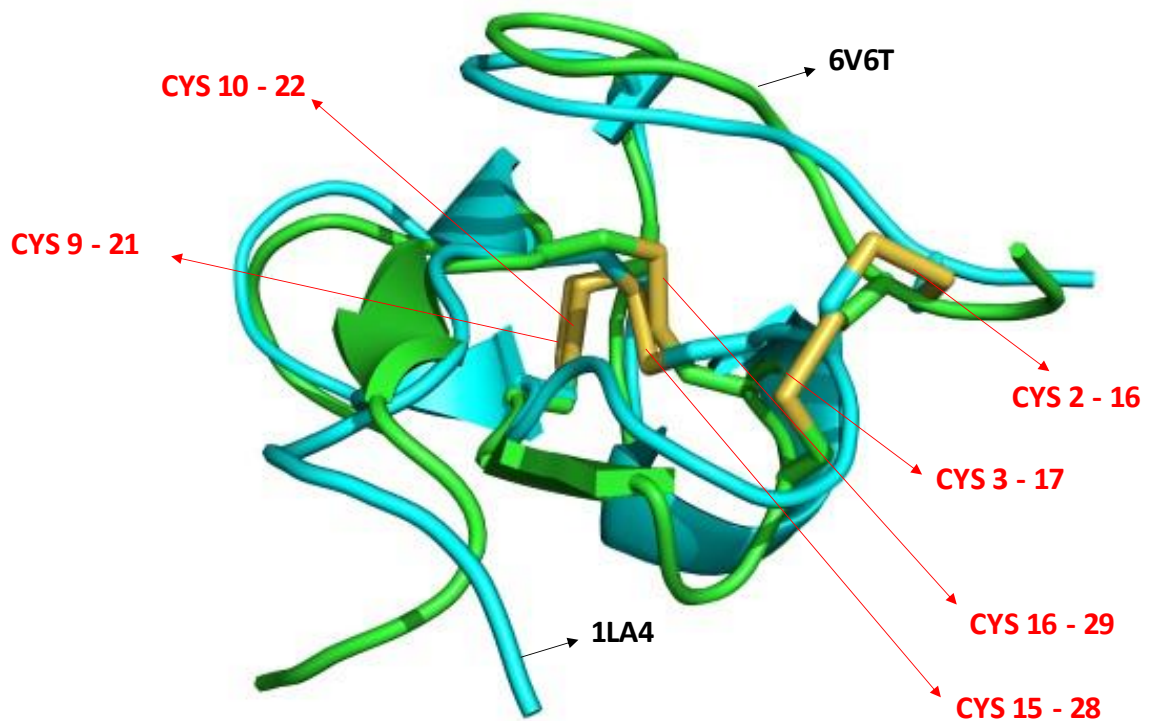


**Figura 9.** Estructuras tridimensionales de toxinas peptídicas con actividad antiepiléptica

a) Delta- terafotoxina-Hm1b (6V6T), b) Delta-terafotoxina-Hm1a (2N6O), c) Beta/omega-terafotoxina-Tp1a (2M9L) y d) Kappa-terafotoxina-Scg1a (1LA4); puentes disulfuro en “amarillo”.

Para corroborar lo antes mencionado se alineo las estructuras de Delta- terafotoxina-Hm1b (6V6T) y Kappa- terafotoxina-Scg1a (1LA4) representado en la Figura 10. Dando como resultado un RMSD de 1.115, que indica de que ambas toxinas comparten una similitud

considerable de su conformación espacial; aunque, estos péptidos provengan de especies diferentes *Heteroscodra maculata* para (6V6T) y *Stromatopelma calceatum griseiceps* para (1LA4). Cabe mencionar que a diferencia de la alineación de los péptidos Antinociceptivos superpuestos donde coincidían las cisteínas que forman los puentes disulfuro (Cys - Cys); en esta superposición se presenta una variación de una posición en el orden las cisteínas que forman los puentes. Siendo que para 6V6T se forman los puentes entre la Cys (3-17), Cys (10-22) y Cys (16-29); mientras que 1LA4 los forma entre Cys (2-16), Cys (9-21) y Cys (15-28).



**Figura 10.** Alineación de péptidos antiepilépticos: Delta- terafotoxina-(Hm1b) y Kappa- terafotoxina  $\alpha$ -Scg1a

Alineación por superposición de 6V6T en “verde” y 1LA4 en “turquesa” con PYMOL; puentes disulfuro en “amarillo”.

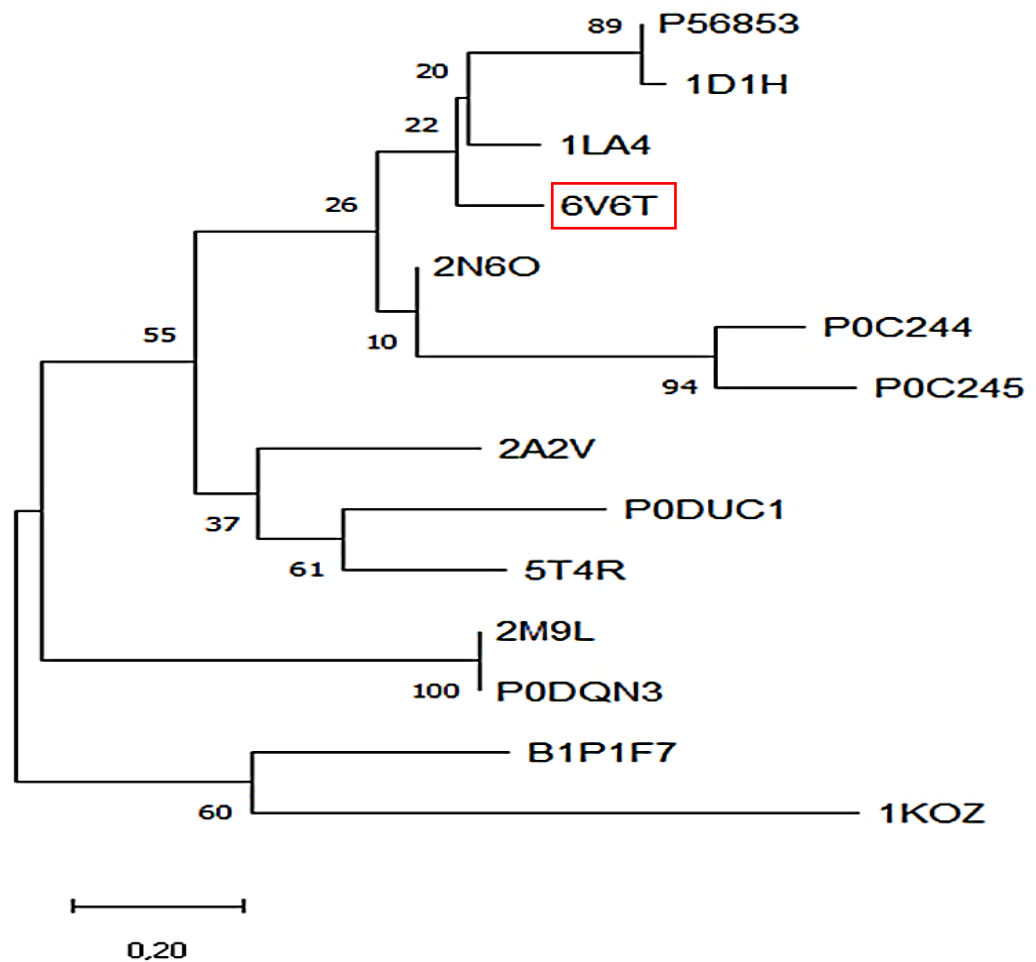


### 3.2.3 Análisis Filogenético

En el árbol filogenético que se indica en la Figura 11 se aprecia que el péptido plantilla Delta-terafotoxina-Hm1b (6V6T) mantiene una relación cercana con Kappa-terafotoxina-Scg1a (1LA4). En el caso del péptido 6V6T se ha probado su efectividad como activador de los canales NaV1.1 funcionales de las interneuronas reducidas por el SD. En el mencionado estudio se encontró que el péptido recombinante Hm1b tenía una mayor estabilidad en el fluido cerebro espinal, sin embargo, se deben efectuar ensayos clínicos para determinar las dosis y vía de administración efectiva (**Chow, y otros, 2020**). Para el caso de 1LA4 se ha demostrado su actividad como inhibidor del canal KaV 1.2 dependiente de voltaje. Según investigaciones los defectos de NaV1.1, Kv 2.1 y otros miembros de la subfamilia de los canales dependientes de voltaje están relacionados con las encefalopatías epilépticas. De acuerdo con este estudio de canalopatías, las enfermedades como Síndrome de Dravet puede desencadenarse por mutaciones en los genes que codifican las subunidades de estos canales (**Xu, Zhang, Gozal, & P., 2021**). Dado que los péptidos 6V6T y 1LA4 comparten una relación cercana de filialidad dentro del árbol como una similitud de secuencia del 87.9% y RSMD 1.114. Podemos inferir que sus secuencias son excelentes candidatas como modelos para el desarrollo de péptidos sintéticos con un posible perfil farmacológico dual como activadores de los canales NaV e inhibidoras de los canales Kv.

Por otro lado, en el árbol de la figura 11 se aprecian tres pares de péptidos con la misma distancia evolutiva: Kappa-terafotoxina-Gr1b (P56853) con Kappa-terapia fotoxina-Gr1a (1D1H), Tau/kappa-terafotoxina-Pc1a (P0C244) con Tau-terafotoxina-Pc1b (P0C245) y Beta/omega-terafotoxina-Tp1a (2M9L) con Beta / omega-terafotoxina-Bp1a (P0DQN3) respectivamente. En el caso P56853 y 1D1H ambos son provienen de la tarántula *Grammostola rosea*; mientras P0C244 y P0C245 proviene de la especie *Salmopoeus cambridgei*; los que justifica su relación cercana y agrupación en el mismo grupo. Sin embargo, 2M9L con P0DQN3 fueron aislados de *Thrixopelma pruriens* y *Bumba pulcherrimaklaasi*, ambas son tarántulas sudamericanas, pero de especies y géneros diferentes. A pesar de ello este último par comparten una similitud muy arraigada que las

mantiene en una misma distancia evolutiva; al tener una similitud exacta de su secuencia de aminoácidos como se puede apreciar en la figura 8A, así como un RSMD de 2.000 (tabla 4). La características de este árbol filogenético muestra una relación muy cercana entre todos los péptidos, ya sean estos provenientes de la misma o diferentes especies. Las distancias evolutivas cercanas entre los diferentes clados podría reflejar una evolución convergente de estos péptidos con funciones similares en diferentes especies para adaptarse al mismo medio o hábitat (Stern, 2013).



**Figura 11.** *Árbol filogenético del grupo de toxinas antiepiléptico*

*Árbol filogenético generado de las secuencias de aminoácidos de péptidos Antinocieptivos, por el modelo WAG+G; método Maximum Likelihood Péptido platilla Delta- terafotoxina -Hm1b (6V6T) resaltado en recuadro rojo, a partir del cual se seleccionaron los demás péptidos de*

secuencia y estructura semejante. *Kappa-terafotoxina-Gr1b* (P56853). *Kappa-terafotoxina-Gr1a* (1D1H). *Kappa-terafotoxina-Scg1a* (1LA4). *Delta-terafotoxina-Hm1a* (2N6O). *Tau/kappa-terafotoxina-Pc1a* (P0C244). *Tau-terafotoxina-Pc1b* (P0C245). *Kappa-terafotoxina-Cg1a 1 2A2V*. *Mu / omega-terafotoxina-Mb1a* (P0DUC1). *Mu-terafotoxina-Pn3a* (5T4R). *Beta/omega-terafotoxina-Tp1a* (2M9L). *Beta / omega-terafotoxina-Bp1a* (P0DQN3). *Mu-terafotoxina-Cg1a* (B1P1F7). *Omega-terafotoxina-Gr1a* (1KOZ),

### 3.3 Péptidos Anticancerígenos

#### 3.3.1 Recopilación de secuencias con homología secuencia y estructural

La administración directa de los cocteles de toxinas de los venenos de animales como cobras, alacranes, arañas, escorpiones; causan paro cardiaco, necrosis tisular grave, parálisis, entre otras afecciones de relevancia para la salud. Los estudios moleculares, en cocteles de toxinas de ciertas especie de cobra, han permitido diferenciar ciertos péptidos con alrededor de 60 aminoácidos con cualidades citolíticas potencialmente aprovechables para desarrollar tratamientos anticancerígenos por necrosis celular. Las líneas celulares cancerosas de laboratorio a menudo conllevan un complejo estudio y análisis de cada una de las vías posibles para su control. Las principales y más frecuentemente utilizadas son las que poseen actividad hemolítica y citolítica; ambas inducen un mecanismo de acción específicamente sobre los fosfolípidos, componentes sulfatados y los canales iónicos, principalmente de potasio, de las líneas celulares. Dentro de este grupo los más estudiados por su efectividad son las citotoxinas, que actúan directamente sobre los fosfolípidos de membrana de las células cancerígenas; por los mecanismos de acción que se detallan en la Tabla 5. (Susuki, Athauda, & Moriyama, 2015).

