

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización biológica y acción de inhibidores de  
una fosfolipasa A2 del veneno de la serpiente peruana  
*Lachesis muta***

**TESIS**

para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular  
y Genética

**AUTORA**

Rosalina Rosio Inga Arellano

**Lima-Perú**

**2009**



*NO HAY MAL QUE POR BIEN NO VENGA*

## DEDICATORIA

*A mis padres David y  
Rosalina por el amor,  
la paciencia y el apoyo  
incondicional.*

*A mis hermanos  
Daly, Joel y Antonio*

*A mis dos angelitos:  
mis sobrinos Sebastián y Rodrigo*

*Al obsequio y la bendición que Dios me da con mucho amor*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Yarlequé jefe del laboratorio de Biología Molecular por su asesoramiento durante la elaboración del presente trabajo.

A la Mag. Fany Lazo por sus sugerencias y ayuda oportuna en todo el proceso de la investigación.

A la Mag. Edith Rodríguez por inculcarme la disciplina y orden en ciencia.

A la Mag. Carmen Pantigoso por su enseñanza, amistad y colaboración para la elaboración de la tesis.

Al Maestro Orestes Málaga por los principios básicos brindados durante mi formación académica y profesional.

A los profesores Elena Arbaiza, Enrique Escobar, Mariano Astocondor, Víctor Pacheco y Cesar Córdova, por sus valiosos consejos en mi desarrollo profesional y de esta tesis.

A mis colegas Luis Lerma y Gustavo Sandoval, por los momentos compartidos en el laboratorio así mismo a Nora Ruiz, Gladys Ccahuantico y Susan Medina por su colaboración y confianza.

A Dan Vivas, Pedro Palermo y Julio Mendoza, por hacer del laboratorio un segundo hogar, alguna vez aprendices, hoy colegas y eternamente amigos.

A las amigas de siempre Miriam Lescano, Luz Huerto, Guliana Gonzáles, Marina Vargas y Melissa Torreblanca.

A ti por el apoyo constante, Dios Amor Naturaleza las tres bases de la vida.

## ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES.....	5
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
VI. RESULTADOS.....	22
VII. DISCUSIÓN.....	27
VIII. CONCLUSIONES.....	40
IX. RECOMENDACIONES.....	41
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
XI. TABLAS Y FIGURAS.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<b>Pag.</b>
Tabla N°1 Purificación de la fosfolipasa A <sub>2</sub> del veneno de <i>Lachesis muta</i> .....	56
Tabla N°2 Termoestabilidad de la fosfolipasa A <sub>2</sub> purificada a pH 7.6.....	59
Tabla N°3 Efecto de iones sobre la fosfolipasa del veneno de <i>Lachesis muta</i> .....	60
Tabla N°4 Efecto de algunos agentes sobre la actividad de la fosfolipasa A <sub>2</sub> del veneno de <i>Lachesis muta</i> .....	61
Figura N°1 Primer paso en la purificación de fosfolipasa A <sub>2</sub> del veneno de <i>Lachesis muta</i> en CM-Sephadex C-50.....	54
Figura N°2 Segundo paso en la purificación de fosfolipasa A <sub>2</sub> del veneno de <i>Lachesis muta</i> en Sephadex G-50.....	55
Figura N°3 Electroforesis en PAGE - SDS de la fosfolipasa A <sub>2</sub> purificada.....	57
Figura N°4 Determinación del peso molecular por electroforesis en PAGE-SDS.....	58
Figura N°5 Actividad hemolítica indirecta en tubo del veneno total y la fosfolipasa A <sub>2</sub> de <i>Lachesis muta</i> .....	62
Figura N°6 Actividad hemolítica indirecta en placa del veneno y la fosfolipasa A <sub>2</sub> de <i>Lachesis muta</i> .....	63
Figura N°7 Actividad miotóxica por cuantificación del CK en plasma de la fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	64
Figura N°8 Actividad edemática de la fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	65
Figura N°9 Actividad anticoagulante de la fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	66
Figura N°10 Antigenicidad de la fosfolipasa A <sub>2</sub> de <i>Lachesis muta</i> .....	67
Figura N°11 Neutralización de la actividad enzimática de la fosfolipasa A <sub>2</sub> purificada.....	68
Figura N°12. Neutralización de la actividad hemolítica directa de la fosfolipasa A <sub>2</sub> purificada.....	69

## ABREVIATURAS

FLA <sub>2</sub>	:	Fosfolipasa A <sub>2</sub> .
CM-Sephadex C-50	:	Carboximetil Sephadex C-50.
rpm	:	revoluciones por minuto.
Da	:	Daltons.
pI	:	Punto isoelectrico.
mg, µg	:	miligramos, microgramos.
ml, µl	:	mililitros, microlitros.
ml/h	:	mililitros por hora
nm	:	nanometros.
mM, nM, µM	:	milimolar, nanomolar, micromolar.
UTA	:	Unidades totales de actividad
SDS	:	sodio dodecil sulfato.
Tris	:	tris (hidroximetil amino metano).
HCl	:	ácido clorhídrico
PAGE-SDS	:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato.
TEMED	:	N, N, N, N'-tetrametil etilen diamino.
EDTA	:	Etilen diamino tetra acético.
PMSF	:	Fenil metil sulfonil fluoruro.
DTT	:	Ditiotreitol.
TLCK	:	Tosyl lisil clorometil cetona.
DH <sub>50</sub>	:	Dosis hemolítica media.
DMM	:	Dosis miotóxica mínima.
CK	:	Cretina kinasa.
IU/L	:	Unidades internacionales por litro.
DEM	:	Dosis edemática mínima.
Log.	:	Logaritmo.
Long	:	longitud.
UV	:	ultravioleta.

## RESUMEN

El envenenamiento por la serpiente *Lachesis muta* presenta una fisiopatología compleja debido a la presencia de un numeroso grupo de enzimas como la fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>). Por ello, en el presente estudio se ha investigado algunas propiedades bioquímicas de la FLA<sub>2</sub> y sus efectos biológicos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente la enzima fue purificada mediante dos pasos cromatográficos un CM-Sephadex C-50 seguido por un Sephadex G-50, obteniéndose un factor de purificación de 55.3 veces con un rendimiento de 34.1% y se obtuvo una única banda proteica de 18749 Da, empleando la técnica de PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras, demostrándose que la FLA<sub>2</sub> es una proteína monomérica. La enzima es termoestable manteniendo su actividad total a 100°C por 10 minutos, es además una enzima dependiente del ion calcio y es fuertemente inhibida por glutatión, cisteína, EDTA y PMSF reduciendo su actividad hasta más del 50%.

En cuanto a su acción biológica, se obtuvo que la Dosis hemolítica media (DH<sub>50</sub>) es 4.35µg y de 67.6µg para la enzima pura y el veneno respectivamente por lo que FLA<sub>2</sub> es 15.5 veces más hemolítica que el veneno total. Así mismo se ha demostrado que la dosis miotóxica mínima (DMM) fue muy baja con un valor de 125, 89 µg/ml mientras que para el veneno crudo fue de 144,21 µg/ml. Además, la dosis edemática mínima (DEM) de la enzima fue 91.5 µg. Por otra parte la enzima no mostró actividad hemorrágica usando hasta 30 µg pero en cambio, si mostró tener acción anticoagulante retardando el tiempo de coagulación del plasma citratado a medida que se incremento la concentración de FLA<sub>2</sub>.

Adicionalmente las pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforésis revelaron que FLA<sub>2</sub> tuvo reactividad inmunogénica contra el antiveneno lachésico monovalente (INS-Perú), así como una neutralización parcial de la actividad enzimática y hemolítica por acción de dicho suero antiofídico.

**Palabras claves:** *Lachesis muta*, fosfolipasa A<sub>2</sub>, isoenzima, veneno, serpiente. neutralización.



## ABSTRACT

The *Lachesis muta*'s envenomations induce a complex physiopathology due to the presence of numerous enzymes group such as Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). For this reason, in the present study have been investigated some biochemistries' properties of PLA<sub>2</sub> and its *in vitro* and *in vivo* biologics effect. Initially, the enzyme was purified in two chromatographics steps, CM-Sephadex C-50 followed by Sephadex G-50, obtaining a purification factor of 55.3 times and with a yield of 34.1% and a unique protein band of 18749 Da was obtained by SDS-PAGE analysis under reducing and non-reducing conditions, indicating that PLA<sub>2</sub> is a monomeric protein. The protein is thermostable maintaining its total activity until 100°C per 10 minutes, so, it is a Calcium ion depending protein and the activity was strongly inhibited by glutation, cistein, ESTA and PMSF which reduce until more 50% of PLA<sub>2</sub> activity.

As far as its biologic activity was obtain that Media Hemolytic Doses (DH<sub>50</sub>) was 4.35µg and 67.6µg to pure enzyme and crude venom respectively, this indicate that PLA<sub>2</sub> is 15,5 times more hemolytic than crude venom. Likewise, had demonstrated that Minimum Miotoxic Doses (MMD) is very low to PLA<sub>2</sub> (125. 89 µg/ml) while to crude venom was 144,21 µg/ml. The enzyme's Minimum Edematic Doses (MED) was 91.5 µg. For another hand, the PLA<sub>2</sub> didn't show any hemorrhagic activity until 30 µg but it showed has anticoagulant activity on citrated plasma when the PLA<sub>2</sub> concentration was increasing.

Additionally, the immunodiffusion and immunoelectrophoresis probes showed PLA<sub>2</sub> had immunogenic reactivity against anti lachesic nonovalent serum (INS-Perú), as well as a partial enzymatic activity and hemolytic neutralization.

**Key words:** *Lachesis muta*, phospholipase A<sub>2</sub>, isoenzyme, venom, snake, neutralization.

## INTRODUCCIÓN

América Latina presenta una rica y variada fuente de serpientes ya que en esta región se encuentran las especies de las familias Hydrophiidae, Elapidae y Viperidae, capaces de producir venenos e inyectarlos en los humanos, generando severos cuadros clínicos de envenenamiento. Muchos de estos envenenamientos ofídicos son causados por especies de la familia Viperidae como *Lachesis muta* (Shushupe), que es la serpiente Crotalinae más grande en el mundo y se encuentra distribuida en los Trópicos forestales lluviosos de América Central y del Sur, en tanto que en el Perú, su distribución se restringe a las zonas de la selva alta y baja, donde estos accidentes afectan fundamentalmente a la población rural involucrada en faenas agrícolas y madereras constituyéndose un problema de salud pública comúnmente conocido como ofidismo.(Ascencios y Cutti., 1995).

El cuadro clínico que se desarrolla en los casos de envenenamiento por *Lachesis muta* incluye daños locales y sistémicos prominentes tales como: cólico abdominal, diarrea, edema, dolor local intenso, náuseas, anormalidades hemostáticas, hipotensión, sangrado, necrosis, signos neurotóxicos, coagulopatías, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda; todo ello atribuido al complejo enzimático del veneno el cual presenta propiedades físicas, químicas y efectos biológicos distintos y de severa magnitud (Fuly y col., 2000). Además los anticuerpos que genera un envenenamiento ofídico son típicos para cada especie por lo que se considera que no hay venenos iguales sino que de acuerdo con la especie pueden ser semejantes o muy diferentes.

Dentro de este complejo enzimático se encuentran las fosfolipasas las cuales han sido ampliamente estudiadas habiéndose establecido una variedad de acciones biológicas relacionadas con el tipo de serpiente que la produce. Entre estas acciones tenemos el efecto anti-coagulante, hemorrágico, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotóxico, convulsivo y miotóxico, (Soares y Giglio., 2003; Kini., 2003) además, estas enzimas están involucradas en procesos patofisiológicos tales como: reumatismo, osteoartritis, psoriasis, shock séptico,

síndrome distress respiratorio y asma (Touque y Alaoui-El-azher., 2001; Murakawi y Kudo., 2002). No obstante, también se han encontrado efectos bactericida, anti-HIV, anti-tumoral, anti-parasitario y en particular, anti-malarico (Soares y Giglio, 2003; Kini, 2003). Sin embargo, las homologías estructurales, de las fosfolipasas de venenos de serpientes no están relacionadas con sus efectos biológicos máxime cuando puede haber isoformas de FLA<sub>2</sub> en un mismo veneno con funciones biológicas totalmente distintas por lo que el estudio de estas proteínas adquiere singular importancia.

En el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se purificó y caracterizó parcialmente esta enzima (Mejia y col, 2006), considerando la gran variabilidad de la acción biológica e inmunológica de las fosfolipasas A<sub>2</sub> y tomando en cuenta el poco conocimiento de sus inhibidores se ha realizado un estudio de su acción biológica como: anticoagulante, hemolítica, hemorrágica, miotóxica y edemática requiriendo para ello la identificación y aislamiento de la enzima así como completar los estudios bioquímicos e inmunológicos relacionados con la acción de sus inhibidores y su reactividad inmunogénica frente al antiveneno específico producido por el Instituto Nacional de Salud-Lima, Perú.

Los resultados de este trabajo proporcionan datos que nos permiten inferir algunas características de FLA<sub>2</sub> durante el proceso de envenenamiento por *L. muta* y de esta manera podremos plantear mejores estrategias para enfrentar los diversos daños producidos por esta enzima en el envenenamiento y pensar en usos clínicos y biotecnológicos de la fosfolipasa de *Lachesis muta*.

## ANTECEDENTES

En general las fosfolipasas (EC 3.1.1.4) son considerados como enzimas hidrolazas de los fosfolípidos que actúa sobre los enlaces acil-éster de una gran variedad de fosfoglicéridos siempre que su configuración química sea la de un sn-glicero 3 fosfato ó la de un sn-glicero 2 fosfato y dependiendo de la zona que hidroliza se le denomina como: la fosfolipasa A<sub>1</sub> que separa de modo específico el ácido graso de la posición 1, fosfolipasa A<sub>2</sub> el de la posición 2; la fosfolipasa B es una mezcla de la fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> pudiendo efectuar la separación sucesiva de los ácidos grasos, en tanto que la fosfolipasa C hidroliza el enlace entre el ácido fosfórico y la glicerina, mientras que la fosfolipasa D elimina el grupo de cabeza polar dejando ácido fosfatídico.

La fosfolipasa A<sub>2</sub> se ha encontrado en cuatro fuentes principales: bacterias, tejidos de mamíferos (páncreas de cerdo, cerebro de rata y ternero), venenos de serpiente y los venenos de abeja. Las fosfolipasas de mamíferos juegan un rol importante en la fertilización, proliferación celular, contracción muscular y en enfermedades de hipersensibilidad, ellas son importantes en las funciones celulares tales como la traducción de señal vía biosíntesis de prostaglandina y leucotrienos (Verheij y col., 1981; Jain y Ferg., 1989; Arita y col., 1991; Dennis y col., 1991; Fry y col., 1992; Kudo y col., 1993; Dennis., 1994). Sin embargo las enzimas de mamíferos son generalmente no tóxicas, mientras que las fosfolipasas de venenos de serpiente en adición a su posible rol en la digestión de la presa, exhiben un amplio rango de efectos farmacológicos para interferir en procesos fisiológicos normales.

De acuerdo con las características bioquímicas y el origen celular, las fosfolipasas se clasifican como: citosólicas (cFLA<sub>2</sub>), secretoras (sFLA<sub>2</sub>) e intracelulares (iFLA<sub>2</sub>), (Dennis., 1994). Así mismo las fosfolipasas A<sub>2</sub> secretoras son clasificadas en tres grupos, de acuerdo a su estructura primaria. En el grupo I se encuentran las fosfolipasas de páncreas de mamíferos y venenos de serpientes (familias Elapidae e Hidrofidae), el grupo II esta formado por venenos de

serpientes de las familias Crotalidae y Viperidae, por su parte el grupo III esta representado principalmente por venenos de abeja (*Apis mellifera*) y venenos de lagartijas (Dufton., 1983).

La fosfolipasa A<sub>2</sub> conocida también como fosfatidasa A o lectinasa A, es la fosfolipasa mayormente encontrada en venenos de serpientes. En la actualidad se han caracterizado y purificado más de cien fosfolipasas procedentes de serpientes y de otras fuentes (Kini y Evans., 1989). La mayoría de estas proteínas no son de naturaleza glicoproteica y tienen pesos moleculares que varían entre 11000 Da y 31000 Da, encontrándose en casi todas ellas actividad enzimática a un pH alcalino en el rango de 7.5 a 8.5 siendo una excepción *Micrurus spixii* que presenta un pH óptimo de 4.5 (Iwanaga y Suzuki., 1979).

El fenómeno que más inquieto a la investigación en venenos de serpiente y en especial, sobre este tipo de enzimas, fue el efecto hemolítico provocado por el veneno de *L. muta* aunque este no es suficiente para ser considerado letal, el estudio sobre la estructura y fisiología de la fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre eritrocitos permitieron comprender la actividad hemolítica de los venenos, sirviendo estos reportes como herramientas para localizar fosfolípidos (Lacerda., 1884; Condrea y col., 1964). En la década de los 50, grupos de investigadores intentaron generalizar el mecanismo de acción de los venenos atribuyendo estos efectos a la fosfolipasa A<sub>2</sub>, tanto en venenos neurotóxicos como en aquellos que poseen acción hemorrágica (Haberman y Breithaup., 1978). Slotta y Fraenkel-Conrat (1938-1939), reportaron el primer aislamiento de una fosfolipasa A de veneno de serpiente, la proteína cristalizada del veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a la cual denominaron crotoxina; esta proteína además de poseer actividad de fosfolipasa A, tenía actividad neurotóxica.

Los venenos elápidos son principalmente neurotóxicos y hemolíticos, levemente hemorrágicos y citolíticos, los venenos viperidos en cambio son principalmente coagulantes, poderosamente hemorrágicos, citolíticos y levemente neurotóxicos (Kochva y col., 1982), la función de esta enzima podría ser la de participar junto con otras enzimas en la necrosis de los tejidos afectados por el

veneno de la serpiente, debido a sus diferentes actividades biológicas que presenta entre ellas la neurotóxica en la serpiente *Crotalus durissus terrificus* (Slotta y Fraenkel Conrat., 1938), miotóxica en *Crotalus viridis viridis* (Ownby., 1997), anticoagulante en *Vipera aspis* (Boffa., 1982); citolítica e inducción de edema en *Naja naja* (Rudramnaji y Gueda., 1998) y otros efectos biológicos como anti-coagulante, inhibición de la agregación plaquetaria , hipotensión , bactericida, anti-HIV, anti-tumoral, anti-malaria y anti-parasitaria (Fuly., 2000).

Las fosfolipasas presentan de 40 – 99% de identidad en sus secuencias de aminoácidos y significativa similaridad en su estructura tri-dimensional, así sus diferencias funcionales no son fácilmente correlacionadas a sus estructuras (Dufton., 1983). Estas enzimas presentan dos sitios importantes en su estructura tri-dimensional el primero de ellos, similar a todas las enzimas presenta un sitio catalítico o enzimático y dependiendo del aminoácido que se localice en la posición 49 (sitio catalítico) se clasifican en: a) fosfolipasas enzimáticamente activas que presentan un residuo de ácido aspártico (D-49) y b) fosfolipasas enzimáticamente inactivas con una lisina (K-49). Hay evidencias significativas que las fosfolipasas A<sub>2</sub> catalíticamente activas no son necesarias para la acción miotóxica el más potente efecto de las fosfolipasas (Maraganore y col., 1984; Diaz-Oreiro y Gutierrez., 1997). El segundo sitio importante es el farmacológico o biológico y se puede localizar en distintas zonas de la estructura de la fosfolipasa siendo identificadas por modificaciones químicas o mutagénesis dirigida (Soares y Giglio., 2003; Chivato y Ward., 2003).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 1.1 VENENOS Y ANTIVENENOS.