**Tabla 5.** *Toxinas peptídicas con actividad Anticancerígenas*

Especie	Péptido	Código	aa	%se q	%sse e	RMSD	Mecanismos de acción	Referencias
<i>Naja kaouthia</i>	Citotoxina 3 – CTX3	<b>6RC7</b> <b>P01446</b>	60	100	100	0.0	Inhibidores del crecimiento por necrosis en líneas celulares pulmonares A549; y apoptosis tardía en líneas	(Chong, Tan, & Tan, 2020)

							celulares de próstata PC-3 y líneas celulares de mama MCF-7	
<i>Naja naja</i>	Citotoxina 8 – CTX8	<b>P86540</b>	60	91.7	-	0.967	Actividad citolítica, forma poros en membrana lipídica. Actividad hemolítica hacia eritrocitos humanos.	(Suzuki, Athauda, Suzuki, Matsubara, & Moriyama, 2016)
<i>Naja atra</i>	Citotoxina 5 - CTX-A4b	<b>1CHV P07525</b>	60	91.7	-	0.946	Cardiotóxico y citotóxica para las células del sarcoma de Yoshida.	(Jayaraman, y otros, 2000)
<i>Naja atra</i>	Citotoxina IV - CTX4	<b>1KBT P01443</b>	60	91.5	-	0.946	Se une a las sulfátidas membrana celular y despolariza los cardiomiocitos.	(Lee, y otros, 2014)
<i>Naja kaouthia</i>	Citotoxina 1 - CX1	<b>P60305</b>	60	88.3	-	0.952	Actividad citolítica. Actividad insulínica, modulada por canales de potasio (Kv)	(Nguyen, y otros, 2014)
<i>Naja atra</i>	Citotoxina 1 - CTX1	<b>2CDX P60304</b>	60	88.3	-	1.092	Se une a las sulfátidas membrana celular y despolariza los cardiomiocitos. Causa necrosis del músculo esquelético en ratones	(Jahnke, Mierke, Béress, & Kessler, 1994)
<i>Naja oxiana</i>	Citotoxina 1 – CT1	<b>5NPN P01451</b>	60	86.7	-	1.005	Tipo S. Interactúa y penetra en la membrana celular, con las puntas de los tres bucles.	(Dubovskii, y otros, 2017)

<i>Naja mossambica</i>	Citotoxina 4 - CTXM3	<b>1CDT P01452</b>	60	81.7	100	0.925	Tipo S, residuo de serina en posición 28. Actividad citolítica en muchas células, formando poros en las membranas lipídicas.	<b>(Chien, y otros, 1994)</b>
<i>Naja oxiana</i>	Citotoxina 2 – CT2	<b>1FFJ P01441</b>	60	81.7	100	0.936	Tipo P. Interactúa y penetra en la membrana celular, con las puntas de los tres bucles.	<b>(Duboski, y otros, 2005)</b>
<i>Naja pallida</i>	Cardiotoxina gamma - CRT $\gamma$	<b>1CXN P01468</b>	60	73.3	100	0.850	Tipo P. Se une a las sulfátidas membrana celular y despolariza los cardiomiocitos.	<b>(Gilquin, Roumesand, Zinn-Justin, Ménez, &amp; Toma, 1993)</b>
<i>Naja mossambica</i>	Citotoxina 1 – CTXM1	<b>2CCX P01467</b>	60	71.7	-	1.032	Tipo P, residuo de prolina en posición 30. Actividad citolítica en muchas células, formando poros en las membranas lipídicas.	<b>(O'Connell, Bougis, &amp; Wuthrich, 1993)</b>
<i>Hemachatus haemachatus</i>	Hemachatoxina de tres dedos- CTXH1	<b>3VTS B3EWH9</b>	61	67.2	100	1.104	Tipo P. Lisa los glóbulos rojos y tiene actividades cardiotoxicas e hipotensivas	<b>(Girish, y otros, 2012)</b>
<i>Naja atra</i>	Mu-elapitoxina-Na1a	<b>P0DUK7</b>	62	59.7	-	0.885	Potente inhibidor de hNav1.8, efecto reversible. No muestra actividades	<b>(Zhang, y otros, 2019)</b>

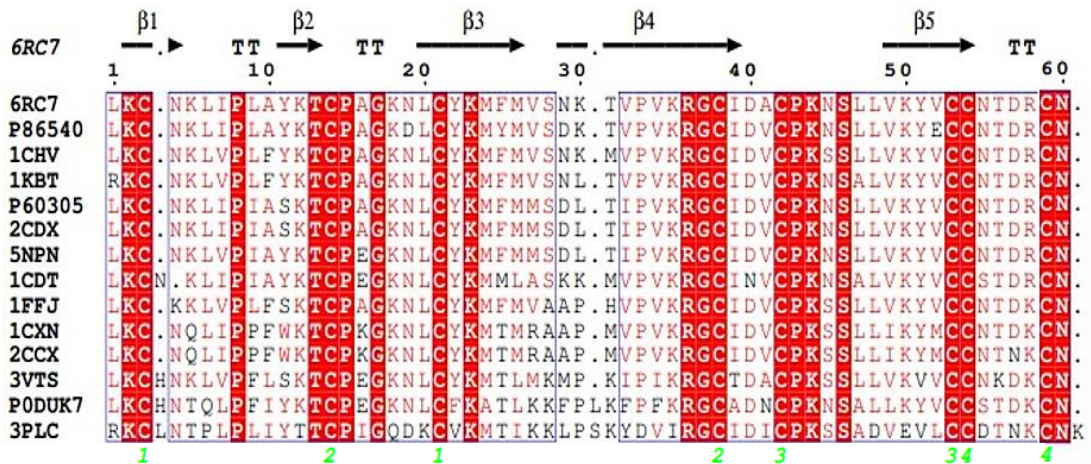
<i>Ophiopha gus hannah</i>	Beta- cardiotoxina CTX27	<b>3PLC Q69CK0</b>	63	53.8	80	0.920	citotóxicas, hemolíticas y cardiotóxicas Betabloqueante de los receptores adrenérgicos beta-1 y beta-2. Produce bradicardia.	<b>(Roy, y otros, 2019)</b>
------------------------------------	--------------------------------	------------------------	----	------	----	-------	---	-------------------------------------

*Nota: aa: Número de aminoácidos, seq%: Porcentaje de identidad de secuencia. sse%: Porcentaje de identidad de estructura secundaria. RMSD: Desviación cuadrática media de la posición de los C $\alpha$  que componen cada secuencia. Las celdas sombreadas con gris corresponden a péptidos encontradas tanto en UNIPROT (homología secuencia) como en PDBefold (homología secuencial).*

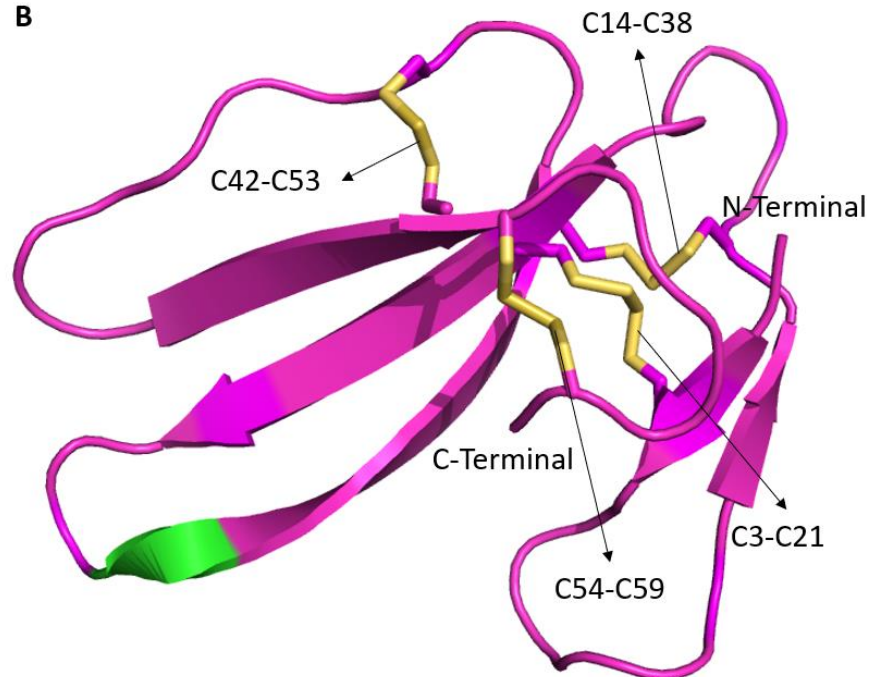
### 3.3.2 Análisis de Alineamiento múltiple de secuencias

En el alineamiento realizado para este grupo de 14 toxinas, se refleja una clara similitud secuencial en al menos más del 90% de sus aminoácidos, tal y como se evidencia en la Figura 13A. Los aminoácidos con una identidad estricta se encuentran en letras blancas y enmarcadas en cuadros rojo y son: Lisina (Lys), Cisteína (Cys), Prolina (Pro), Treonina (Thr), Glicina (Gly), Serina (Ser), Arginina (Arg) Asparragina (Asn). En la parte superior de la alineación de la Figura 12A se indica claramente los conjuntos de aminoácidos que forman las cinco láminas  $\beta$ . Mientras que en la Figura 12B se aprecia la representación tridimensional de las tres bucles de cadenas  $\beta$  conectadas por 4 puentes disulfuro y el resto de los aminoácidos que conforman el péptido. De acuerdo con **Kini & Doley, (2010)**, este motivo estructural corresponde a la superfamilia de proteínas de tres dedos (3FP o TFPD) que tienen la particularidad de poseer 3 bucles entrelazados por 4 puentes disulfuro. Estos bucles que simulan tres dedos garantizan la interacción que ocurre entre el péptido y la membrana celular por una reacción fosfaditilserina. Donde ocurre la unión de los fosfolípidos (polar - carga negativa) de la membrana, con la serina; el residuo lisina también interactúa de manera indirecta para que se genere dicha unión, además de los aminoácidos polares positivos y los bucles hidrofóbicos ver (Anexo 5).

A



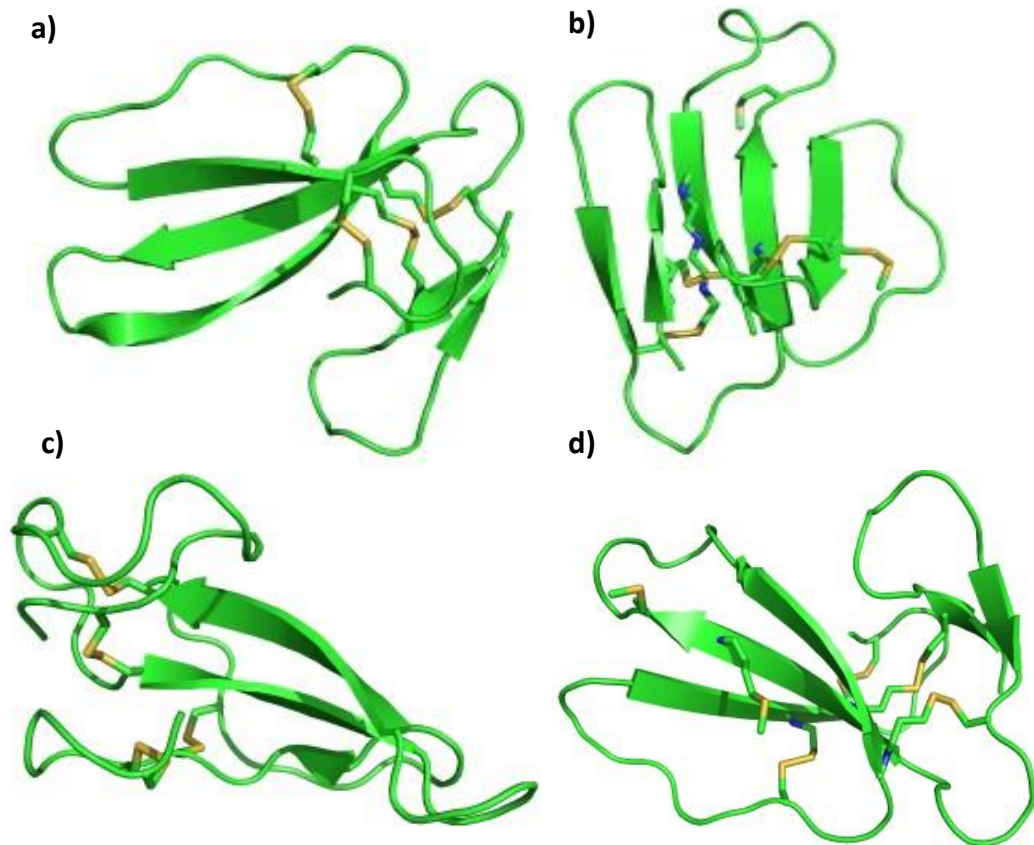
B



**Figura 12.** Análisis secuencial y estructural de péptidos anticancerígenos

(A). Alineamiento multiple de secunencias antiepilepticas con un parámetro de puntaje de global de identidad mínimo del 50% utilizando plataforma bioinformática ESript 3.0. (Robert & Gouet, 2014). (B). Modelo tridimensional de Delta-terafotoxina-(Hm1b) (Código PDB: 6V6T) región conservada en “rosa” región no conservada en “verde” y tres puentes disulfuro en “amarillo”.

Cuando existen diferentes toxinas en un mismo veneno hay una gran probabilidad de similitud tanto secuencial como estructural entre los péptidos que lo conforman. Esto sucede debido al resultado de la duplicación de genes (parólogos) y la evolución acelerada inclusive entre en especies (ortólogos) obteniendo lo que se conoce como isoformas y son las que se presentan en la Figura 13 (Susuki, Athauda, & Moriyama, 2015).



**Figura 13.** Estructura tridimensionales de toxinas peptídicas con actividad anticancerígena

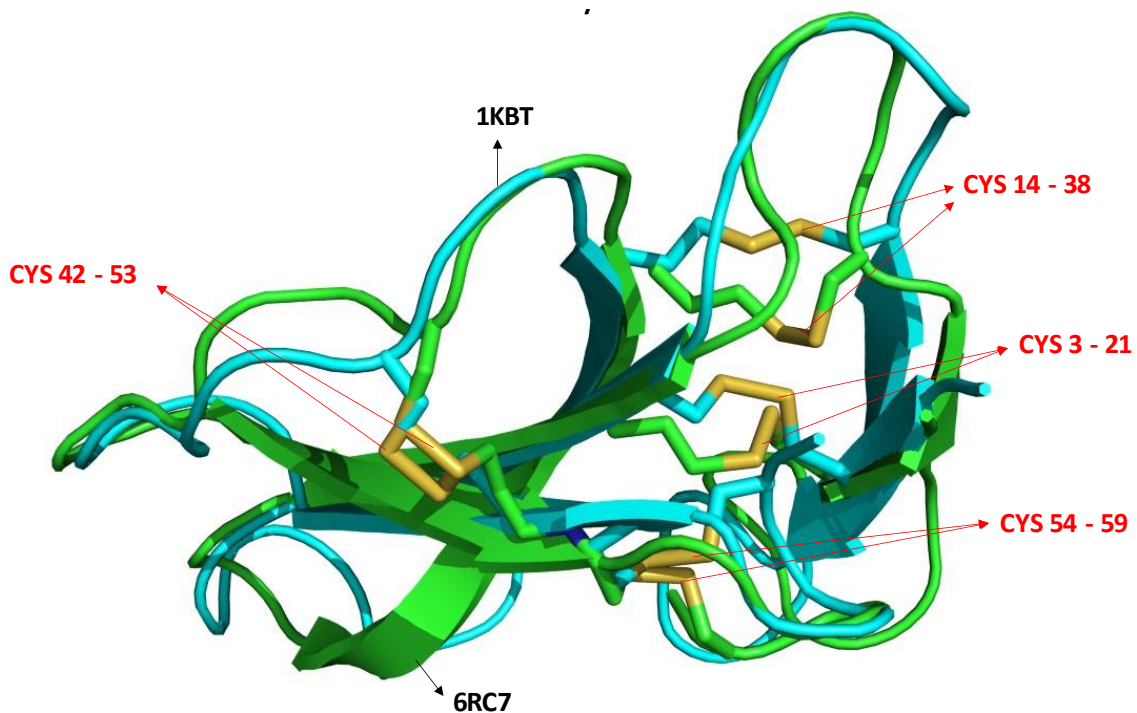
a) Citotoxina 3 – CTX3 (6RC7), b) Citotoxina IV - CTX4 (1KBT), c) Citotoxina 5 - CTX-A4b (1CHV) y d) Citotoxina 2 – CT2 (1FFJ)

La superfamilia 3FP o TFPD engloba a las familias Ly6/uPAR y a las Toxinas de tres dedos (3FTx), estas últimas mencionadas están muy extendidas en las de serpientes venenosas Elapidae. Las 3FTx se caracterizan por su actividad cardiotoxica y citotóxica sobre las membranas de las células animales, al interrumpir las señalizaciones colinérgicas que regulan el sistema nervioso, en particular el parasimpático y el movimiento de las



grasas en la células (**Kessler, Marchot, Silva, & Servent, 2017**). Como ya se mencionó, este motivo estructural debe su nombre a las tres cadenas  $\beta$  que se unen a manera de dedos, por cuatro puentes disulfuro por la interacción entre las cisteínas. Se aprecia en Figura 13 que los cuatro péptidos expuestos mantienen el motivo estructural y por ende las características fisicoquímicas anteriormente señaladas

Los péptidos Citotoxina 3 – CTX3 (6RC7) y Citotoxina IV - CTX4 (1KBT), perteneciente a las cobras *Naja kaouthia* y *Naja atra* de la misma familia *Elapidae*, mantiene una similitud de secuencial 100% y 91.5% respectivamente. La alineación de estos péptidos muestra un RMSD de 0.946 que indica que existe una similitud estructural fácilmente apreciable (Figura 14). Donde incluso los puentes disulfuro coincide en las posiciones Cys (3-21), Cys (14-28), Cys (42-53) y Cys (54-59); por lo que ambos péptidos podrían mantener la misma propiedades anticancerígena. Los estudios realizados por **Dubovski et al. (2003)** manifiestan que los péptidos que en cuya secuencia tengan en la posición 28 el residuo de serina, o el residuo prolina posición 30, cuentan con actividad anticancerígena frente a líneas celulares cancerosas. Sin embargo, el residuo Ser28 muestra ser ligeramente menos efectivo que Pro30, ya que este último mencionado permite que los bucles hidrofóbicos pueden penetrar mucho más en la membrana lipídica. Entre las toxinas recopiladas encontramos varias que cumplen con esta característica y podrían tener una acción farmacológica más intensa, las que corresponden a: Citotoxina 2–CT2 (1FFJ), Cardiotoxina gamma-CRT $\gamma$  (1CXN), Citotoxina 1 – CTXM1 (2CCX), Hemachatoxina de tres dedos-CTXH1 (3VTS), Mu-elapitoxina-Na1a (P0DUK7) y Beta-cardiotoxina CTX27 (3PLC).

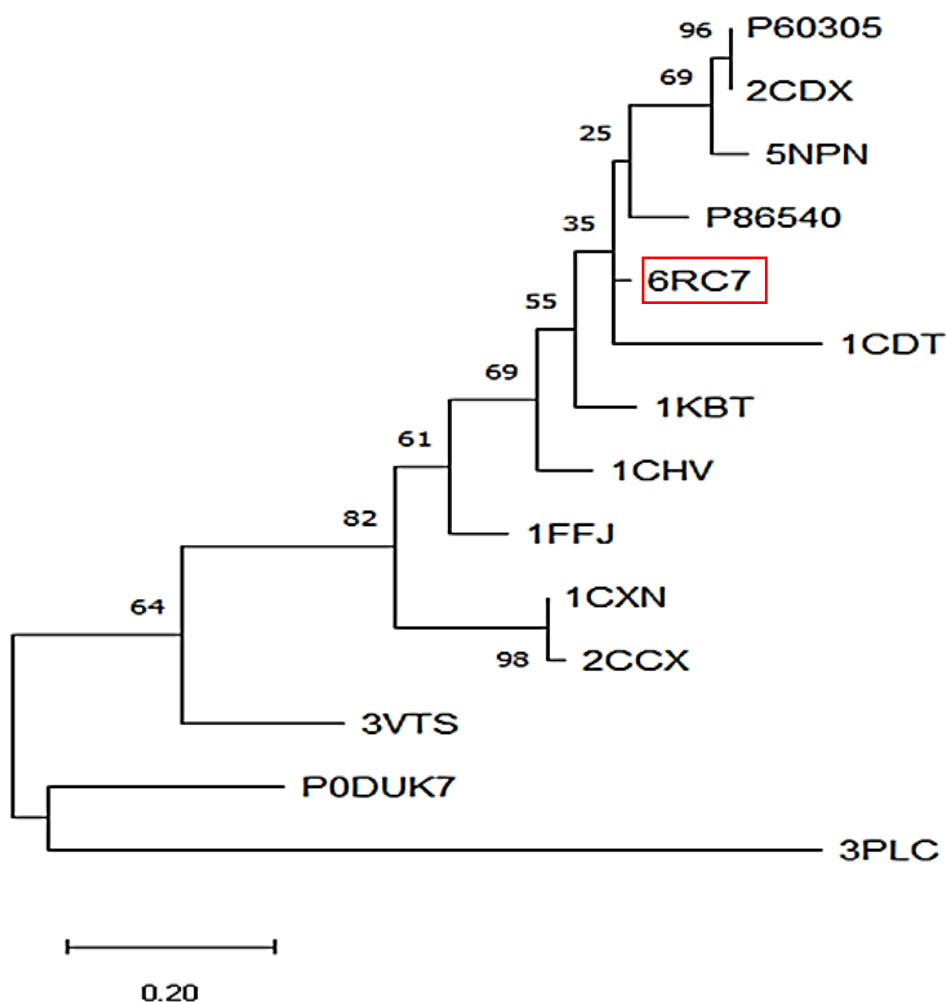


**Figura 14.** Alineación de péptidos antiepilépticos: Citotoxina 3 – CTX3 y Citotoxina IV - CTX4

Alineación por superposición de 6RC7 en “Verde” y 1KBT en “Turquesa” con PYMOL; puentes disulfuro en “amarillo”.

### 3.3.3 Análisis Filogenético

La filogenia determinada por software MEGA X, indica la representación notoria de dos ramales diferenciados. En el primer ramal se observa a las dos Citotoxina 1 - CX1 (P60305) y (2CDX) con la mayor distancia evolutiva del ancestro común. A su vez P60306 y 2CDX aislados de las serpientes *Naja kaouthia* y *Naja atra* respectivamente, comparten una corta distancia evolutiva entre ellos. Como ya se mencionó anteriormente provienen de diferentes especies, pero corresponden al mismo género por lo que se aprecia su estrecha relación en el árbol filogenético.



**Figura 15.** Árbol filogenético del grupo de toxinas anticancerígenas

Árbol filogenético generado de las secuencias de aminoácidos de péptidos Antinociceptivos. por el modelo WAG+G; método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud). Péptido plantilla Citotoxina 3 – CTX3 (6RC7) resaltado en recuadro rojo, a partir del cual se seleccionaron los demás péptidos de secuencia y estructura semejante. Citotoxina 1 - CX1 (P60305). Citotoxina 1 - CX1 (2CDX). Citotoxina 1 – CT1 (5NPN). Citotoxina 8 – CTX8 (P86540). Citotoxina 4 - CTXM3 (1CDT). Citotoxina IV - CTX4 (1KBT). Citotoxina 5 - CTX-A4b (1CHV). Citotoxina 2 – CT2 (1FFJ). Cardiotoxina gamma - CRT $\gamma$  (1CXN). Citotoxina 1 – CTXM1 (2CCX). Three-finger hemachatoxin-CTXH1 (3VTS). Mu-elapitoxin-Na1a (P0DUK7). Beta-cardiotoxina CTX27 (3PLC).

También podemos apreciar que, dentro de la primera rama, el péptido plantilla Citotoxina 3 (6RC7) mantiene una relación cercana con Citotoxina 8 – CTX8 (P86540). El péptido 6RC7 nativo de la cobra *Naja kaouthia* ha mostrado ser una potente citotoxina frente a líneas cancerígenas celulares de pulmón, próstata y mama (Chong, Tan, & Tan, 2020).

Mientras que P86540 tiene una actividad tanto citolítica y hemolítica, sobre las membranas y eritrocitos humanos respectivamente (**Suzuki, Athauda, Suzuki, Matsubara, & Moriyama, 2016**). En general en este primer grupo, se aprecia que todos los péptidos provenientes del género *Naja* conforman un clado bastante arraigado entre sí. Por lo que se podrían realizar ensayos sobre líneas celulares cancerígenas para evaluar el perfil farmacológico anticancerígeno de Citotoxina 8 – CTX8 (P86540), y los demás péptidos miembros del grupo que también muestran actividad citolítica o hemolítica. Solo el péptido Three-finger hemachatoxin-CTXH1 (3VTS) se mantiene más diferenciado del grupo; con la menor distancia evolutiva hacia el nodo central y el mayor valor de RSMD 1.104 (Tabla 5).

Por otro lado, en el segundo clado se encuentra formado únicamente por los dos péptidos, que mantienen la menor homología de secuencia en relación con los demás péptidos del grupo. Sido que les corresponde un 59.7% y 53.8% de homología secuencial para Mu-elapitoxin-Na1a (P0DUK7) y Beta-cardiotoxina CTX27 (3PLC) respectivamente. Además, 3PLC pertenece tanto a un género como especie diferente *Ophiophagus hannah* y se posiciona como el péptido con mayor distancia evolutiva desde el nodo central (Figura 15).

## CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- Con la presente investigación se logró realizar una recopilación de las investigaciones actuales disponibles en las bases de datos sobre las potenciales propiedades benéficas de los venenos animales de diversas especies de arañas y serpientes, la aplicación de herramientas computacionales permitió generar un análisis *in silico* de estas toxinas peptídicas las cuales se clasificaron en tres grupos de acuerdo con sus aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas: antinociceptivas, antiepilépticas y anticancerígenas.
- La clasificación de los péptidos de acuerdo con su potencial aplicación biotecnológica permitió compilar secuencias con una alta homología de secuencia y estructura tridimensional, las cuales mostraron compartir un mecanismo de acción particular para cada grupo, donde los péptidos antinociceptivos y antiepilépticos actúan por inhibición o activación de los canales iónicos del sistema nervioso central, mientras que los péptidos anticancerígenos actúan directamente sobre los receptores de las membranas celulares.
- Se pudo evidenciar la existencia de patrones estructurales altamente conservados en todos los grupos de péptidos. Esto permitió extrapolar las actividades de un péptido sobre los demás. De igual modo a nivel estructural los péptidos antinociceptivos y antiepilépticos, que actúa sobre canales iónicos, mantienen una conformación denominada Inhibidor del nudo de cistina (ICK), mientras que los anticancerígenos mantenían un motivo estructural conocido como Toxinas de tres dedos (3FTx) que facilita la fijación en la membrana.
- Finalmente, se consiguió establecer un análisis filogenético en función de la aplicación biotecnológica de cada grupo de péptidos. Se puede evidenciar que, si

bien los péptidos mantienen homología de secuencia y estructura cuando provienen de organismos pertenecientes a una misma familia de arácnidos o serpientes; sus cualidades divergen de acuerdo con el género o la especie de estas. Es decir que el origen de los péptidos influye directamente sobre la formación de los clados y la distancia evolutiva con el nodo central en los árboles filogenéticos. Sin embargo, existe una relación muy estrecha entre los grupos analizados, por lo que la actividad farmacológica del péptido plantilla podría estar presente en todos los péptidos que conforman cada grupo.

#### **4.2 Recomendaciones**

- Aprovechar las bases de datos con estudios actualizados sobre venenos de otras especies animales para ampliar las potenciales aplicaciones biotecnológicas que se le pueden dar a las toxinas peptídicas.
- Realizar un análisis *in vitro* donde se sintetice artificialmente estos metabolitos para corroborar la información bibliográfica de las propiedades de las toxinas peptídicas de acuerdo con su aplicación biotecnológica, de modo que la actividad pueda ser comprobada para cada péptido.
- Una vez comprobados las cualidades biotecnológicas de los péptidos realizar análisis de estabilidad, especificidad, efectividad, rentabilidad entre otros que permitan patentar nuevos medicamentos seguros para el consumo humano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 5.1 Bibliografía

Instituto Europeo de Bioinformática; EMBL-EBI. (2021). *Protein Data Bank in Europe*.