Se empleó veneno obtenido de la serpiente peruana *Lachesis muta* procedente de Satipo, departamento de Junín y mantenidos en cautiverio en el serpentario Oswaldo Meneses de la UNMSM-Lima. El veneno extraído por presión manual, fue liofilizado y conservado a -8°C.

El antiveneno utilizado fue el suero antilachésico monovalente líquido, producido por el Instituto Nacional de Salud-Lima. Cada vial contiene 10ml de antiveneno que neutralizan no menos de 25mg del veneno de *Lachesis muta*. Para los ensayos de comparación se utilizaron ampollas de antiveneno vigentes (Lote: 00300183, Fecha de expiración: Marzo 2006) y expirados (Lote: 192, Fecha de expiración: Julio 1995).

#### 1.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se emplearon ratones albinos cepa Balb C machos (18 a 22 gr) criados en el bioterio del laboratorio de Embriología e Histología animal de la Facultad de Ciencias Biológicas.

### 2. MATERIAL DE LABORATORIO

#### 2.1 SUSTRATOS:

- Emulsión lipoproteica de yema de huevo.
- Kit de creatina kinasa.
- Fosfatidilcolina.

## 2.2 AGENTES INHIBIDORES Y ACTIVADORES:

- Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF).
- Ditione Treitol (DTT).
- Iodoacetato.
- Etilen diamino tetraacético (EDTA).
- Tosil - L-lisina clorometil cetona (TLCK).
- 2β-Mercaptoetanol.
- Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> bajo la forma de cloruros.
- Ácido glutámico, Ácido aspártico, cisteína y glutatión.

## 2.3. BUFERS:

- Acetato de amonio 0.05M pH 5,0.
- Tris- HCl a varias molaridades y valores de pH.
- Solución salina (NaCl 0.9%).
- Citrato de sodio 3.8%.
- Tris-HCl 0.1M con Cloruro de calcio 0.1M pH 7,6.
- Bufer isotónico (glicina 0.1M, NaCl 0.9% pH 7,3).
- Bufer fosfato salino PBS 0.02M, pH 7,4.
- Bufer de corrida para electroforesis.
- Bufer de stacking (Tris 0.25M, SDS 0,2% pH 6,8.).
- Bufer de resolución (Tris 0.75M, SDS 0,2% pH 8,8).
- Bufer muestra (Tris 0.06M, SDS 0,05%, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.05%).

## 2.4. ESTÁNDARES DE PESO MOLECULAR:

- Albumina bovina (66000 Da).
- Ovoalbúmina (45000 Da).
- Inhibidor de tripsina de soya (21500 Da).
- Lisozima (14300 Da).



### 2.5. *ELECTROFORESIS:*

- Acrilamida.
- Bis acrilamida.
- Sodio dodecil sulfato(SDS).
- Tetra etil metilen diamino (TEMED).
- Persulfato de amonio.
- Azul brillante de Coomassie.
- Solución decolorante (metanol, ácido acético, agua).

### 2.6. *GELES DE CROMATOGRAFIA:*

- CM- Sephadex C-50.
- Sephadex G-50.
- Sephadex G-75.

## 3. EQUIPOS

- Equipo para cromatografía en columna.
- Colector automático de Fracciones LKB-Pharmacia.
- Potenciómetro digital Orion Research.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV.
- Baño de temperatura Memmert.
- Equipo de electroforésis vertical en placa Techware.
- Fuente de poder para electroforésis Duostat Beckman.
- Balanza Analítica Ainsworth.
- Centrifuga Sorvall Instruments Modelo Easy Spin
- Microcentrifuga Denver Instrument.
- Cámara para inmunoelectroforésis Gelman Sciences.
- Liofilizador Labconco.
- Fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb.

## 4. MÉTODOS.

### 4.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

El contenido de proteínas en el veneno se determinó utilizando los siguientes métodos:

#### 4.1.1. Método de absorción de luz ultravioleta.

Se utilizó el método de Warburg y Christian (1941), midiendo la absorbancia de luz UV a 280nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV para cuantificar el contenido proteico de una solución del veneno crudo a 1mg/ml, así como de las fracciones colectadas en las cromatografías.

#### 4.1.2. Método de Lowry.

Se empleó el método descrito por Lowry y col (1951), el cual se fundamenta en la formación de una mezcla coloreada con el reactivo de Folin-Ciocalteu, la cual es cuantificada a 660 nm en un fotolorímetro Baush & Lomb provisto de un fototubo y filtro infrarrojo.

### 4.2. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA POR CROMATOGRAFÍA

Para obtener la enzima se utilizó el método de Mejia y col., 2006 con algunas variaciones.

Se tomó 100mg de veneno crudo liofilizado de *Lachesis muta* y se disolvieron en 2ml de bufer acetato de amonio 0.05M a pH 5,0 se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos para eliminar los residuos insolubles. El

sobrenadante fue aplicado en una columna cromatográfica de intercambio catiónico CM-Sephadex C-50 (45 x 1.2 cm), equilibrado en bufer acetato de amonio 0.05M a pH 5,0, colectándose fracciones de 3ml por tubo a razón de 7ml/h a temperatura ambiente y se determino la cantidad de proteína por absorbancia a 280nm. La elución de las proteínas retenidas se realizo con el mismo bufer conteniendo NaCl 0.3M y 0.6M respectivamente. Cada fracción fue analizada, en cuanto a su actividad enzimática (Fosfolipasa A<sub>2</sub>) y las fracciones con mayor actividad fueron reunidas y concentradas para una etapa siguiente de purificación.

La proteína activa obtenida fue aplicada a una columna de filtración Sephadex G-50 (45 x 1.2cm), equilibrado en bufer acetato de amonio 0.05M a pH 5,0 y colectándose fracciones de 1.5ml por tubo a razón de 7ml/h a temperatura ambiente. Se analizó cada fracción en su actividad enzimática reuniendo las fracciones con mayor actividad para su posterior caracterización.

#### 4.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>,

Se realizó por 2 métodos:

##### 4.3.1. Método de retardo de la coagulación de la yema de huevo (Vidal y Stoppani 1971).

Se determinó la actividad enzimática empleando como sustrato una emulsión de yema de huevo al 45% en bufer Tris-HCl 10mM con Ca<sub>2</sub>Cl 10mM a pH 7,6, al cual se le agregó 50 µl de la enzima para luego ser incubados a 37°C por 15 minutos. Seguidamente los tubos se colocaron en baño de agua a 100°C donde se evaluó el tiempo de retardo de la coagulación del sustrato con respecto a un blanco que no contenga la enzima, usando para ello una bagueta que se introducía a

determinados intervalos de tiempo en la emulsión hasta que se observara limpia, es decir sin presencia de grumos o coágulos.

La actividad específica fue calculada en base al tiempo de retardo de la coagulación de la lipoproteína de la yema de huevo por minuto y por miligramo de proteína.

#### *4.3.2. Método espectrofotométrico (De Oliveira y Palma, 1998)*

Para esta prueba se empleó una mezcla que contenía 15 $\mu$ M de fosfatidilcolina (comercial), 5 $\mu$ M de cloruro de calcio, 80nM de rojo de fenol, 20 $\mu$ M de Triton X-100 en bufer Tris-HCl 0.01M a pH 7,9. La mezcla se preincubó por 2 minutos con la enzima. Se evaluó el cambio en la densidad óptica de la mezcla a 558 nm. La actividad enzimática se obtuvo en el espectrofotómetro en base al cambio de color de rojo de fenol por miligramo de proteína.

### *4.4. PROPIEDADES DE LA ENZIMA*

#### *4.4.1. Evaluación de la Pureza y Peso Molecular*

Para la evaluación de la pureza de la proteína así como la determinación de su peso molecular, se realizó una electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 12% en condiciones reductoras (con 2 $\beta$ -mercaptoetanol) y no reductoras de acuerdo al método de Laemmli (1970). Para ello se empleó 20  $\mu$ g de la enzima purificada y como patrones de peso molecular: Lisozima (14 300 Da.), Inhibidor de tripsina de soya (21 500 Da.), Ovoalbúmina (45 000 Da.) y Albumina (66 000 Da.). La corrida electroforética se mantuvo a voltaje constante (100 voltios) durante 1 hora y media aproximadamente para luego ser coloreado con azul brillante de Coomassie 0.1% por 30 minutos y lavados con

solución decolorante (metanol 25: ácido acético 8: agua 67) hasta evidenciar las bandas de proteína. Adicionalmente la pureza también fue evaluada por inmunodifusión e inmunoelectroforesis en geles de agarosa al 1% sobre láminas portaobjetos.

#### 4.4.2. *Termoestabilidad*

Se colocaron alícuotas de 100  $\mu$ l de la enzima purificada en viales con tapa, para luego calentar las muestras a 100 °C durante un rango de tiempo de 2.5-30 minutos. Pasado el tiempo se colocaron en recipientes con hielo y se procedió a medir la actividad enzimática remanente.

#### 4.4.3. *Efecto de algunos Iones e Inhibidores Enzimáticos*

Se exploró el efecto de dos iones divalentes como son los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , bajo la forma de cloruros, a concentraciones finales en milimolares de 0.1, 1, 5 y 10 tanto independientemente como en conjunto. Para ello se incubaron con la enzima a 37°C por 10 minutos para luego ser agregados al sustrato y medir la actividad enzimática.