Obtenido de PDBeFold: <https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>

Airhihenbuwa, C., Tseng, T., Sutton, V., & Price, L. (2021). Global Perspectives on Improving Chronic Disease Prevention and Management in Diverse Settings. *Preventing Chronic Disease, 18*(33), 1-7. Obtenido de <https://doi.org/10.5888/>

Akhondzadeh, S. (2016). The Importance of Clinical Trials in Drug Development. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 8*(4), 151. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5124250/>

Aljamali, El-Taei, & Alasady. (2021). Review on Types of Toxins (Pharmaceutical, Biological, Chemical). *Global Academic Journal of Pharmacy and Drug Research, 3*, 44-53. doi:0.36348/gajpdr.2021.v03i03.002.

Alonso, Curcio, Graupner, Jiménez, & Talavera. (2011). ¿Bivalirudina o Heparina Asociada a Inhibidores de la Glucoproteína IIb/IIIa en el Síndrome Coronario Agudo sin Elevación del ST? *Revista Española de Cardiología Suplementos, 11*(1), 20-26. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(11\)70005-X](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(11)70005-X)

Balseca, E., & Cerda, L. (2021). *Análisis Filogenético de Komagataeibacter xylinus K2G30=UMCC2756 Para la Producción de Biofilms a Partir de Suero Lácteo*. Universidad Técnica de Ambato, Carrera de Ingeniería en Alimentos. Ambato: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/32072>

Belloso, W. H. (2009). Historia de los Antibióticos. *Revista Hospital Italiano, 29*(2), 102-111. Obtenido de

[https://www1.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias\\_attachs/47/documentos/7482\\_102-111-belloso.pdf](https://www1.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf)

Beltrán, J. (2014). Métodos para la Selección de Características y Clasificación de Péptidos. *Centro de Investigación científica y de Educación Superior de Ensenada*, 28-29-30-31.

Buttorff, C., R. T., & Bauman, M. (2017). *Multiple Chronic Conditions in the United States*. Santa Monica, CA: RAND Corporation. Obtenido de [https://www.rand.org/content/dam/rand/pubs/tools/TL200/TL221/RAND\\_TL221.pdf](https://www.rand.org/content/dam/rand/pubs/tools/TL200/TL221/RAND_TL221.pdf)

Buxbaum, J. D., Chernew, M. E., Fendrick, A. M., & Cutler, D. M. (2020). Contributions Of Public Health, Pharmaceuticals, And Other Medical Care To US Life Expectancy Changes, 1990-2015. *Health Affairs*, 39(9), 1546-1556. doi:10.1377/hlthaff.2020.00284

Calvete, Lomonte, Sanz, Pérez, Rodríguez, Gutiérrez, & Pla. (2015). Venómica y Antivenómica: Herramientas Proteómicas para hacer Frente a la Patología Desatendida del Envenenamiento Ofídico. En J. J. Calvete, *Estrategias y Avances en el Estudio de Toxinas de Interés para la Biomedicina* (págs. 79-97). Puebla: CYTED & Universidad Autónoma de Puebla.

Cardoso, F. C., Dekan, Z., Rosengren, K. J., Erickson, A., Vetter, I., Deuis, J. R., . . . Lewis, R. J. (2015). Identification and Characterization of ProTx-III [ -TRTX-Tp1a], a New Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitor from Venom of the Tarantula *Thrixopelm pruriens*. *Molecular Pharmacology*, 88(2), 291–303. doi:10.1124/mol.115.098178

Carillo, Arias, & Sanchez. (2011). Inhibidores Directos de Trombina. *Medicina Interna de México*, 27(1), 38-51. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2011/mim111i.pdf>



- Castellano, M. J., Franquis, R. M., Perozo, A. J., & Sandoval, I. V. (2020). Susceptibilidad a Meticilina y Vancomicina en *Staphylococcus aureus* Aislados de Hemocultivos. *Kasmera*, 48(1). doi:<https://doi.org/10.5281/zenodo.3712378>
- Centro de Regulación Genómica de Barcelona. (2021). *T-COFFEE*. Obtenido de T-COFFEE: <http://tcoffee.crg.cat/>
- Chen, J.-Q., Zhang, Y.-Q., Dai, J., Luo, Z.-M., & Liang, S.-P. (2005). Antinociceptive Effects of Intrathecally Administered Huwentoxin-I, a selective N-type Calcium Channel Blocker, in the Formalin Test in Conscious Rats. *Toxicon*, 45(1), 15-20. doi:10.1016/j.toxicon.2004.08.018
- Chen, Xu, Zhang, & Wang. (2018). Animal Protein Toxins: Origins and Therapeutic Applications. *Biophys Rep*, 4(5), 233-242. doi:10.1007/s41048-018-0067-x
- Chien, K., Chiang, C., Hseu, Y., Vyas, A., Rule, G., & Wu, W. (1994). Two Distinct Types of Cardiotoxin as Revealed by the Structure and Activity Relationship of Their Interaction with Zwitterionic Phospholipid Dispersions. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20), 14473-14483. Obtenido de [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)36647-4/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)36647-4/pdf)
- Chong, H. P., Tan, K. Y., & Tan, C. (2020). Cytotoxicity of Snake Venoms and Cytotoxins From Two Southeast Asian Cobras (*Naja sumatrana*, *Naja kaouthia*): Exploration of Anticancer Potential, Selectivity, and Cell Death Mechanism. *Front Mol Biosci*. doi:10.3389/fmolb.2020.583587
- Chow, C. Y., Chin, Y. K., Ma, L., Undheim, E. A., Herzig, V., & King, G. F. (2020). A Selective NaV1.1 Activator With Potential for Treatment of Dravet Syndrome Epilepsy. *Biochemical Pharmacology*, 113991. doi:10.1016/j.bcp.2020.113991, 113991, *Biochemical Pharmacology*. doi:10.1016/j.bcp.2020.113991
- Consorcio UniProt. (2002). *UniProt*. Obtenido de UniProt: <https://www.uniprot.org/>

- Cormier, Z. (7 de Mayo de 2020). *The Latest Technology Allows us to Look for Potential Medicines in the Natural World Without Collecting or Harming a Single Animal – all you Need is Their DNA*. Obtenido de Future: <https://www.bbc.com/future/article/20200507-medicines-and-drugs-from-animals-venom>
- Correnti, C. E., Gewe, M. M., Mehlin, C., Bandaranayake, A. D., Johnsen, W. A., Rupert, P. B., . . . Strong . . . Strong, R. K. (2018). Screening, Large-scale Production and Structure-based Classification of Cystine-dense Peptides. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(3), 270-278. doi:10.1038/s41594-018-0033-9
- Dabrowski-Tumanski, P., Rubach, P., Goundaroulis, D., Dorier, J., Sułkowski, P., Millett, K. C., . . . Sulkowska, J. I. (2018). KnotProt 2.0: a Database of Proteins with Knots and Other Entangled Structures. *Nucleic Acids Research*, 1-9. doi:10.1093/nar/gky1140
- Das, S., Dawson, N. L., & Orengo, C. A. (2015). Diversity in Protein Domain Superfamilies. *Current Opinion In Genetics & Development*, 35, 40-49. doi:10.1016/j.gde.2015.09.005.
- Dawn, Chin, Tok, Chai, Armugam, Jeyaseelan, K., & Jeyaseelan, D. (2009). Poisons, Venoms and Toxins. En H. Majewski, *Pharmacology* (págs. 262-269). Singapor: UNESCO-EOLSS. Obtenido de <http://www.eolss.net/sample-chapters/c03/e6-81-13.pdf>
- Dubinnyi, M., & Dubovskii, P. (2021). The Omega-loop of Cobra Cytotoxins Tolerates Multiple Amino Acid Substitution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1-6. doi:10.1016/j.bbrc.2021.04.069
- Duboskii, P. V., Lesovoy, D. M., Dubinnyi, M. A., Konshina, A. G., Utkin, Y. N., Efremov, R. G., & Arseniev, A. S. (2005). Interaction of Three-finger Toxins with

- Phospholipid Membranes: Comparison of S- and P-type Cytotoxins. *Biochemical Journal*, 387(3), 807-815. doi:10.1042/BJ20041814
- Dubovskii, P. V., Dubinnyi, M. A., Konshina, A. G., Kazakova, E. D., Sorokoumova, G. M., Ilyasova, T. M., . . . Efremov, R. G. (2017). Structural and Dynamic “Portraits” of Recombinant and Native Cytotoxin I from *Naja oxiana*: How Close Are They? *Biochemistry*, 56(34), 4468-4477. doi:10.1021/acs.biochem.7b00453
- Escoubas, P., Sollod, B., & King, G. F. (2006). Venom landscapes: Mining the Complexity of Spider Venoms Via a Combined cDNA and Mass Spectrometric Approach. *Toxicon*, 47(6), 650-663. doi:10.1016/j.toxicon.2006.01.018
- Espín, D., & García, M. (2021). *Cribado Virtual de Inhibidores de la Enzima ARN Polimerasa ARN-dependiente (RdRp) del Virus SARS-CoV-2, Empleando Librerías de Compuestos y Homología Estructural con ARN Polimerasas Virales*. Universidad Técnica de Ambato, Carrera de Ingeniería Bioquímica. Ambato: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/32086>
- Fernández, M. (2007). Demarcación Intraoperatoria entre Cáncer y Tejido Sano Mediante Clorotoxina: Cy5.5. *Revista chilena de cirugía*, 59(6), 475-476. doi:10.4067/S0718-40262007000600018
- Ferrat, G., Bosmans, F., Tytgat, J., Pimentel, C., & Chagot, T. (2005). *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1-3.
- Ferrat, G., Bosmans, F., Tytgat, J., Pimentel, C., Chagot, B., Gilles, N., . . . Corzo, G. (2005). Solution Structure of Two Insect-Specific spider Toxins and their Pharmacological Interaction with the Insect Voltage-gated Na<sup>+</sup> Channel. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 59(2), 368-379. doi:10.1002/prot.20424

Fidelis, A., Sunday, K., & Ugbong, E. (2021). Animal venoms. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 14, 47-54. Obtenido de 10.30574/gscbps.2021.14.1.0371.

Fidelis, A., Sunday, K., & Ugbong, E. (2021). Animal venoms. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 47-54. Obtenido de 10.30574/gscbps.2021.14.1.0371

Figueiredo, Taken, Correa, Lopes, Cerni, & Gobbi, P. A. (2020). From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11. doi:10.3389/fphar.2020.01132

Food and Drug Administration. (20 de Noviembre de 2001). *Angiomax (Bivalirudin) Injection*. Obtenido de Drug Approval Package: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2000/20873\\_Angiomax.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2012%2F15%2F2000](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/20873_Angiomax.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2012%2F15%2F2000)

Food and Drug Administration. (15 de Noviembre de 2004). *Iprivask (Desirudin) Injection*. Obtenido de Drug Approval Package: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2003/21-271\\_Iprivask.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%204%2F04%2F2003](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-271_Iprivask.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%204%2F04%2F2003)

Food and Drug Administration. (28 de Abril de 2005). *Byetta (Exenatide) Injection*. Obtenido de Drug Approval Package: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2005/021773\\_byettatoc.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%204%2F28%2F2005](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/021773_byettatoc.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%204%2F28%2F2005)

Food and Drug Administration. (17 de Mayo de 2005). *Integrilin (Eptifibatide) Injection*. Obtenido de Drug Approval Package: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/98/20718\\_Integrilin.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%205%2F18%2F1998](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20718_Integrilin.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%205%2F18%2F1998)

Food and Drug Administration. (22 de Abril de 2005). *Prialt (Ziconotide Intrathecal Infusion)*. Obtenido de Drug Approval Package: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/21-060\\_Prialt.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2012%2F28%2F2004](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-060_Prialt.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2012%2F28%2F2004)

Food and Drug Administration. (22 de Abril de 2005). *Vasotec (Enalapril Maleate) Tablets*. Obtenido de Drug Approval Package: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/pre96/018998\\_Vasotec.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2012%2F24%2F1985](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/pre96/018998_Vasotec.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2012%2F24%2F1985)

Food and Drug Administration. (27 de 7 de 2016). *Adlyxin (lixisenatide) Injection*. Obtenido de Drug Approvals and Databases: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2016/208471Orig1s000TOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/208471Orig1s000TOC.cfm)

Food and Drug Administration. (2018). *Highlights of prescribing information*. Ohio: U.S. Food and Drug Administration. Obtenido de [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/022200s026lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/022200s026lbl.pdf)

Food and Drug Administration. (11 de Mayo de 2022). *FDA*. Obtenido de ¿Está realmente “Aprobado por la FDA”? <https://www.fda.gov/consumers/articulos-para-el-consumidor-en-espanol/esta-realmente-aprobado-por-la-fda>

Food and Drug Administration. (2 de Julio de 2001). *Aggrastat (Tirofiban Hydrochloride) Injection*. Obtenido de Drug Approval Package: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/20912S001\\_Aggrastat.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2007%2F9%2F1999](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/20912S001_Aggrastat.cfm#:~:text=Approval%20Date%3A%2007%2F9%2F1999)

Food And Drug Organization. (3 de Agosto de 2022). *Captropil*. Obtenido de Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=018343>

- Garcias, L., & Velasco, B. (30 de Julio de 2020). *Producción de Antivenenos*. Obtenido de Ciencia UNAM: <https://ciencia.unam.mx/contenido/infografia/117/infografia-produccion-de-antivenenos#:~:text=%E2%80%9CPara%20producirlos%20se%20toma%20el,%2C%20como%20escorpiones%20y%20ara%C3%B1as.%E2%80%9D>
- Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—new Insights After More than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849. doi:10.3201/eid2305.161556
- Gilquin, B., Roumestand, C., Zinn-Justin, S., Ménez, A., & Toma, F. (1993). Refined Three-dimensional Solution Structure of a Snake Cardiotoxin: Analysis of the Side-chain Organization Suggests the Existence of a Possible Phospholipid Binding Site. *Biopolymers*, 33(11), 1659-1675. doi:10.1002/bip.360331104
- Girish, V. M., Kumar, S., Joseph, L., Jobichen, C., Kini, R. M., & Sivaraman, J. (2012). Identification and Structural Characterization of a New Three-Finger Toxin Hemachatoxin from Hemachatus haemachatus Venom. *PLoS ONE*, 7(10). doi:10.1371/journal.pone.0048112
- Gonçalves, T. C., Benoit, E., Kurz, M., Lucarain, L., F. S., Combemale, S., . . . Partiseti, M. (2019). From Identification to Functional Characterization of Cyriotoxin-1a, an Antinociceptive Toxin from Cyriopagopus schioedtei Spider. *British Journal of Pharmacology*, 1298-1314. doi:10.1111/bph.14628
- Gonçalves, T., Benoit, E., & Kurz, M. (2018). From Identification to Functional Characterization of Cyriotoxin-1a, an Antinociceptive Toxin from the Spider Cyriopagopus schioedtei. *British Pharmacological Society*, 2-3.
- Gopalkrishnakone, & Chou. (1996). *Snakes of Medical Importance (Asia-Pacific Region)*. National University of Singapore.

- Herzig, V., Cristofori, B., Israel, M. R., Nixon, S. A., Vetter, I., & King, G. F. (2020). Animal toxins—Nature’s Evolutionary-refined Toolkit for Basic Research and Drug Discovery. *Biochemical pharmacology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114096>
- Horna, G., Molero, M. L., Benites, L., Roman, S., Carbajal, L., Mercado, E., . . . Ochoa, T. (2016). Oxacillin Disk Diffusion Testing for the Prediction of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 40, 57-63. Obtenido de <https://www.scielosp.org/article/rpsp/2016.v40n1/57-63/en/>
- Hu, Z., Zhou, X., Chen, J., Tang, C., Xiao, Z., Ying, D., . . . Liang, S. (2014). The Venom of the Spider *Selenocosmia jiafu* Contains Various Neurotoxins Acting on Voltage-gated Ion Channels in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Toxins (Basel)*, 6(3), 988-1001. doi:10.3390/toxins6030988
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2020). *Registro estadístico de defunciones generales de 2020*. Quito: Republica del Ecuador. Obtenido de [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion\\_y\\_Demografia/Defunciones\\_Generales\\_2020/2021-06-10\\_Principales\\_resultados\\_EDG\\_2020\\_final.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Defunciones_Generales_2020/2021-06-10_Principales_resultados_EDG_2020_final.pdf)
- Jahnke, W., Mierke, D. F., Béress, L., & Kessler, H. (1994). Structure of Cobra Cardiotoxin CTXI as Derived from Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Distance Geometry Calculations. *Journal of Molecular Biology*, 240(5), 445–458. doi:10.1006/jmbi.1994.1460
- Jaramillo, K., & García, M. (2021). *Identificación y Modelamiento de Mutaciones que Otorgan Resistencia a Inhibidores de la Enzima ARN Polimerasa ARN Dependiente del Virus SARS-CoV-2*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de

Ingeniería                      Bioquímica.                      Obtenido                      de  
<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/32106>

- Jayaraman, G., Kumar, T. K., Tsai, C.-C., Srisailam, S., Yu, C. C.-H., & Ho, C.-L. (2000). Elucidation of the Solution Structure of Cardiotoxin Analogue V from the Taiwan cobra (*Naja naja atra*)-Identification of Structural Features Important for the Lethal Action of Snake Venom Cardiotoxin. *Protein Science*, 9(4), 637-646. Obtenido de 10.1110/ps.9.4.637
- Kaas, Q., & Craik, D. (2015). Bioinformatics-Aided Venomics. *Toxins (Basel)*, 7(6), 2159-2187. doi:10.3390/toxins7062159
- Kaplan, W., Wirtz, V., Mantel, A., Stolk, P., Duthey, B., & Laing, R. (2013). *Priority Medicines for Europe and the World 2013 Update*. Ginebra: World Health Organisation. Obtenido de [https://www.who.int/medicines/areas/priority\\_medicines/MasterDocJune28\\_FIN\\_AL\\_Web.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/MasterDocJune28_FIN_AL_Web.pdf?ua=1)
- Karalloedde, L. (1995). Animal toxins. *British Journal of Anaesthesia*, 74, 319-327.
- Kessler, P., Marchot, P., Silva, M., & Servent, D. (2017). The Three-finger Toxin Fold: A Multifunctional Structural Scaffold Able to Modulate Cholinergic Functions. *Journal of Neurochemistry*, 142, 7–18. doi:10.1111/jnc.13975
- Kini, R. M., & Doley, R. (2010). Structure, Function and Evolution of Three-finger Toxins: Mini Proteins with Multiple Targets. *Toxicon*, 56(6), 855–867. doi:10.1016/j.toxicon.2010.07.010
- Kintzing, J. R., & Cochran, J. R. (2016). Engineered Knottin Peptides as Diagnostics, Therapeutics, and Drug Delivery Vehicles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, 143–150. doi:10.1016/j.cbpa.2016.08.022



- Klint, J. K., Chin, Y. K., & Mobli, M. (2015). Rational Engineering Defines a Molecular Switch That Is Essential for Activity of Spider-Venom Peptides against the Analgesics Target NaV1.7. *Molecular Pharmacology*, 88(6), 1002–1010. doi:10.1124/mol.115.100784
- Klint, J. K., Smith, J. J., Vetter, I., Rupasinghe, D. B., Er, S. Y., Senff, S., . . . King, G. F. (2015). Seven Novel Modulators of the Analgesic Target NaV1.7 Uncovered Using a High-throughput Venom-based Discovery Approach. *British Journal of Pharmacology*, 172(10), 2445–2458. doi:10.1111/bph.13081
- Kneller, R. (2010). The Importance of New Companies for Drug Discovery: Origins of a Decade of New Drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(10), 867-882. doi:10.1038/nrd3251
- Köhling, R., & Wolfart, J. (2016). Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspective Med.* 2016 May 2;6(5):a022871. doi: 10.1101/cshperspect.a022871. PMID: 27141079; PMCID: PMC4852798., 6(5). doi:10.1101/cshperspect.a022871
- Kullmann, Groat, C. d., & Artim. (2009). Bungarotoxins. En Jankovic, Albanese, Atassi, Dolly, Hallett, & Mayer, *Botulinum Toxin* (págs. 425-445). W.B. Saunders. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4928-9.00035-4>.
- Laura Tintaya, L., & Gémez, B. (2018). *Evaluación de la Interacción que gobierna el Acoplamiento de Profilinas de Origen Humano con Receptores de Filamentos de Actina Humana y su Energética, Mediante Acoplamiento Molecular*. Universidad Católica de Santa María , Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica. Arequipa: Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/198132178.pdf>

- Lee, C. W., Kim, S., Roh, S. H., Endoh, H., Kodera, Y., Maeda, T., . . . Kim, J. I. (2004). Solution Structure and Functional Characterization of SGTx1, a Modifier of Kv2.1 Channel Gating. *Biochemistry*, *43*(4), 890-897. doi:10.1021/bi0353373
- Lee, S.-C., Lin, C.-C., Wang, C.-H., Wu, P.-L., Huang, H.-W., Chang, C.-I., & Wu, W. (2014). Endocytotic Routes of Cobra Cardiotoxins Depend on Spatial Distribution of Positively Charged and Hydrophobic Domains to Target Distinct Types of Sulfated Glycoconjugates on Cell Surface. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(29), 20170-20181. doi:10.1074/jbc.M114.557157
- Li, D., Xiao, Y., Hu, W., Xie, J., Bosmans, F., Tytgat, J., & Liang, S. (2003). Function and Solution Structure of Hainantoxin-I, a Novel Insect Sodium Channel Inhibitor from the Chinese Bird Spider *Selenocosmia hainana*. *FEBS Letters*(555), 616–622. doi:10.1016/s0014-5793(03)01303-6
- Liu, Z., Cai, T., Zhu, Q., Deng, M., Li, J., Zhou, X., . . . Liang, S. (2013). Structure and Function of Hainantoxin-III, a Selective Antagonist of Neuronal Tetrodotoxin-sensitive Voltage-gated Sodium Channels Isolated from the Chinese Bird Spider *Ornithoctonus hainana*. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(28), 20392–20403. doi:10.1074/jbc.M112.426627
- Liu, Z., Dai, J., Chen, Z., Hu, W., Xiao, Y., & Liang, S. (2003). Isolation and Characterization of Hainantoxin-IV, a Novel Antagonist of Tetrodotoxin-sensitive Sodium Channels from the Chinese Bird Spider *Selenocosmia hainana*. *Cellular and Molecular Life Science*, *60*(5), 972-978. doi:10.1007/s00018-003-2354-x
- Lowy, F. (2003). Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, *111*(9), 1265-1273. doi:10.1172/JCI18535
- Lu, R., Hwang, Y., Liu, I., Lee, C., Tsai, H., Li, H., & Wu, H. (2020). Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases. *Journal of Biomedical Science*, *27*(1). doi:https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z

- Lü, S., Liang, S., & Gu, X. (1999). Three-Dimensional Structure of Selenocosmia huwena Lectin-I (SHL-I) from the Venom of the Spider Selenocosmia huwena by 2D-NMR. *Journal of Protein Chemistry*, 18(5), 609–617. doi:10.1023/a:1020663619657
- Madsbad, S. (2015). Revisión de las Comparaciones Directas de los Agonistas del Receptor del Péptido 1 Similar al Glucagón. *Diabetes, Obesidad y Metabolismo*, 18(4), 317-332. doi:<https://doi.org/10.1111/dom.12596>
- Marte, F., Sankar, P., & Cassagnol, M. (21 de Enero de 2022). *Captopril*. Obtenido de National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535386/>
- Mclane, Dunn, Manfredi, Conti-Tronconi, & Raftery. (1996). The Nicotinic Acetylcholine Receptor as a Model for a Superfamily of Ligand-Gated Ion Channel Proteins. *Protein Engineering and Design*, 289-352. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-012159640-8/50011-5>.
- Mebs, D. (1969). Preliminary Studies on Small Molecular Toxic Components of Elapid Venoms. *Toxicon*, 6(4), 247-250. Obtenido de 10.1016/0041-0101(69)90092-0
- MEGA. (2021). *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Obtenido de MEGA: <https://www.megasoftware.net/>
- Meir, A., Cherki, R., Kolb, E., Lagunt, Y., & Bajayo, N. (2011). *Jerusalem Patente n° WO 2011/033358 A2*. Obtenido de <https://patentimages.storage.googleapis.com/0a/8a/65/168f85343bbbe1/WO2011033358A2.pdf>
- Minassian, N. A., Gibbs, A., Shih, A. Y., Liu, Y., Neff, R. A., Sutton, S. W., . . . Wickenden, A. D. (2013). Analysis of the Structural and Molecular Basis of Voltage-sensitive Sodium Channel Inhibition by the Spider Toxin Huwentoxin-IV ( $\mu$ -TRTX-Hh2a). *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22707–22720. doi:10.1074/jbc.m113.461392

- Museo de Historia Natural de Berna. (25 de Noviembre de 2022). *Catálogo mundial de arañas*. Obtenido de "Detalles taxonómicos Omothymus schioedtei Thorell, 1891: <https://wsc.nmbe.ch/species/37369>
- National Science Foundation; US Department of Energy; National Institutes of Health . (27 de 10 de 2021). *RCSB PDB*. Obtenido de RCSB Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org/>
- Natural History Museum Bern. (2015). *Gen. Cyriopagopus Simon, 1887*. Obtenido de Familia: Theraphosidae Thorell,1869: <https://wsc.nmbe.ch/genus/3347>
- Natural History Museum Bern. (15 de 06 de 2022). *World Spider Catalog*. Obtenido de Taxon details Cyriopagopus schmidti von Wirth, 1991: <https://wsc.nmbe.ch/species/37475>
- Nelsen, Nisani, Cooper, Fox, Gren, Corbit, & Hayes. (2013). Poisons, toxungens, and Venoms: Redefining and Classifying Toxic Biological Secretions and the Organisms that Employ them. *Biological reviews oF the Cambridge Philosophical Society*, 89(2), 450-465. doi:10.1111/brv.12062
- Nguyen, T. T., Folch, B., Létourneau, M., Truong, N. H., Doucet, N., Fournier, A., & Chatenet, D. (2014). Design of a Truncated Cardiotoxin-I Analogue with Potent Insulinotropic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(6), 2623–2633. doi:10.1021/jm401904q
- Nicolas, Zoukimian, Bosmans, Montnach, Diochot, Cuypers, . . . De Waard, M. (2019). Chemical Synthesis, Proper Folding, Nav Channel Selectivity Profile and Analgesic Properties of the Spider Peptide Phlotoxin 1. *Toxins*, 11(6). doi:10.3390/toxins11060367
- O’Connel, J. F., Bougis, P. E., & Wuthrich, K. (1993). Determination of the Nuclear-Magnetic-Resonance Solution Structure of Cardiotoxin CTX IIb from Naja

mossambica Mossambica. *European Journal of Biochemistry*, 213(3), 891–900.  
doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17833.x

Ortiz, N. R., & Ibáñez. (2011). Propiedades de los Diferentes Inhibidores de la Glucoproteína IIb/IIIa. *Revista Española de Cardiología*, 11, 3-7.  
doi:84.1416/j.cardio.2011.11.001

Ozkan, Adiguzel, Ates, Bozyigit, & Filazi. (2006). Optimization of Antiscorpion Venom Production. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 12(3), 390-399. Obtenido de <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/b7PgDRLfNg6xZtKHRKQk9fH/?lang=en&format=pdf>

Pennington, M. W., Czerwinski, A., & Norton, R. S. (2018). Peptide Therapeutics from Venom: Current Status and Potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(10), 2738-2758. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>

Pérez, B., Guirola, F., Fleites, M., & al., e. (2014). Origen e historia de la Toxicología. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 43(4), 499-514.