Se analizaron los efectos de inhibidores enzimáticos como PMSF, DTT, Iodoacetato, EDTA, TLCK, 2 $\beta$ -Mercaptoetanol, a concentraciones finales de 2.5, 5, 10 y 20 mM. Igualmente se evaluó el efecto de algunos aminoácidos como cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico y el péptido glutation a las mismas concentraciones anteriormente señaladas. Se preincubo cada inhibidor con la enzima a 37°C por 10 minutos y se midió la actividad enzimática por incorporación del sustrato al preincubado.

#### 4.5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA ENZIMA

##### 4.5.1. *Determinación de la Actividad Hemolítica*

Se determinó por el método de Condrea y col (1964), colectándose 10ml de sangre venosa humana, de donantes voluntarios con edad promedio de 23 años, en tubos conteniendo 1ml de citrato de sodio al 3.8% los cuales se centrifugaron a 1000 rpm x 15 minutos. Se retiró el plasma (sobrenadante) para la prueba de acción anticoagulante y el paquete de glóbulos rojos fue resuspendido y lavado tres veces con NaCl al 0.9% pH 7,3, descartándose cada vez el sobrenadante, para finalmente ser resuspendido en bufer isotónico (glicina 0.1M, NaCl al 0.9% pH 7,3)

##### *a) Actividad Hemolítica Directa*

Se preparó una mezcla que contenía: 0.8ml de bufer isotónico, 0.1ml de glóbulos rojos lavados (GRL) y 0.1ml de la enzima a diferentes concentraciones, la mezcla fue incubada a 37°C por 2 horas y la reacción se detuvo con 5ml de NaCl al 0.9% pH7.3 con EDTA 1mM fría para luego ser centrifugada a 1000 rpm por 5min y leer su absorbancia a 540nm. El grado de hemólisis total se expresa como porcentaje de hemoglobina contenida en 0.1ml de glóbulos rojos lavados (GRL) y hemolizados con 5.9ml de agua destilada (Condrea y col., 1964).

##### *b) Actividad Hemolítica Indirecta*

Se preparó una mezcla que contenía: 0.7 ml de bufer isotónico, 0.1ml de GRL, 0.1ml de fosfolípidos de yema de huevo al 6.4% y 0.1ml de la enzima a diferentes concentraciones. Se incubo a 37°C por 2 horas y se detuvo la reacción con 5ml de NaCl al 0.9% pH7.3

con EDTA 1mM fría para luego ser centrifugada a 1000 rpm por 5min y leer su absorbancia a 540nm. El grado de hemólisis total se expresa como porcentaje de hemoglobina contenida en 0.1ml de glóbulos rojos lavados (GRL) y hemolizados con 5.9ml de agua destilada (Condrea y col., 1964).

Se determino la Dosis Hemolítica media ( $DH_{50}$ ), la cual se define como la concentración de veneno en  $\mu\text{g/ml}$  que es capaz de lisar el 50% de los glóbulos rojos, bajo las condiciones experimentales empleadas (Castañon y col., 1993). Para ello se preparó una curva dosis-respuesta ( $\mu\text{g}$  de veneno en el eje de las abscisas (x) vs % de hemólisis en el eje de las ordenas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el % de hemólisis (World Health Organization., 1981).

#### *c) Actividad hemolítica Indirecta en placa*

Se preparó una solución de agar agar al 1.5% final en PBS a pH 7,4, GRL al 3%, yema de huevo al 5% y cloruro de calcio 10mM. La mezcla se mantuvo a  $45^{\circ}\text{C}$  para verterlo rápidamente y con cuidado a una placa petri estéril, luego de su gelificación se realizaron pocillos con ayuda de un sacabocados y se colocaron las muestras del veneno como de la enzima en concentraciones adecuadas para compararlas. Se hicieron observaciones a las 0, 12 y 24 para determinar la presencia de halo hemolítico los cuales fueron medidos en centímetros (Gutiérrez y col., 1988).

#### *4.5.2. Determinación de la Actividad Miotóxica*

La actividad miotóxica fue vista a través de la prueba de cuantificación de Creatina Kinasa (CK) sérica, la cual fue llevada a cabo usando el kit cinético de Chem. Sigma CK-UV. Se utilizaron grupos de 4 ratones albinos de 18-22g de peso los cuales fueron

inyectados (intramuscular) en el músculo gastrocnemius de la pata derecha con 0.1ml de la fosfolipasa A<sub>2</sub> a diferentes concentraciones, se uso como control negativo 0.1ml de bufer acetato de amonio 0.05 M pH5,0. Después de 2 horas los ratones fueron anestesiados con cloroformo e inmediatamente se colectaron 0.4ml de sangre, por punción cardiaca, y se mezclaron con 40 µl de citrato de sodio al 3.8%, se centrifugo por 10 minutos a 3000 rpm para separar el plasma. Para la mezcla de reacción se incubaron 25 µl de plasma citratado con 1ml de kit CK para luego medir el incremento de absorbancia a 340nm por 6 minutos.

La actividad fue expresada en IU/l, una unidad es la resultante de la fosforilación de 1µmol de creatina/min a 37°C (Gutiérrez y col., 1980).

Para la determinación de la Dosis Miotóxica Mínima (DMM) se preparó una curva dosis-respuesta por regresión lineal (µg de veneno en el eje de las abscisas (x) vs actividad de CK en plasma en el eje de las ordenas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para la actividad de CK. Se determinó la dosis de veneno en la que la actividad CK plasmática corresponde a 4 veces la actividad de CK del plasma de los ratones inyectados con solución salina, correspondiendo esta dosis a la DMM (World Health Organization., 1981).

#### 4.5.3. *Determinación de la Actividad Edemática*

Fue determinado por el método de Yamakawa y col., (1976). Grupos de 6 ratones (machos, 18-22g) fueron inyectados en el cojinete de la pata posterior derecha región subplantar con 0.05ml de fosfolipasa A<sub>2</sub> a diferentes concentraciones y en la pata posterior izquierda en la



misma zona se inyectó solución salina (control negativo). Después de 3 horas se sacrificó a los animales por dislocación cervical, se retiraron las patitas las cuales fueron pesadas comparándolas con su propio control negativo y evaluando la diferencia de pesos entre ellos.

La dosis edemática media DEM se expresa en  $\mu\text{g}$  de proteína capaz de producir una diferencia de peso entre el miembro tratado y no tratado, equivalente al 30%. Para ello se realizó una curva dosis-respuesta por regresión lineal ( $\mu\text{g}$  de veneno en el eje de las abscisas (x) vs % de la diferencia de peso producido en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el % de peso (World Health Organization., 1981).

#### 4.5.4. *Determinación de la Actividad Hemorrágica*

Se realizó según el Método de Kondo y col (1960), donde grupos de 6 ratones (machos, 18-22g) fueron inyectados intraperitonealmente con 0.1ml de la muestra, se observó a los animales anotando su comportamiento por 2 horas y luego fueron sacrificados por dislocación cervical. Con mucho cuidado se abrió y se retiró la piel tomando en cuenta el lado por donde se inculó la muestra, para determinar el área hemorrágica formada, si el daño en la piel es esférico se mide el diámetro de la lesión, si el daño presenta una forma irregular se mide el tamaño del área hemorrágica dibujándolo en papel milimetrado transparente y se obtiene el área de hemorragia, se determina el diámetro de la lesión hemorrágica mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Diámetro} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{área hemorrágica}}{\pi}}$$

La actividad hemorrágica se expresa como la dosis hemorrágica mínima (DHM), definida como la menor cantidad de veneno o enzima que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro, para ello se prepara una curva dosis-respuesta ( $\mu\text{g}$  de veneno en el eje de las abscisas (x) vs mm diámetro de lesión hemorrágica, en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el diámetro de la lesión

#### 4.5.5. *Determinación de la Actividad Anticoagulante*

Se determinó por el método descrito por Yarlequé y col. (1989). La mezcla de reacción contenía 0.2ml de plasma humano y 0.1ml de la enzima en tubos de 10 x 75, se incubaron a 37°C por 5 minutos para luego agregarles 0.1ml de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  25mM midiéndose el tiempo de recalcificación.

La actividad anticoagulante se determinó por el retardo en la coagulación o la incoagulabilidad del plasma con respecto al tiempo de coagulación del blanco es decir al tiempo de recalcificación.

#### 4.6. *PRUEBAS INMUNOLÓGICAS Y DE NEUTRALIZACIÓN.*

##### 4.6.1. *Inmunodifusión directa (IDD)*

La prueba se llevó a cabo sobre geles de agarosa al 1% en bufer fosfato salino (PBS) 0.15M a pH 7,0. La agarosa fue disuelta en PBS, luego fue extendida en laminas portaobjetos, dejándose enfriar por 10 minutos para posteriormente, realizar tres pocillos equidistantes con la ayuda de un sacabocado de 5mm. Se colocó en el pocillo central 10 $\mu\text{l}$  de la enzima purificada y en los laterales, los sueros antilachesicos vigente y expirado respectivamente. La difusión se realizó en cámara

húmeda por 48 horas a temperatura ambiente y luego las láminas fueron lavadas con citrato trisodico al 5% por 10 minutos una vez, con NaCl al 0.9% dos veces y agua destilada tres veces. Las laminas se secaron en una estufa a 37°C por 24 horas y luego fueron teñidas con azul brillante de Coomassie al 0.1% por 5 minutos para finalmente ser decolorado con la solución decolorante usada en la electroforésis en geles de poliacrilamida (Ouchterlony y Nilsson., 1967). Paralelamente también se hicieron pruebas con láminas conteniendo veneno crudo y los antiveneno lachésicos.

#### 4.6.2. *Inmunoelectroforésis (IEF)*

Se realizaron experimentos con la finalidad de analizar las reacciones antígeno-anticuerpo entre el veneno crudo de *L. muta* y la enzima purificada con el antiveneno vigente. Estas fueron preparadas en láminas cubiertas con agarosa al 1% en forma similar a la realizada para inmunodifusión. Se hicieron orificios de 1 x 4 mm en la agarosa gelificada a ambos lados de una canaleta central de 1 x 56 mm, se realiza la IEF en cubetas adecuadas en bufer glicina 0.05M pH 8,3. Se aplicó una corriente de 4 mA/lámina durante una hora determinando la posición de la marca azul de bromofenol en las muestras sirviendo como indicador de corrida. Terminada la corrida, se removió el gel de la canaleta central y se aplicó el suero antilachésico; las láminas se colocaron en un recipiente húmedo a temperatura ambiente y estéril por 48h hasta visualizar los arcos de precipitación. La tinción y el secado se realizaron en condiciones similares a la inmunodifusion (Ouchterlony y Nilsson., 1967).

#### 4.6.3. *Ensayo de neutralización para la actividad enzimática con suero antilachésico*

Para estas pruebas se utilizaron mezclas que contenían 50µl de la enzima en estudio con diferentes volúmenes de suero antilachésico monovalente (25, 50 y 75µl) diluído 1/100 en solución salina fisiológica, las mezclas fueron preincubadas a 37°C por 30 minutos. Estas concentraciones fueron equivalentes a ½, 1 y 2 dosis neutralizantes del antiveneno. Se cogieron alicuotas de 50µl, procediéndose a probar la actividad de fosfolipasa.

Las cantidades de antiveneno neutralizante fueron elegidas en base a la indicación de la ampolla que señala que 10ml de dicho suero neutralizan 24mg de veneno lachésico.

#### 4.6.4. *Ensayo de neutralización para la actividad hemolítica con suero antilachésico*

Se preparó una solución de agar al 1.5% final en PBS a pH 7.4, glóbulos rojos lavados al 3%, yema de huevo al 5% y cloruro de calcio 10mM se mantuvo a 45°C para verterlo rápidamente y con cuidado a una placa petri estéril. Luego de su gelificación se realizaron pocillos con ayuda de un sacabocado y se colocaron las muestras del antiveneno y la enzima preincubadas a 37°C por 30 minutos a concentraciones equivalentes a ½, 1 y 2 dosis, se evaluó a las 12 y 24 horas observándose el grado de neutralización por la reducción del halo de hemólisis.

## RESULTADOS

### 1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinó por el método de UV a 280 nm de absorbancia, la cantidad de proteína a 1 mg/ml del veneno de *L. muta* contiene 1.221 mg/ml de proteína. Mientras que por el método de Lowry, se calculó que 1mg de veneno contiene 0.994 mg de proteína.

### 2. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA POR CROMATOGRAFÍA

El veneno crudo de *Lachesis muta* fue separado en un primer paso en una columna de intercambio iónico, de CM-Sephadex C-50, presentando 4 picos de proteína eluidos directamente con el bufer de corrida, lo que representa en conjunto el 42.4% del total de la proteína colocada. Se obtuvieron adicionalmente 3 picos al eluir el bufer conteniendo NaCl al 0.3M representando este el 42.6% y finalmente al colocar bufer conteniendo NaCl al 0.6M se evidenciaron 2 picos correspondiendo al 15%. Se encontró la mayor actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> en la caída del tercer pico, que eluyo isocráticamente, la cual representa el 2.07% del total de proteína. Esto evidencia la naturaleza ácida de la FLA<sub>2</sub> (Figura N°1).

Al realizar el segundo paso cromatográfico empleando una columna de exclusión molecular, de Sephadex G-50, se logró resolver 2 picos tal como se muestra en la figura 2 encontrándose la enzima en el primer pico, coincidiendo el pico de proteína con la máxima actividad de fosfolipasa.

Por tanto, la fosfolipasa A<sub>2</sub> de *Lachesis muta* representa el 0.62% del total de proteína, con un rendimiento del 34.1% y una purificación de 55.3 veces (Tabla N°1).

### 3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>

La evaluación de la actividad por ambos métodos: el retardo en la coagulación de la emulsión lipoproteica y el espectrofotométrico, dieron como resultado que este último es 1.2 veces más sensible ya que usando el método espectrofotométrico se obtuvo 103.56 Unidades de actividad y con el retardo de coagulación 86.3 Unidades de actividad al emplear 1mg de proteína.

### 4. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LA ENZIMA

#### *4.1. EVALUACIÓN DE LA PUREZA Y PESO MOLECULAR*

El peso molecular de la enzima, se determinó bajo condiciones reductoras y no reductoras, se observó en ambos casos que la enzima mostró una sola banda homogénea con un peso molecular calculado de 18 749 Daltons (Figura N°4). Así mismo, la persistencia de la única banda luego del tratamiento con 2β-mercaptoetanol nos indica que la proteína es monomérica como se observa en la figura 3.

#### *4.2. TERMOESTABILIDAD*

La enzima mostró mantener su efecto catalítico total al ser calentada a 100°C por 10 minutos. Esta termoresistencia decae con el tiempo llegando a inhibirse hasta un 38% al mantenerse por 30 minutos a 100°C (Tabla N°2).

#### *4.3. EFECTO DE ALGUNOS IONES E INHIBIDORES ENZIMÁTICOS*

Se observa en la tabla 3 que el ion calcio incrementa la acción catalítica de la fosfolipasa A<sub>2</sub> mejor que el magnesio. Además las concentraciones de magnesio requeridas para activar a la enzima en valores semejantes al calcio son hasta 10 veces, al preincubar ambos iones con la enzima se observa que

el rendimiento de la actividad no es favorecida llegando hacia valores inhibitorios de 40.6%.

En la tabla 4 se muestra el efecto de algunos agentes sobre la actividad de la enzima se puede observar que de los agentes probados el EDTA y el PMSF mostraron tener un efecto inhibitorio mayor aunque no total a concentraciones altas. Tanto el EDTA y el PMSF logran reducir hasta casi la mitad de la actividad enzimática empleando una concentración de relativamente baja de 5mM, para que los otros agentes logren un efecto similar es necesario el incremento de su concentración.

Por otro lado las pruebas con los aminoácidos y el glutatión dieron como resultado que este ultimo inhibe en mayor grado la actividad de la enzima seguido por la cisteína sin diferir mucho de los otros aminoácidos que presentan inhibición parcial al emplearse concentraciones altas (Tabla N°4).

## 5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA ENZIMA

### 5.1. PRESENCIA DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

De acuerdo con las pruebas realizadas de actividad hemolítica directa la enzima no mostró tener tal efecto sobre los glóbulos rojos humanos, pero si se observó actividad hemolítica indirecta por la prueba en tubo determinándose una Dosis Hemolítica media ( $DH_{50}$ ) de 4.35  $\mu\text{g}$  para la fosfolipasa  $A_2$  y de 67.6  $\mu\text{g}$  para el veneno total de *Lachesis muta*, siendo la enzima 15.5 veces mas hemolítica que el veneno total (Figura N°5).

La figura 6 nos muestra que empleando la  $DH_{50}$  del veneno y de la fosfolipasa purificadas se forma un halo hemolítico de 2.4 cm a las 24horas, siendo iguales para ambas muestras.

### 5.2. ACTIVIDAD MIOTÓXICA

Se determino la Dosis Miotóxica Mínima (DMM) del veneno correspondiente a una concentración de 144,21  $\mu\text{g/ml}$  y para la fosfolipasa A<sub>2</sub> en un valor de 125.89  $\mu\text{g/ml}$  lo que se considera como una baja o pobre acción miotóxica de FLA<sub>2</sub>. (Figura N°7).

### 5.3. ACTIVIDAD EDEMÁTICA

La fosfolipasa produjo un pequeño edema en la almohadilla plantar de los ratones albinos, siendo también pequeña la variación del peso, ya que se alcanzo solo un 14.82% al emplear 45  $\mu\text{g}$  de la enzima. La Dosis Edemática Mínima (DEM) obtenida por regresión lineal fue de 91.5  $\mu\text{g}$  (Figuran N°8).

### 5.4. ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

La foafolipasa A<sub>2</sub> de *Lachesis muta* no mostró tener actividad hemorrágica a las concentraciones de 5, 15 y 30  $\mu\text{g}$ , al inocularse en piel de ratones albinos.

### 5.5. ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE

La fosfolipasa fue capaz de retardar el tiempo de coagulación del plasma humano como se muestra en la figura 9. Este retardo esta en función de la cantidad de enzima utilizada aunque no se observa una relación aritmética ni logarítmica.



## 6. PRUEBAS INMUNOLÓGICAS, DE NEUTRALIZACIÓN Y ANTIGENICIDAD

### 6.1. INMUNODIFUSIÓN DIRECTA (IDD)

Las pruebas de inmunodifusión demostraron un reconocimiento tanto del veneno total de *L. muta*, así como de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por parte de los sueros antilachésicos monovalentes a diferentes dosis, observándose un solo arco de precipitación para la FLA<sub>2</sub> purificada y varios arcos para el veneno total (Figura N°10A y10B).

### 6.2. INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

Se observa en la figura 10C que tanto el veneno como la enzima son reconocidos por el suero antilachésico observándose en el primer caso varios arcos de precipitación y en el segundo caso sólo un arco lo que evidencia la pureza de la enzima.

### 6.3. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El suero expirado disminuye la acción enzimática de la fosfolipasa A<sub>2</sub> purificada hasta un 58,3% empleando 2 dosis del antiveneno, en el caso del suero vigente se logro una actividad residual de un 76% con la mayor dosis. (Figura N°11)

### 6.4. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

En la figura 12 se observa que empleando la máxima dosis se logra que el suero expirado reduzca la acción hemolítica de la FLA<sub>2</sub> purificada hasta un 62.5%, a la misma dosis el suero vigente logra disminuir la hemólisis hasta 79.2%.