Ramos, M., & García, M. (2021). *Cribado Virtual de Inhibidores de la Enzima Mpro del Virus SARS-CoV-2 Empleando Librerías de Compuestos y Homología Estructural con Proteasas de Virus Patógenos de Animales*. Universidad Técnica de Ambato, Carrera de Ingeniería Bioquímica. Ambato: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/32116>

Reid. (1997). From Kinetics to Dynamics: are There Differences Between ACE Inhibitors? *European Heart Journal*, 18, 14-18. Obtenido de [https://watermark.silverchair.com/18-suppl\\_E-14.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485y sgAAAucwggLjBgkqhkiG9w0BBwagggLUMIIC0AIBADCCAskGCSqGSIB3D](https://watermark.silverchair.com/18-suppl_E-14.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485y sgAAAucwggLjBgkqhkiG9w0BBwagggLUMIIC0AIBADCCAskGCSqGSIB3D)

QEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMf-DSex6lqXz-  
aMbwAgEQgIICmhp7lynq7Dvk1XRC4wJGaXRIOZfJsyTqTSLEcani7

- Richards, K. L., Milligan, C. J., Richardson, R. J., Jancovski, N., Grunnet, M., Jacobson, L. H., . . . Petrou, S. (2018). Selective NaV1.1 Activation Rescues Dravet Syndrome Mice from Seizures and Premature Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201804764. Obtenido de 10.1073/pnas.1804764115
- Richards, K., & Milligan, K. (2018). Selective NaV1.1 Activation Rescues Dravet Syndrome Mice from Seizures and Premature Death. *University of Chicago*, 1-7.
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324. doi:10.1093/nar/gku316, 42(W1), W320–W324. doi:10.1093/nar/gku316
- Rodriguez, A., Villarreal, E., & Corzo, G. (2019). Venenos Animales, Fuente para el Desarrollo de Agentes Terapéuticos. *Inventio*, 15, 43-52. Obtenido de 10.30973/inventio/2019.15.36/6.
- Roldán, E. (2016). *Introducción a la toxicología*. Zaragoza: UNAM. Obtenido de <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Toxico-ago18.pdf>
- Roy, A., Sun, Q., Alex, C., Rajagopalan, N., Jobichen, C., Sivaraman, J., & Kini, R. M. (2019). Identification of a  $\alpha$ -helical Molten Globule Intermediate and Structural Characterization of  $\beta$ -cardiotoxin, an all  $\beta$ -sheet Protein Isolated from the Venom of Ophiophagus Hannah (king cobra). *Protein Science*. doi:10.1002/pro.3605
- Rupasinghe, D. B. (2020). Mutational Analysis of ProTx-I and the Novel Venom Peptide Pe1b Provide Insight into Residues Responsible for Selective Inhibition of the Analgesic Drug Target NaV1.7. *Biochemical Pharmacology*. doi:10.1016/j.bcp.2020.114080

- Sánchez, A., & García, M. (2021). *Cribado Virtual de Inhibidores de la Enzima Mpro del Virus SARS-CoV-2 Empleando Librerías de Compuestos y Homología Estructural con Proteasas de Virus Patógenos Humanos*. Universidad Técnica de Ambato, Carrera de Ingeniería Bioquímica. Ambato: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/32126>
- Siemens, J., Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E. A., Basbaum, A. I., . . . Julius, D. (2006). Spider Toxins Activate the Capsaicin Receptor to Produce Inflammatory Pain. *Nature*, *444*(7116), 208–212. doi:10.1038/nature05285
- Smith, J., Herzig, V., Ikonopoulou, M., Dziemborowicz, S., Bosmans, F., Nicholson, G., & King, G. (2017). Insect-Active Toxins with Promiscuous Pharmacology from the African Theraphosid Spider *Monocentropus balfouri*. *Toxins*, *9*(5). doi:10.3390/toxins9050155
- SpidCat. (05 de 06 de 2008). *Thrixopelma pruriens Schmidt, 1998*. Obtenido de Catalogue of Life: 2010 Annyal Checklist: <https://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/details/species/id/5589611/source/tree>
- Stern, D. L. (2013). The Genetic Causes of Convergent Evolution. *Nature Reviews Genetics*, *14*, 751–764. doi:10.1038/nrg3483
- Susuki, M., Athauda, S., & Moriyama, A. (2015). Comparison of the Primary Structures, Cytotoxicities, and Affinities to Phospholipids of Five Kinds of Cytotoxins from the Venom of Indian Cobra, *Naja naja*. *ELSEVIER*, 1-3.
- Suzuki, M., Athauda, S. B., Suzuki, Y., Matsubara, K., & Moriyama, A. (2016). Comparison of the Primary Structures, Cytotoxicities, and Affinities to Phospholipids of Five Kinds of Cytotoxins from the Venom of Indian Cobra, *Naja naja*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *179*, 158-164. doi:10.1016/j.cbpc.2015.09.015

- Swartz, K. J., & MacKinnon, R. (1995). An Inhibitor of the Kv2.1 Potassium Channel Isolated from the Venom of a Chilean Tarantula. *Neuron*, *15*(4), 941–949. doi:10.1016/0896-6273(95)90184-1
- Swiss Institute of Bioinformatics. (2021). *ExPASy*. Obtenido de BoxShade: [https://embnet.vital-it.ch/software/BOX\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html)
- Takahashi, H., Kim, J. I., Min, H. J., Sato, K., Swartz, K. J., & Shimada, I. (2000). Solution Structure of Hanatoxin1, a Gating Modifier of Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels: Common Surface Features of Gating Modifier Toxins. *Journal of Molecular Biology*, *297*(3), 771-780. doi:10.1006/jmbi.2000.3609
- Tang, C., Zhou, X., Huang, Y., Zhang, Y., Hu, Z., W. M., . . . Liang, S. (2014). The tarantula Toxin Jingzhaotoxin-XI ( $\kappa$ -theraphotoxin-Cj1a) Regulates the Activation and Inactivation of the Voltage-gated Sodium Channel Nav1.5. *Toxicon*, *92*, 6–13. doi:10.1016/j.toxicon.2014.09.002
- Theakston, D., & Smith, D. (1997). Antivenoms. *BioDrugs*, 366-375. doi:1173-8804/97/0005-0366/\$05.00/0
- Trevelyan, O. (12 de Abril de 2021). *The Importance of Discovering New Drugs*. Obtenido de AZO LIFE SCIENCES: <https://www.azolifesciences.com/article/The-Importance-of-Discovering-New-Drugs.aspx>
- Tun, P., & Cho, K. A. (1968). Amount of Venom Injected by Russell's Viper (*Vipera russelli*). *Toxicon*, 730-733. doi:10.1016/0041-0101(86)90037-1
- Uccellatore, Genovese, Dicembrini, Mannucci, & Ceriello. (2015). Comparison Review of Short-Acting and Long-Acting Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists. *Diabetes Ther*, *6*, 239-256. doi:<https://doi.org/10.1007/s13300-015-0127-x>



- United Nations. (2019). *World Population Prospects 2019, Volume I: Comprehensive Tables (ST/ESA/SER.A/426)*. New York: Department of Economic and Social Affairs. Obtenido de [https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf)
- United Nations. (2019). *World Population Prospects 2019, Volume II: Demographic Profiles (ST/ESA/SER.A/427)*. New York: Department of Economic and Social Affairs. Obtenido de [https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Volume-II-Demographic-Profiles.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Volume-II-Demographic-Profiles.pdf)
- United Nations. (2019). *World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423)*. New York: Department of Economic and Social Affairs. Obtenido de [https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf)
- Utkin, Y. N. (2015). Animal Venom Studies: Current Benefits and Future Developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28-33. Obtenido de [10.4331/wjbc.v6.i2.28](https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28)
- Veisheh, Gabikian, Bahrami, Veisheh, Zhang, Hackman, . . . Olson. (2007). Tumor Paint: A Chlorotoxin: Cy5.5 Bioconjugate for Intraoperative Visualization of Cancer Foci. *Cancer Research*, 68(8), 6882–6888. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3948
- Vera, Blu, & Torres. (2005). Sanguijuelas, Parásitos Presentes Ayer y Hoy. *Revista Chilena de Infectología*, 22(1), 32-37. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v22n1/art04.pdf>
- Verdes, A., Anand, P., Gorson, J., Jannetti, S., Kelly, P., Leffler, A., . . . Holford, M. (2016). From Mollusks to Medicine: A Venomics Approach for the Discovery and Characterization of Therapeutics from Terebridae Peptide Toxins. *Toxins*, 8(4), 117. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins8040117>

- Vetter, I., Deuis, J., Mueller, A., & Israel, M. (2017). NaV 1.7 as a Pain Target - from Gen to Pharmacology. *Pharmacologic and therapeutics*, 73 - 100.
- Vivek, Achyuthan, & Kartik. (2018). *Animal Venoms: Origins, Diversity and Evolution*. Chichester: Jhon Wiley & Sons. doi:10.1002/9780470015902.a0000939.pub2
- Vizueta, C., & García, M. (2021). *Identificación y Modelamiento de Mutaciones que Otorgan Resistencia a Inhibidores de la Enzima Proteasa Mpro del Virus SARS-CoV2*. Universidad Técnica de Ambato, Carrera de Ingeniería Bioquímica. Ambato: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/32129>
- Wilson, D., & Dally, N. (2018). Venomics: A Mini-Review. *High-throughput*, 7(3), 19. doi:10.3390/ht7030019
- World Health Organization. (2017). *Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, Annex 5, TRS No 1004*. -: World Health Organization CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Obtenido de [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/document-migration/antivenomglrevwho\\_trs\\_1004\\_web\\_annex\\_5.pdf?sfvrsn=ef4b2aa5\\_3&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/document-migration/antivenomglrevwho_trs_1004_web_annex_5.pdf?sfvrsn=ef4b2aa5_3&download=true)
- World Health Organization. (2021). *Global expenditure on health: Public spending on the rise? Health Systems Governance and Financing UHL*. Ginebra: World Health Organization. Obtenido de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240041219>
- World Health Organization. (17 de Mayo de 2021). *Snakebite envenoming*. Obtenido de World Health Organization: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/snakebite-envenoming>

- World Health Organization. (2021). *World health statistics 2021: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. Geneva: World Health Organization. Obtenido de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/342703/9789240027053-eng.pdf>
- X, Z., P, L., B, C., J, H., R, L., J, L., & M., R. (2018). Selective Closed-State Nav1.7 Blocker JZTX-34 Exhibits Analgesic Effects against Pain. *Toxins.*, 10(2). doi:10.3390/toxins10020064
- Xu, C., Zhang, Y., Gozal, D., & P., C. (2021). Channelopathy of Dravet Syndrome and Potential Neuroprotective Effects of Cannabidiol. *J Cent Nerv Syst Dis*. doi:10.1177/11795735211048045
- Yeaman, M., & Yount, N. (2004). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacologic review*, 10-11.
- Zhang, F., Zhang, C., Xu, X., Zhang, Y., Gong, X., Yang, Z., . . . Liu, Z. (2019). Naja atra Venom Peptide Reduces Pain by Selectively Blocking the Voltage-gated Sodium Channel Nav1.8. *Journal of Biological Chemistry*. doi:downloaded on 2019-02-26
- zheng, Ley, & Hu. (2018). Global Aetiology and Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus and its Complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14, 88-96. doi:10.1038/nrendo.2017.151.
- Zhong, J., Z. X., Z. X., Nie, Y. Z., Wu, S., & Bao, A. (2017). Transcriptomic Analysis of the Venom Glands from the Scorpion *Hadogenes Troglodytes* Revealed Unique and Extremely High Diversity of the Venom Peptides. *Journal of proteomics*, 150, 40-62. doi:10.1016/j.jprot.2016.08.004
- Zolfagharian, & Mohammadpour. (2013). Progress and Improvement of the Manufacturing Process of Snake Antivenom. *Archives of Razi Institute*, 68(1), 1-10. Obtenido de

[https://www.researchgate.net/publication/285954753\\_Progress\\_and\\_improvement\\_of\\_the\\_manufacturing\\_process\\_of\\_snake\\_antivenom](https://www.researchgate.net/publication/285954753_Progress_and_improvement_of_the_manufacturing_process_of_snake_antivenom)

## ANEXOS

### Anexo 1 Indicadores demográficos mundiales de los países en desarrollo sin litoral.

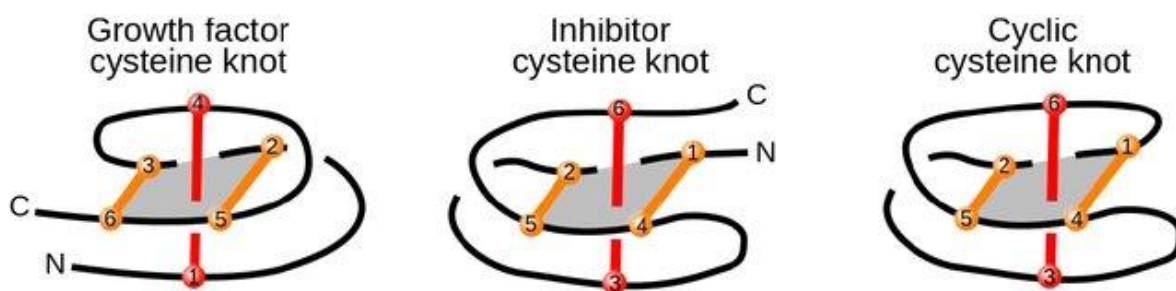
#### Land-locked Developing Countries (LLDC)

	1950	1970	1990	2000	2005	2010	2015	2020	2030	2050	2075	2100
<b>Population</b>												
Total population (thousands) .....	103 803	167 055	265 852	333 947	374 685	420 661	473 817	533 143	659 183	926 457	1 222 305	1 405 998
Median age (years) (a) .....	20.1	18.3	18.3	18.3	18.7	19.1	19.7	20.4	22.2	26.7	32.4	37.6
Population under age 15 (thousands) .....	41 141	72 501	115 332	143 193	156 923	172 465	189 903	207 505	233 924	273 805	289 510	277 644
Population aged 15-24 (thousands) .....	20 298	30 194	49 689	65 552	75 519	85 103	95 047	104 843	129 385	163 929	187 902	188 946
Population aged 25-64 (thousands) .....	38 362	58 319	91 307	112 938	128 436	147 981	171 920	200 562	266 025	428 976	607 630	703 418
Population aged 65+ (thousands) .....	4 002	6 040	9 524	12 263	13 806	15 112	16 946	20 233	29 848	59 747	137 263	235 990
Percentage of population under age 15 .....	39.6	43.4	43.4	42.9	41.9	41.0	40.1	38.9	35.5	29.6	23.7	19.8
Percentage of population aged 15-24 .....	19.6	18.1	18.7	19.6	20.2	20.2	20.1	19.7	19.6	17.7	15.4	13.4
Percentage of population aged 25-64 .....	37.0	34.9	34.3	33.8	34.3	35.2	36.3	37.6	40.4	46.3	49.7	50.0
Percentage of population aged 65+ .....	3.9	3.6	3.6	3.7	3.7	3.6	3.6	3.8	4.5	6.5	11.2	16.8
<b>Dependency ratios (per 100)</b>												
Total dependency ratio (b) .....	170.6	186.5	191.2	195.7	191.7	184.3	175.6	165.8	147.8	116.0	101.2	99.9
Child dependency ratio (c) .....	160.2	176.1	180.7	184.8	181.0	174.1	165.8	155.7	136.6	102.0	78.6	66.3
Potential support ratio (d) .....	9.6	9.7	9.6	9.2	9.3	9.8	10.2	9.9	8.9	7.2	4.4	3.0
1950-1955    1965-1970    1985-1990    1995-2000    2000-2005    2005-2010    2010-2015    2015-2020    2025-2030    2045-2050    2070-2075    2095-2100												
<b>Rates of population change</b>												
Annual rate of population change (percentage) .....	2.1	2.5	2.5	2.2	2.3	2.3	2.4	2.4	2.0	1.5	0.9	0.4
Population doubling time (years) (e) .....	33	28	28	31	30	30	29	30	34	47	80	—
<b>Mortality</b>												
Crude death rate per 1,000 population .....	25.5	19.3	14.7	13.6	12.2	10.2	8.3	7.3	6.4	6.2	7.5	9.3
Infant mortality rate (Iq0) per 1,000 live births .....	181	143	107	90	77	63	51	42	32	19	13	10
Under-five mortality (5q0) per 1,000 live births .....	292	231	175	147	124	98	75	62	46	28	19	14
Life expectancy at birth (years) .....	38.7	45.9	52.6	53.1	55.0	58.7	62.8	65.2	68.0	71.8	75.3	78.4
Male life expectancy at birth (years) .....	37.1	44.0	50.6	50.9	53.0	56.7	60.7	63.1	65.6	69.3	72.8	76.2
Female life expectancy at birth (years) .....	40.4	47.7	54.5	55.3	57.1	60.8	64.9	67.4	70.3	74.3	77.8	80.5
Life expectancy at age 65 (years) .....	10.7	11.9	12.8	12.6	12.9	13.3	13.7	14.2	14.7	15.8	17.3	19.0
<b>Fertility</b>												
Crude birth rate per 1,000 population .....	45.9	43.5	42.4	38.4	36.5	35.3	33.8	31.5	27.4	21.6	16.5	13.3
Total fertility (live births per woman) .....	6.22	6.28	5.89	5.22	4.88	4.63	4.33	3.98	3.41	2.72	2.25	2.00
Sex ratio at birth (males per 100 females) .....	104	104	104	104	104	104	104	104	104	104	104	104
Mean age of childbearing (years) .....	29.9	29.7	29.3	28.8	28.8	28.8	28.7	28.6	28.4	28.6	29.0	29.7
<b>Births and deaths</b>												
Number of births (thousands) .....	25 149	34 205	52 983	60 738	64 585	70 177	75 557	79 401	85 758	96 323	98 461	92 573
Number of deaths (thousands) .....	13 953	15 157	18 361	21 496	21 583	20 319	18 598	18 262	20 091	27 784	44 918	64 504
Births minus deaths (thousands) .....	11 196	19 048	34 623	39 242	43 002	49 858	56 959	61 138	65 667	68 539	53 543	28 069
<b>International migration</b>												
Net number of migrants (thousands) .....	489	379	-3 006	-3 993	-2 264	-3 882	-3 803	-1 812	-1 698	-1 749	-1 749	-1 749
Net migration rate (per 1,000) .....	0.9	0.5	-2.4	-2.5	-1.3	-2.0	-1.7	-0.7	-0.5	-0.4	-0.3	-0.3

- a Age that divides the population in two parts of equal size, that is, there are as many persons with ages above the median as there are with ages below the median.
- b The total dependency ratio is the ratio of the population aged 0-24 and that aged 65+ to the population aged 25-64. They are presented as number of dependants per 100 persons of working age (25-64).
- c The child dependency ratio is the ratio of the population aged 0-24 to the population aged 25-64. They are presented as number of dependants per 100 persons of working age (25-64).
- d The potential support ratio is the ratio of the population aged 25-64 to the population aged 65 years or over. They are presented as number of dependants per 100 persons of age 65 years or over.
- e The population doubling time corresponds to the number of years required for the total population to double in size if the annual rate of population change would remain constant. Doubling time is computed only for fast growing populations with growth rates exceeding 0.5 per cent.

*Fuente: (United Nations, 2019)*

## ANEXO 2 Tipos de nudos de cisteína en péptidos



*Nota: Los puentes en bucle se muestran en naranja y el puente de perforación en rojo. Las letras 'N' y 'C' denotan los extremos de la cadena. Los números en las cuentas que representan las cisteínas ilustran el orden secuencial de los residuos de cisteína. Fuente: (Dabrowski-Tumanski, y otros, 2018)*

## Anexo 3 Modelo seleccionado, de acuerdo con el estudio de máxima similitud, para Toxinas Antinociceptivas

MODEL	#PARAM	BIC	AICC	LNL	INVARIANT	GAMMA
<b>DAYHOFF</b>	<b>21</b>	<b>1213,021991</b>	<b>1131,46952</b>	<b>-543,5221614</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>
DAYHOFF+G	22	1214,321051	1129,007604	-541,1722231	n/a	3,351315693
DAYHOFF+I	22	1219,020927	1133,707481	-543,5221615	0	n/a
DAYHOFF+G+I	23	1220,320278	1131,257666	-541,1723686	0,00000999	3,351827486
WAG+G	22	1229,336251	1144,022805	-548,6798233	n/a	2,146116908
WAG	21	1231,125074	1149,572603	-552,5737029	n/a	n/a
WAG+G+I	23	1235,335279	1146,272667	-548,6798691	0,00001	2,145579687
WAG+I	22	1235,617738	1150,304291	-551,8205667	0,09174424	n/a
JTT+G	22	1245,215733	1159,902286	-556,6195643	n/a	1,686626726
JTT	21	1250,784101	1169,23163	-562,4032165	n/a	n/a
JTT+G+I	23	1251,214697	1162,152084	-556,6195779	0	1,685300532
JTT+I	22	1251,906501	1166,593055	-559,9649484	0,132772232	n/a
LG+G	22	1256,16467	1170,851224	-562,094033	n/a	1,878475648
LG+I	22	1257,009615	1171,696169	-562,5165055	0,174605847	n/a
LG+G+I	23	1258,589657	1169,527045	-560,3070582	0,145580431	2,916184056
RTREV+I	22	1259,830511	1174,517064	-563,9269532	0,172382847	n/a
RTREV+G+I	23	1263,007403	1173,94479	-562,5159308	0,163357965	4,324448702
RTREV+G	22	1264,382587	1179,069141	-566,2029915	n/a	1,859690892

CPREV+G	22	1269,704289	1184,390842	-568,8638421	n/a	1,864360628
LG	21	1272,630251	1191,07778	-573,3262918	n/a	n/a
CPREV+G+I	23	1274,940778	1185,878166	-568,4826188	0,078058436	1,43782696
CPREV+I	22	1278,245343	1192,931896	-573,1343691	0,173503604	n/a
RTREV	21	1286,055596	1204,503125	-580,0389639	n/a	n/a
CPREV	21	1290,661337	1209,108867	-582,3418348	n/a	n/a
DAYHOFF+F	40	1304,70718	1153,810491	-532,374859	n/a	n/a
DAYHOFF+G+F	41	1305,370056	1150,953823	-529,7068286	n/a	3,340223215
DAYHOFF+I+F	41	1310,70636	1156,290127	-532,3749805	0,00001	n/a
DAYHOFF+G+I+F	42	1311,368993	1153,446991	-529,7068286	0	3,34030912
WAG+F	40	1317,72824	1166,831551	-538,885389	n/a	n/a
WAG+G+F	41	1319,467958	1165,051725	-536,7557794	n/a	2,979903773
WAG+I+F	41	1323,165443	1168,749211	-538,6045222	0,059320192	n/a
WAG+G+I+F	42	1325,466916	1167,544914	-536,7557904	0	2,976686106
JTT+G+F	41	1334,877415	1180,461182	-544,4605078	n/a	1,841107602
JTT+F	40	1338,827102	1187,930413	-549,4348198	n/a	n/a
JTT+I+F	41	1339,364984	1184,948751	-546,7042923	0,139952434	n/a
MTREV24+G	22	1339,579122	1254,265676	-603,801259	n/a	1,878475648
JTT+G+I+F	42	1340,690546	1182,768544	-544,3676052	0,062042995	2,555901498
MTREV24+G+I	23	1342,261358	1253,198746	-602,1429087	0,119484158	2,053138637
LG+G+F	41	1342,439093	1188,022861	-548,2413472	n/a	1,878475648
MTREV24+I	22	1343,432793	1258,119346	-605,7280943	0,165306903	n/a
LG+I+F	41	1344,315887	1189,899654	-549,1797441	0,163315497	n/a
RTREV+I+F	41	1345,272533	1190,8563	-549,6580671	0,162990621	n/a
LG+G+I+F	42	1346,700262	1188,778259	-547,372463	0,125541894	3,219867913
RTREV+G+F	41	1347,396961	1192,980728	-550,7202808	n/a	1,878475648
RTREV+G+I+F	42	1349,728564	1191,806562	-548,8866142	0,148573544	5,75134514
LG+F	40	1350,587185	1199,690496	-555,3148613	n/a	n/a
RTREV+F	40	1353,779157	1202,882468	-556,9108472	n/a	n/a
CPREV+G+F	41	1357,647885	1203,231652	-555,845743	n/a	1,851807089
MTREV24	21	1359,033013	1277,480542	-616,5276727	n/a	n/a
CPREV+I+F	41	1362,397383	1207,981151	-558,2204922	0,154479856	n/a
CPREV+G+I+F	42	1362,546833	1204,624831	-555,2957489	0,099475625	2,313579845
MTREV24+G+F	41	1368,502544	1214,086311	-561,2730725	n/a	1,878475648
CPREV+F	40	1373,413811	1222,517122	-566,7281742	n/a	n/a
MTREV24+G+I+F	42	1373,746423	1215,824421	-560,8955438	0	1,263249278
MTREV24+I+F	41	1377,931631	1223,515398	-565,9876159	0,150479202	n/a
MTREV24+F	40	1381,647556	1230,750867	-570,845047	n/a	n/a

*Nota: Modelo seleccionado resaltado con amarillo en recuadro rojo: DAYHOFF a partir del método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas.*