## DISCUSIÓN

### 1. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA POR CROMATOGRAFÍA Y DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

La purificación y estudio de la fosfolipasa A<sub>2</sub> a partir de venenos de serpientes peruanas han sido realizados en el laboratorio de Biología molecular de la Facultad de Ciencia Biológicas de la UNMSM debido a su importancia en el envenenamiento ofídico por ello Woll P., en 1976, intento purificar la FLA<sub>2</sub> del veneno de *L. muta* a través de precipitación isoelectrica a pH 4.5 y tratamiento térmico a 100°C, obteniendo una purificación baja de 3 veces. Zevallos J., en 1996 obtuvo la enzima a partir del veneno de *Bothros brazili* en tanto que Carcasi R., en 1996 la purificó del veneno de la serpiente arborícola *B. biliniatus*. Mejia J., en 1994 logró obtener una purificación parcial de una fosfolipasa de *L. muta* con un peso de 19 054 Da. Pantigoso C., en el 2000 estudio las características de una FLA<sub>2</sub> miotóxica de la ponzoña de *B. brazili*. Un aspecto que merece resaltar es que es posible encontrar mas de una fosfolipasa en el veneno de una especie reportándose hasta mas de 9 isoformas como en el caso de *P. australis* (Takasaki. y col, 1990).

En el presente trabajo se ha logrado optimizar la técnica de purificación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de *Lachesis muta* a través de dos pasos cromatográficos. Primero, por una cromatografía de intercambio catiónico CM-Sephadex C-50 a pH 5,0; en este sistema el hecho que la proteína se obtenga en la caída del tercer pico sin necesidad de gradiente, nos indicaría un comportamiento ácido de la enzima a este pH, rechazando los grupos carboximetil del gel cargados negativamente, lo que señalaría que el pI de esta fosfolipasa es menor a 5 (Figura N°1). Por lo tanto se trataría de una proteína de naturaleza notablemente ácida, el trabajo previo realizado por Mejia en 1994 obtuvo una fosfolipasa con propiedades semejantes partiendo del veneno cristalizado del veneno de *L. muta* procedente de Pucallpa, a diferencia del presente trabajo que se realizó con veneno liofilizado del veneno de *L. muta* de

Satipo, por lo que es probable que se trate de una isoforma. Se han reportado, en trabajos realizados sobre veneno de *L. muta* de Brasil, empleando un primer paso cromatográfico de filtración molecular donde obtuvieron un pico con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> y al ser pasado este pool por una cromatografía de alta performance como el HPLC se pudieron identificar 2 isoformas de fosfolipasas las cuales presentaron puntos isoeléctricos de 4,7 y 5,4 respectivamente (Fuly y col., 2002). Usando modelos de inhibición producidos por inhibidores de fosfolipasa A<sub>2</sub> aislados de plasmas de otras serpientes, revelaron la presencia de cinco isoformas de FLA<sub>2</sub> en *L. muta*, correspondiendo a cuatro fosfolipasas ácidas y una básica (Fortes-Díaz y col., 1999). Por otro lado Damico y col (2005) reportaron 2 fosfolipasas con pI muy cercanos en el rango alcalino: 8,6 y 8,7 respectivamente. Estos datos nos conlleva a pensar si esta enzima purificada podría ser una isoforma de la reportada por Mejía (1994), esta duda se puede aclarar con los siguientes análisis bioquímicos como biológicos.

El segundo paso por cromatografía de filtración Sephadex G-50, nos muestra que la proteína se obtiene en el primer pico coincidiendo con la máxima actividad, lo que nos sugiere que es la única proteína presente en el pico y con un peso molecular relativamente bajo, lo que posteriormente se ha corroborado usando la técnica electroforética (Figura N°2).

En otros procesos de purificación, se ha logrado obtener la enzima en un solo paso como es el caso de Soares y col. (1998), quienes emplearon un intercambiador iónico para purificar una fosfolipasa con acción miotóxica denominada MTX de *B. moojeni*, Toyoma y col. (1995) mediante un HLPC obtuvieron la fosfolipasa de *B. pirajai*; empleando combinación de cromatografías de filtración, intercambio iónico y HPLC en condiciones normales o en fase reversa (RP-HPLC). De esta manera se pudieron purificar las fosfolipasas *Bothrops atrox* de Colombia (Nuñez y col., 2004) y *Crotalus viridis viridis* (Ownby y col., 1997). En el veneno de *Lachesis muta muta* de Brasil se han purificado hasta la fecha 4 isoformas de fosfolipasas, 2 ácidas por Fuly y

col. (2002) empleando Sephacryl S-200 y RP-HPLC y 2 básicas por Damico y col. (2005) usando Superdex-75 seguido de un RP-HPLC. Así mismo se conoce que se han purificado 6 isoformas de fosfolipasas de *Notechis sculatus*, 10 isoformas de *Pseudechis australis* (Takasaki y col., 1990) entre los más importantes.

Las nuevas metodologías y sus combinaciones permiten una mejor purificación de estas enzimas que son las que han alcanzado el mayor grado de evolución dentro de todas las proteínas de venenos de serpientes (Ogawa y col., 1996; Chijiwa y col., 2003). Por ello el procedimiento cromatográfico descrito para el aislamiento de esta enzima es adecuado, lo cual también se evidencia en su alta purificación 55.3 veces y su alta actividad específica 86.3 (Tabla N°1).

Por otro lado, al evaluar la pureza de la fosfolipasa por PAGE-SDS al 12%, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, se encontró una banda homogénea de proteína para ambos casos confirmando la idoneidad del método empleado para la purificación. Así mismo la movilidad electroforética en ambas condiciones fue igual indicándonos que la proteína es monomérica con un peso molecular de 18 749 Da (Figura N°3y4), considerándose una proteína de mediano peso molecular dentro de las fosfolipasas de otros venenos cuyos pesos varían entre 11 000 y 31 000 Da (Iwanaga y Suzuki, 1979). Algunos ejemplos de otras fosfolipasas A<sub>2</sub> la de *Bothrops asper* de 14000 y 16000 Da (Gutierrez y col., 1986; Kaiser y col., 1990), *Bothrops alternatus* 15000 Da (Nisembum y col., 1986), *Pseudechis australis* con pesos que van desde 12968-13298Da (Takasaki y col., 1990), *Crotalus adamanteus* de 29500-29900 Da (Wells y Hanahan., 1969), *Ophiophagus hanna* 13000 Da (Min-Zhou y col., 1993), y los casos mas cercanos las fosfolipasas de *L. muta* de Brasil reportada por Fuly y col (2002) con un peso molecular de 18000 Da y la reportada por Damico y col (2005) de 14245 y 14186 Da.

## 2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

### *ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>*

Para la evaluación bioquímica como el de la termoestabilidad y el efecto de iones e inhibidores enzimáticos, primero teníamos que asegurarnos que el método por el cual se evaluara fuera el adecuado, ya que uno de los problemas para la medición de la actividad enzimática es que la proteína es lipolítica siendo su medio de reacción hidrofóbico, por ello se compararon dos métodos para la determinación de la actividad de fosfolipasa, la técnica descrita por Vidal y Stoppani (1971) que mide el retardo en la coagulación de la yema de huevo por acción de la enzima, y la De Oliveira y Palma (1998) que evalúa el cambio en la densidad óptica de la mezcla a 558 nm empleando un espectrofotómetro siendo esta variación muy sensible por la liberación de los ácidos grasos con lo que varía también el pH del medio. La comparación de ambos métodos permitió establecer que la técnica espectrofotométrica resultó ser 1.2 veces más sensible, lo cual no es una diferencia muy alta pues se trabajó con una proteína purificada con buena actividad enzimática y no con venenos crudos (Lazo y col., 1998).

La técnica de coagulación de yema de huevo es más sencilla y no requiere de equipos sofisticados a diferencia de la espectrofotométrica, la que a su vez es más sensible pudiendo usarse esta técnica en venenos que contengan fosfolipasas con efecto catalítico bajo, como es el caso de *M. surinamensis* (Lazo y col., 1998). Ya que la diferencia no es mayor se decidió trabajar con el método de Vidal y Stoppani (1971) es decir el de la coagulación de la yema de huevo, además que este no se ve afectado por la variación del pH que pudiera sufrir la enzima por efecto de los iones o de los inhibidores a diferencia del otro método el cual nos podría dar falsos positivos

## TERMOESTABILIDAD

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> de venenos de serpientes en su mayoría presentan como mínimo 7 puentes disulfuros lo que le confiere una estructura estable a las altas temperaturas. Como se evidenció la enzima no pierde su actividad al ser sometida por 10 minutos a 100°C a pH 7.6, disminuyendo solo después de este tiempo llegando a tener una inhibición de 38% después de haber estado por 30 minutos a 100°C (Tabla N°2). Esta estabilidad también se ha reportado en para las fosfolipasas de *Naja naja* y *Naja naja atra* que mantienen su actividad a 90°C por 15 minutos (Chiang y col., 1973), la enzima de *Crotalus atrox* mantiene su actividad 80°C por 30 minutos (Wu y Tinker., 1969).

Es característico de estas enzimas el mantener su estructura por medio de enlaces disulfuros presentando en su estructura lineal entre 12-16 cisteínas tales como *Bothrops jararacussu* (Cintra y col., 1993), *Bothrops moojeni* (Soares y col., 1998, 2003), *Bothrops asper* (Kaiser y col., 1990, Lizano y col., 2001), *Lachesis muta* (Damico y col., 2005). Esta estabilidad estaría atribuída a la adaptación de la estructura proteica para que la enzima permanezca activa a los cambios de temperatura especialmente en aquellas serpientes que habitan zonas tropicales como es el caso de *L. muta* que vive en la selva amazónica o el de la cobra *Ophiophagus hannah* (Minh-Zhou y col., 1993) que habita en la zona desértica de la india con temperaturas mayores a 50°C en el día; en el caso de *Laticauda semifasciata* que es una serpiente acuática, la estabilidad de su enzima esta relacionada con las bajas temperaturas de su ambiente (Tu y col., 1970).

Debido a la gran estabilidad térmica que posee la fosfolipasa desde hace años es que se usó como un procedimiento para inactivar proteínas presentes en el veneno total, lo cual no es recomendable para estudios de efectos biológicos ni bioquímicos ya que, existen otra enzimas que también pueden ser estables a altas temperaturas como es el caso de la enzima similar a trombina que luego de estar a 100°C mantiene su actividad hasta un 60% (Yarleque., 1989), la proteinasa I que incrementa su acción a 45°C (Rodríguez., y Yarleque., 1990) y

fibrinogenasa que permanece estable hasta los 60°C por 15 minutos (Escobar., 1992), todas ella enzimas del veneno de *L. muta* del Perú.

### *EFECTO DE ALGUNOS IONES E INHIBIDORES ENZIMÁTICOS*

Se propone que el ion tendría la capacidad de modificar la conformación estructural tri dimensional de la enzima de manera que incrementaría o disminuiría su acción enzimática. Se ha observado que tanto el ion calcio como magnesio favorecen la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por ello se evaluó estos iones a diferentes concentraciones y a su vez probándolos en conjunto. Se aprecia que el ion calcio es un mejor activador que el magnesio ya que logra incrementar la actividad de la FLA<sub>2</sub> de *L. muta* a concentraciones menores que el magnesio (Tabla N°3), al igual que en las fosfolipasas de *Bothrops neuwidii* y *Laticauda semifasciata* (Tu y col., 1970), cuando se evaluaron los iones se ve que se requiere de mayor concentración del ion magnesio para que ambos puedan tener un efecto activador sobre la enzima, pero si en cambio se aumenta la concentración del ion magnesio y se mantiene estable la del calcio se observa un efecto casi inhibitorio de la enzima, lo que nos indicaría que se requiere de una mayor concentración del ion magnesio para lograr activar a la enzima como lo haría el ion calcio a bajas concentraciones. Estos datos son contrarios a los encontrados por Mejia (1994) donde se señala que el magnesio es un mejor activador que el calcio lo que merece ampliar los estudios para determinar claramente el rol que juegan tales iones.

Como se ha mostrado en la tabla 4, el EDTA es el mayor inhibidor de la actividad enzimática debido a que este es un agente quelante que atrapa todos los cationes divalentes presentes en el medio, dejando a la enzima sin su activador. Esto permite afirmar que la enzima requiere de calcio para potenciar su actividad.

Por otro lado el PMSF, fosforila los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina, presente en el sitio activo y en este caso PMSF mostró tener un marcado efecto

sobre la fosfolipasa, lo que sugeriría la presencia de este aminoácido como parte fundamental de la estructura catalítica. El TLCK, que actúa sobre las histidinas o cisteínas de los sitios activos también evidenció un efecto inhibitorio moderado, esto se debería a que las fosfolipasas presentan histidina en el residuo 48 que también está involucrado con el sitio activo de la enzima. Por otra parte el iodoacetato es un agente alquilante que reacciona con los grupos sulfhidrilos de los restos de cisteína presentes en el centro activo de ciertas enzimas, no mostrando en este caso tener un efecto inhibitorio significativo.

Es también interesante señalar el hecho de que el mercaptoetanol, el cual es capaz de escindir los enlaces disulfuros de la enzima solo logre inhibirla hasta un 41 % empleando altas concentraciones del agente, lo que nos sugiere que la enzima presenta un gran número de cisteínas en su estructura permitiéndole mantener su estabilidad y acción catalítica a pesar de la presencia del agente.

Algo similar ocurre con el DTT el cual es un agente que rompe también los puentes disulfuros y que para el caso de esta enzima no afecta su actividad catalítica.

Por otro lado, la acción del glutatión que es un tripeptido el cual podría estar involucrado en la escisión de puentes disulfuros debido a la presencia de cisteínas, afecta la actividad enzimática. Un efecto similar tiene el aminoácido cisteína el cual logra inhibir a la enzima en 68.4% de su actividad; ambos, glutatión y cisteína, modificarían la estructura conformacional de la enzima ya sea por ruptura de puentes disulfuros como es el caso del glutatión o por la formación de nuevos puentes por encontrarse cisteína libre en el medio. Sin embargo son necesarios estudios cinéticos más profundos para determinar el modo probable de acción de los agentes mencionados.

Así mismo, debemos resaltar el hecho que los ácidos aspártico y glutámico logran inhibir a la enzima a altas concentraciones, por lo que se sospecha que el mecanismo de acción comprendería la atracción del calcio ligado a la enzima por tales aminoácidos ácidos, causando con ello un descenso en la afinidad FLA<sub>2</sub>-fosfolípidos. Dicho de otra manera, los aminoácidos ácidos como



aspártico y glutámico actuarían inhibiendo indirectamente a la enzima a través de la captura del calcio.

### 3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

#### *ACTIVIDAD HEMOLÍTICA*

La fosfolipasa A<sub>2</sub> de *L. muta* descrita en el presente trabajo no muestra acción hemolítica directa sobre eritrocitos humanos y para ello requiere de la presencia de fosfolípidos libres o lipoproteínas, la acción se debe a que la enzima hidroliza previamente los fosfolípidos libres, liberando lisolecitina la que a su vez por acción detergente es capaz de inducir hemólisis. Solo algunas fosfolipasas como la de *Echis carinatus* muestran actividad hemolítica directa (Kemparaju y col., 1994). Otro caso es el de *Agkistrodom halys blomhoffii* que puede hidrolizar los fosfolípidos de la membrana de eritrocitos causando su hemólisis aún sin la presencia de un componente denominado factor lítico directo, FLD (Martin y col., 1975). En otras fosfolipasas como las de *Crotalus durissus terrificus* y *Crotalus adamanteus* requieren desoxicolato, el cual al parecer podría remplazar al FLD (Hendon y Fraenkel-Conrat., 1971).

Aunque todavía no se conoce el mecanismo exacto de la hemólisis es lógico pensar que la función principal del FLD y otros componentes básicos es desorganizar la matriz de la membrana de los eritrocitos de manera que la fosfolipasa A del veneno pueda atacar la fosfatidilcolina con mayor eficacia. Una explicación acerca de la hemólisis producida por fosfolipasas de venenos de serpientes, es la cooperación existente entre los componentes del veneno que separadamente tienen una baja eficiencia, pero que juntos pueden actuar sinérgicamente potenciando la actividad (Condrea, 1970). Así mismo los datos de la figura 5 y 6 señalan que la FLA<sub>2</sub> de *L. muta* si posee acción hemolítica indirecta la cual, como ya se ha mencionado, depende de la previa hidrólisis de fosfolípidos libres para convertirlo en lisolecitina de dicho detergente. Esta

hemólisis indirecta por parte de la FLA<sub>2</sub> resulta ser 15.5 veces mayor al encontrado en el veneno crudo, donde se observa una DH<sub>50</sub> de 67.6 µg siendo este valor un poco mayor al encontrado por Castañon y col, (1993) donde encontraron un DH<sub>50</sub> de 48.7 µg usando veneno cristalizado de *L. muta* procedente de Amazonas.

### *ACTIVIDAD MIOTÓXICA*

Se ha encontrado que todas las miotóxicas aisladas del venenos del genero *Bothrops* son proteínas básicas, se ha analizado la estructura primaria de estas miotóxicas mostrando que este grupo puede ser subdividido en 2 subclases: las fosfolipasas D-49 las cuales poseen un ácido aspártico en la posición 49 y tienen actividad de fosfolipasa, y las fosfolipasas K-49 las cuales tienen un residuo de lisina en la posición 49 y carecen de actividad enzimática (Ownby y col., 1999). La presencia de ácido aspártico es crucial para fijar Ca<sup>2+</sup> el cual es necesario para la actividad enzimática. Algunos estudios evolutivos sugieren que las fosfolipasas K-49 surgieron de la duplicación de un gen ancestral. LA DMM de la FLA<sub>2</sub> reportada en este trabajo mostró ser muy similar a la del veneno crudo (Figura N°7), es decir presenta una baja acción miotóxica, lo que indica que la FLA<sub>2</sub> aislada no es una miotoxina y que de acuerdo con la regla general debería contener aspartato en la posición 49.

### *ACTIVIDAD EDEMÁTICA*

La formación de edema se define como el incremento en la permeabilidad microvascular que conduce a una extravasación de fluidos y su acumulación en los espacios intersticiales de los tejidos, el veneno causa la exocitosis y degranulación de mastocitos del mesenterio con la liberación de gránulos, liberando histaminas los cuales pueden ser responsables del edema, esta liberación de histaminas es estimulada por las fosfolipasas, esta acción ha sido

correlacionada con su capacidad para hidrolizar fosfolípidos (Chem y col., 1984). Sin embargo muy pocos estudios se han realizado para determinar la naturaleza exacta del mecanismo del edema causado por fosfolipasas, a pesar de haber sido encontrado en fluidos inflamatorios. A pesar de ello se ha podido determinar la dosis edemática mínima (DEM), de *Lachesis muta stenophrys* y *Crotalus durissus durissus* de América Central en 5µg y 11µg respectivamente (Lomonte., 1985), para *B. asper* la DEM es de 38µg (Lomonte y Gutierrez., 1989). En nuestro caso la DEM para fosfolipasa de *L. muta* es de 91.5 µg (Figura N°8), lo que significa que el edema producido por esta enzima es mucho menos intensa que el de las otras serpientes. Esta observación sugiere que el efecto edematizante del veneno crudo de *L. muta* no depende ni esta relacionado con esta enzima y que algún otro mecanismo generado por otra enzima, sería responsable de este proceso biológico.