**ANEXO 4** Modelo seleccionado, de acuerdo con el estudio de máxima similitud, para Toxinas Antiepiléptico

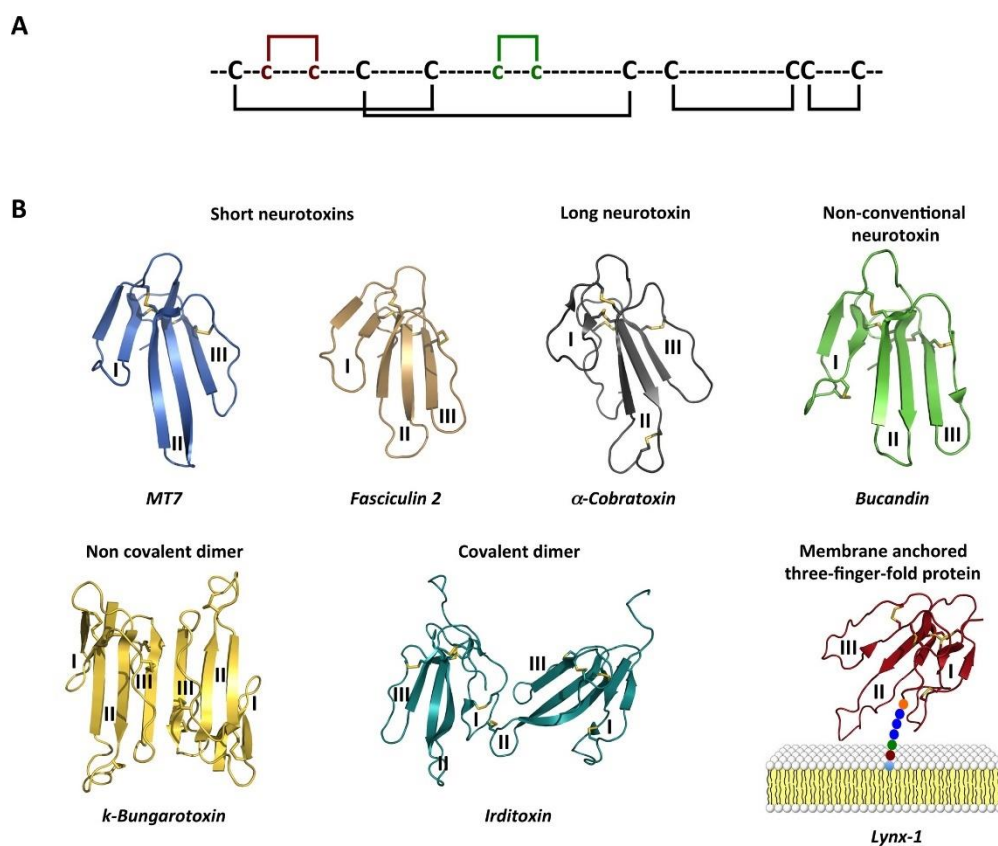
MODEL	#PARAM	BIC	AICC	LNL	INVARIANT	GAMMA
<b>WAG+G</b>	<b>26</b>	<b>1379,328212</b>	<b>1273,365749</b>	<b>-609,1633939</b>	<b>n/a</b>	<b>0,89424723</b>
WAG+G+I	27	1385,025912	1275,111952	-608,9160625	0,144674751	1,467578928
WAG+I	26	1388,27683	1282,314366	-613,6377025	0,250293922	n/a
DAYHOFF+G	26	1388,536381	1282,573917	-613,7674779	n/a	0,750171038
DAYHOFF+G+I	27	1394,776322	1284,862362	-613,7912675	0,054101575	0,838736604
JTT+G	26	1398,401419	1292,438955	-618,699997	n/a	0,672452415
LG+G	26	1399,24882	1293,286357	-619,1236978	n/a	0,62157508
LG+G+I	27	1403,990038	1294,076078	-618,3981256	0,205362972	1,31581276
JTT+G+I	27	1404,05044	1294,136479	-618,4283264	0,138962112	1,00387269
WAG	25	1404,920106	1302,918819	-625,055522	n/a	n/a
RTREV+G	26	1408,584294	1302,62183	-623,7914345	n/a	0,539882387
LG+I	26	1409,570788	1303,608324	-624,2846817	0,272416526	n/a
DAYHOFF+I	26	1410,404384	1304,441921	-624,7014799	0,199937504	n/a
RTREV+G+I	27	1412,927931	1303,01397	-622,867072	0,20758292	1,168304425
JTT+I	26	1416,663176	1310,700712	-627,8308755	0,26032692	n/a
RTREV+I	26	1421,20798	1315,245516	-630,1032777	0,267767286	n/a
DAYHOFF	25	1423,615769	1321,614482	-634,4033532	n/a	n/a
CPREV+G	26	1439,220784	1333,25832	-639,1096795	n/a	1,141142527
JTT	25	1441,809725	1339,808438	-643,5003314	n/a	n/a
CPREV+G+I	27	1443,425507	1333,511546	-638,1158596	0,282051282	1,227855481
CPREV+I	26	1447,269879	1341,307416	-643,1342273	0,282051282	n/a
LG	25	1449,489849	1347,488562	-647,3403935	n/a	n/a
RTREV	25	1470,10039	1368,099103	-657,6456637	n/a	n/a
WAG+G+F	45	1477,618277	1298,307337	-599,4809825	n/a	1,0234859
CPREV	25	1479,616504	1377,615217	-662,4037209	n/a	n/a
DAYHOFF+G+F	45	1479,801894	1300,490954	-600,5727909	n/a	0,949927619
WAG+G+I+F	46	1483,469061	1300,403192	-599,3101934	0,121505357	1,567109712
WAG+I+F	45	1484,41083	1305,09989	-602,8772588	0,240172585	n/a
DAYHOFF+G+I+F	46	1485,99427	1302,928401	-600,5727977	0,00001	0,949886309
MTREV24+G	26	1492,813746	1386,851283	-665,9061607	n/a	0,40019176
WAG+F	44	1494,988905	1319,443874	-611,2624776	n/a	n/a
DAYHOFF+I+F	45	1495,433169	1316,122229	-608,3884284	0,187998211	n/a
DAYHOFF+F	44	1499,807451	1324,26242	-613,6717505	n/a	n/a
LG+G+F	45	1500,00634	1320,6954	-610,6750139	n/a	0,600920795
MTREV24+G+I	27	1501,134037	1391,220076	-666,9701248	0,215765684	1,129731102
RTREV+G+F	45	1503,187665	1323,876726	-612,2656767	n/a	0,630749018
JTT+G+F	45	1505,237355	1325,926415	-613,2905215	n/a	0,721566567
LG+G+I+F	46	1505,42947	1322,363601	-610,2903978	0,150752726	0,97532152
RTREV+G+I+F	46	1508,680801	1325,614932	-611,9160634	0,154806034	1,029726314
JTT+G+I+F	46	1510,919244	1327,853375	-613,0352847	0,155179424	1,201630955
LG+I+F	45	1516,015253	1336,704313	-618,6794703	0,263693526	n/a
JTT+I+F	45	1517,435805	1338,124865	-619,3897463	0,264991299	n/a
CPREV+G+F	45	1521,17692	1341,86598	-621,2603038	n/a	0,648082854
RTREV+I+F	45	1521,814607	1342,503668	-621,5791477	0,263407315	n/a



MTREV24+I	26	1523,893887	1417,931423	-681,4462312	0,264837518	n/a
CPREV+G+I+F	46	1530,864765	1347,798896	-623,0080451	0,234027565	1,409728875
CPREV+I+F	45	1531,895678	1352,584738	-626,6196828	0,282051282	n/a
MTREV24+G+I+F	46	1535,513763	1352,447894	-625,3325444	0,225556819	1,129731102
MTREV24+G+F	45	1538,283922	1358,972982	-629,8138049	n/a	1,118433791
JTT+F	44	1539,823735	1364,278704	-633,6798925	n/a	n/a
LG+F	44	1540,484295	1364,939264	-634,0101726	n/a	n/a
RTREV+F	44	1549,824237	1374,279206	-638,6801435	n/a	n/a
MTREV24+I+F	45	1550,239073	1370,928133	-635,7913804	0,266605278	n/a
CPREV+F	44	1563,763485	1388,218454	-645,6497675	n/a	n/a
MTREV24	25	1570,888985	1468,887698	-708,0399615	n/a	n/a
MTREV24+F	44	1589,40475	1413,859719	-658,4704001	n/a	n/a

Nota: Modelo seleccionado resaltado con amarillo en recuadro rojo: WAG+G a partir del método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas.

## ANEXO 5 Motivo estructural 3FTx



El andamio 3FP. ( a ) Marco de cisteína típico de los 3FP que incluye los cuatro puentes disulfuro altamente conservados (negro) y los posibles quintos enlaces adicionales (rojo y verde). ( b ) Estructuras tridimensionales de 3FT monoméricos cortos, largos y no

convencionales, de dímeros de 3FT no covalentes o covalentes y de un 3FP anclado a la membrana (que se muestra aquí con un ancla esquemática). (Kessler, Marchot, Silva, & Servent, 2017)

**ANEXO 6** Modelo seleccionado, de acuerdo con el estudio de máxima similitud, para  
Toxinas Anticancerígena

MODEL	#PARAM	BIC	AICC	LNL	INVARIANT	GAMMA
<b>WAG+G</b>	<b>26</b>	<b>1650,541471</b>	<b>1529,002253</b>	- <b>737,6439839</b>	<b>n/a</b>	<b>1,254503698</b>
<b>WAG+G+I</b>	27	1656,49835	1530,352738	- 737,2521637	0,00000999	0,874617481
<b>DAYHOFF+G</b>	26	1658,161359	1536,622141	- 741,4539279	n/a	0,84763072
<b>WAG+I</b>	26	1663,029892	1541,490675	- 743,8881944	0,209993598	n/a
<b>DAYHOFF+G+I</b>	27	1666,831289	1540,685677	- 742,4186332	0,064358878	1,374690297
<b>LG+G</b>	26	1669,114652	1547,575434	- 746,9305741	n/a	1,254503698
<b>WAG</b>	25	1669,332422	1552,404804	- 750,4097191	n/a	n/a
<b>JTT+G</b>	26	1669,963734	1548,424517	- 747,3551154	n/a	1,254503698
<b>LG+G+I</b>	27	1672,507781	1546,362169	- 745,2568791	0,00001	0,682228083
<b>DAYHOFF+I</b>	26	1673,148288	1551,609071	- 748,9473925	0,190312302	n/a
<b>JTT+G+I</b>	27	1674,378443	1548,232831	-746,19221	0,00001	0,741397538
<b>LG+I</b>	26	1679,22984	1557,690622	- 751,9881684	0,259596018	n/a
<b>DAYHOFF</b>	25	1680,874198	1563,94658	- 756,1806071	n/a	n/a
<b>JTT+I</b>	26	1681,53623	1559,997012	- 753,1413633	0,242810536	n/a
<b>RTREV+G</b>	26	1681,572417	1560,033199	- 753,1594566	n/a	0,687368482
<b>RTREV+G+I</b>	27	1688,31564	1562,170028	- 753,1608087	0,00000999	0,690332145
<b>RTREV+I</b>	26	1691,321751	1569,782534	- 758,0341239	0,266939975	n/a
<b>JTT</b>	25	1692,756402	1575,828784	- 762,1217092	n/a	n/a
<b>LG</b>	25	1694,425428	1577,49781	- 762,9562219	n/a	n/a
<b>CPREV+G</b>	26	1695,433981	1573,894763	- 760,0902387	n/a	0,599483074
<b>CPREV+G+I</b>	27	1704,174971	1578,02936	- 761,0904744	0,122871883	1,066917502

RTREV	25	1713,36008	1596,432461	-	n/a	n/a
				772,4235478		
CPREV+I	26	1723,800376	1602,261159	-	0,278775477	n/a
				774,2734364		
MTREV24+G	26	1735,35175	1613,812532	-	n/a	0,67580813
				780,0491233		
CPREV	25	1742,003118	1625,075499	-	n/a	n/a
				786,7450668		
MTREV24+G+I	27	1742,092525	1615,946913	-780,049251	0	0,676396101
MTREV24+I	26	1751,37457	1629,835352	-	0,235324992	n/a
				788,0605332		
WAG+G+F	45	1755,312221	1547,16385	-	n/a	1,122123919
				725,9944248		
WAG+G+I+F	46	1762,055548	1549,403422	-	0,00001	1,122050018
				725,9958286		
WAG+I+F	45	1762,662923	1554,514552	-729,669776	0,184425519	n/a
MTREV24	25	1763,425492	1646,497874	-	n/a	n/a
				797,4562542		
DAYHOFF+G+F	45	1763,569944	1555,421573	-	n/a	1,032168903
				730,1232863		
WAG+F	44	1767,813135	1564,174103	-	n/a	n/a
				735,6151416		
DAYHOFF+G+I+F	46	1770,310868	1557,658742	-	0,00001	1,031842965
				730,1234886		
JTT+G+F	45	1773,513517	1565,365146	-735,095073	n/a	0,991658278
DAYHOFF+I+F	45	1774,217385	1566,069013	-	0,173110778	n/a
				735,4470067		
LG+G+F	45	1779,695655	1571,547284	-	n/a	1,254503698
				738,1861418		
JTT+I+F	45	1780,137658	1571,989287	-	0,210277046	n/a
				738,4071436		
JTT+G+I+F	46	1780,254053	1567,601928	-	0,00001	0,991266341
				735,0950814		
DAYHOFF+F	44	1781,166636	1577,527605	-	n/a	n/a
				742,2918922		
LG+I+F	45	1785,169039	1577,020668	-740,922834	0,232546527	n/a
LG+G+I+F	46	1785,652953	1573,000827	-	0	0,91344268
				737,7945312		
RTREV+G+F	45	1790,249639	1582,101268	-	n/a	0,960132528
				743,4631339		
JTT+F	44	1790,717863	1587,078831	-	n/a	n/a
				747,0675054		
RTREV+I+F	45	1791,736886	1583,588515	-	0,246191777	n/a
				744,2067573		
RTREV+G+I+F	46	1796,655458	1584,003333	-	0,16866422	2,385603068
				743,2957839		
LG+F	44	1797,080715	1593,441683	-	n/a	n/a
				750,2489315		
CPREV+G+F	45	1800,353909	1592,205538	-	n/a	0,721367582
				748,5152691		
MTREV24+G+F	45	1801,475851	1593,32748	-	n/a	0,700023478
				749,0762399		
RTREV+F	44	1806,762774	1603,123743	-	n/a	n/a
				755,0899612		

<b>CPREV+G+I+F</b>	46	1809,341824	1596,689698	-	0,00001	0,72281104
				749,6389669		
<b>MTREV24+G+I+F</b>	46	1811,203738	1598,551612	-	0,067371485	1,229539074
				750,5699238		
<b>MTREV24+I+F</b>	45	1819,450819	1611,302448	-	0,198290891	n/a
				758,0637241		
<b>CPREV+I+F</b>	45	1820,041985	1611,893614	-	0,271012657	n/a
				758,3593069		
<b>MTREV24+F</b>	44	1830,668943	1627,029911	-	n/a	n/a
				767,0430455		
<b>CPREV+F</b>	44	1837,289548	1633,650517	-	n/a	n/a
				770,3533483		

*Nota: Modelo seleccionado resaltado con amarillo en recuadro rojo: WAG+G a partir del método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas.*