#### *ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE*

Según los estudio de Boffa y col., 1982, hay buenas razones para admitir que el efecto anticoagulante resulta de la formación de un complejo hidrolítico preferencial entre las fosfolipasas anticoagulantes y la fosfatidilserina de las membranas de las plaquetas, encontrando además que las fosfolipasas con acción anticoagulante son predominantemente básicas aunque algunas de estas carecían de acción enzimática, así se encontró que las fosfolipasa alcalinas de *Echis carinatus*, *Vipera verus orientale*, *Naja nigricollis* y *Vipera russelli* son anticoagulantes (Kemparaju y col., 1994; Boffa y Boffa., 1976; Condrea y col., 1981; Teng y col., 1984).

Sin embargo la rápida evolución de estas enzimas ha mostrado en los últimos años que todas las fosfolipasas que ejercen un retardo en la coagulación del plasma citratado y recalificado muestran tener buena actividad de fosfolipasa asumiéndose que es la capacidad de hidrolizar ciertos fosfolípidos, que participan en el proceso de coagulación sanguínea, lo que les confiere un efecto

anticoagulante. Tal es el caso de las fosfolipasas aisladas de *B. atrox* y *B. asper* que presentan acción anticoagulante y a su vez son miotóxicas (Prado-Franceschi y col., 1998).

La acción anticoagulante verificada en animales de experimentación o en víctimas humanas de accidentes esta asociada entre, otras proteínas a la FLA<sub>2</sub> de este veneno (Stocker., 1982; Yarlequé., 1989).

Como ya se ha mencionado la FLA<sub>2</sub> de *L. muta* posee acción anticoagulante ya que alarga el tiempo de recalcificación del plasma (Figura N°9), probablemente por hidrólisis de fosfolípidos, indispensable para que funcione la cascada de coagulación por la vía intrínseca a diferencia de la fosfolipasa aislada por Mejia (1994) donde no evidencia esta acción biológica, lo que nos da más sustento para creer en la existencia de más de una fosfolipasa A<sub>2</sub> presente en el veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*.

#### 4. INMUNOGENICIDAD Y NEUTRALIZACIÓN.

Las pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforésis mostraron que la fosfolipasa forma un arco de proteína al ser enfrentado con los sueros antilachésicos monovalentes tanto vigente y expirado, mientras que el veneno crudo formó varios arcos de precipitación. Adicionalmente el único arco obtenido en la inmunoelectroforésis a pH 8,3 para la FLA<sub>2</sub> purificada nos ratifica que está pura (Figura N°10).

Experimentos con suero anticrotalico muestran la cercana relación entre la actividad antifosfolipásica y la potencia neutralizante, considerando que en el caso de *C. durissus terrificus*, la crotovina (fosfolipasa A<sub>2</sub> y la crotapotina) representa el 68% del veneno crudo, por lo que al neutralizar al mayor componente del veneno, la crotovina, se estaría neutralizando la letalidad del veneno (Da Silva y Guiherme., 1982). La actividad hemolítica directa esta relacionada a la fosfolipasa A<sub>2</sub>, una enzima implicada en la patogénesis de varios

efectos tóxicos, por ello se iniciaron estudios sobre su neutralización siendo aún pocos, Gene y col., en 1987, encontraron ED<sub>50</sub> (dosis efectiva media) un rango de neutralización de 332 a 716µl antiveneno /mg de veneno para los venenos de *B. asper*, *B. schlegelii* y *B. godmani*.

Los antivenenos son tradicionalmente evaluados mediante su capacidad de neutralizar la actividad letal (WHO., 1981); existe la necesidad de desarrollar pruebas alternativas para probar la potencia del antiveneno mediante ensayos *in vitro*, como la hemaglutinación pasiva (Khupulsup y col., 1981), ELISA (Theakston y Reid., 1979) y la neutralización de la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (Da Silva y Bier., 1982). Habermann y Hardt (1972) desarrollaron una técnica para cuantificar la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, basada en la formación de halos hemolíticos en geles de agar conteniendo eritrocitos y fosfolípidos de yema de huevo; Gutierrez y col., en 1988 emplearon esta técnica para probar la potencia de antivenenos polivalentes sobre el veneno de *B. asper*, encontrando una correlación con alta significancia entre esta prueba y la basada en la neutralización de la letalidad, sugiriendo que esta prueba, muy simple y sensible, puede ser empleada para la medición de la neutralización.

El hecho de obtener reactividad inmunológica, indica claramente que la FLA<sub>2</sub> a pesar de encontrarse entre las proteínas más pequeñas del veneno puede inducir anticuerpos neutralizantes lo que resulta muy importante para neutralizar esta proteína y sus consecuentes acciones con la aplicación del antiveneno monovalente. También es interesante señalar que el antiveneno reduce la actividad enzimática de FLA<sub>2</sub> presente en el veneno crudo luego de preincubar mezclas de veneno-antiveneno. Aún cuando los datos mostrados en la figura 11 y 12 señalan una aparente eficiencia del antiveneno expirado con respecto al vigente, es importante remarcar que ambos antivenenos aún a 2 dosis no inhiben totalmente a la enzima en estudio. De manera que midiendo la inhibición de la actividad enzimática o preincubando el veneno con el antiveneno es posible demostrar que esta enzima puede ser inhibida tanto en su actividad enzimática como en su acción hemolítica atribuida experimentalmente a esta proteína.

Teniendo en cuenta la diferencia en peso molecular así como en la actividad anticoagulante de la que carece la FLA<sub>2</sub> aislada de la especie procedente de Pucallpa, es posible considerar que estamos frente a una isoforma de la enzima en estudio.

## CONCLUSIONES

1. Se logró purificar una fosfolipasa A<sub>2</sub> de la serpiente peruana *Lachesis muta*, empleando dos pasos cromatográficos: Una columna de CM Sephadex C-50, seguida una columna de Sephadex G-50 a pH 5,0.
2. La enzima purificada es una proteína ácida monomérica de mediano peso molecular (18 749 Da).
3. La FLA<sub>2</sub> purificada es altamente termoestable manteniendo su actividad a 100°C por 15 minutos.
4. El ion calcio es mejor activador que el ion magnesio, por otra parte el EDTA, PMSF, glutation y cisteína inhiben fuertemente a la enzima.
5. La FLA<sub>2</sub> purificada mostró un bajo efecto mitotóxico y edemático (DMM 125.79 µg/ml y DEM 91.5µg respectivamente). Así mismo no presentó actividad hemolítica directa ni hemorrágica.
6. La fosfolipasa A<sub>2</sub> purificada posee un efecto anticoagulante y una buena acción hemolítica indirecta siendo 15.5 veces más hemolítico que el veneno total.
7. La enzima purificada es una proteína inmunogénica a pesar de tener un peso molecular menor a 20 000 Da, el antiveneno lachésico monovalente es capaz de neutralizarla tanto en su actividad enzimática como en su acción biológica.

## RECOMENDACIONES

- Dada la importancia de esta enzima se recomienda continuar con la exploración de nuevas formas moleculares de FLA<sub>2</sub> y la identificación de sus acciones biológicas.
- Se hace necesario identificar y clonar el gen de FLA<sub>2</sub> teniendo en cuenta que está entre las más evolucionadas de las proteínas de venenos ofídicos con un potencial médico de primera prioridad.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascencios, H., Cutti, F. 1995. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú." Boletín de Lima N° 97, pp.91-96.
- Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H., Matsumoto, K. 1991. Novel proliferative effect of phospholipase A<sub>2</sub> in Swiss 3t3 cells via specific binding site. J. Biol. Chem. 266, 19139-19141.
- Boffa, M., Dachary, J., Verheij, H., Rothen, C., Dupourco, J., Verger, R., De Hass. 1982. Do we know why some phospholipase A<sub>2</sub> are anticoagulant? Toxicon 20, 305.
- Boffa, M and Boffa, M. 1976. A PLA<sub>2</sub> with anticoagulant activity. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. Biochem. Biophys. Acta 4, 29.
- Carcasi, R. 1996. Purificación y caracterización parcial de la fosfolipasa A del veneno de la serpiente *Bothrops bilineatus* (loromachaco). Tesis para optar al título profesional de Biólogo. UNSA Arequipa-Perú.
- Castañón, Y., Zavaleta, A., Salas, M, Pancorbo, Z. y Rodríguez, M. (1993) Efectos letal, hemorrágico, coagulante, fosfolipásico y hemolítico de los venenos de las serpientes peruanas *Lachesis muta muta* y *Bothrops barnetti*. Boletín de la Sociedad Química del Perú Lima 59 pp. 38-48
- Cintra, A., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J. 1993. Bothropstoin-I: amino acid sequence and function. J. Protein Chem. 12, 57-64.
- Condrea, E., Barzilay, M., De Vries, A. 1964. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venom. Biochem. Biophys. Acta 84, 60.
- Condrea, E., Barzilay, M., De Vries, A. 1969. Study of hemolysis in the lethal effects of *Naja naja* venom in the mouse. Toxicon 7: 95-98.

- Condrea, E. 1970. Hemolytic effects of the snake venoms. In snake venom. P. 448 (Lee, C. Y., Ed.) Berlin Springer.
- Condrea, E. 1979. Hemolytic effects of the snake venoms. *Toxicon* 17, 28.
- Condrea, E., Ynga, C., and Rosemberg, P. 1981. Lack of correlation between anticoagulant activity and phospholipids hydrolysis by snake venom phospholipases A. *Thromb. Haemost.* 45, 82.
- Chem, I-J., Chiu, H-F., Huang, H-T., Teng, C-M. 1984. Edema formation and degranulation of Mast Cells by *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon*. 22, 17-28.
- Chiang, H., Chang, W., Rosemberg, P. 1973. Enzymatic of phospholipase A from Formosan Cobra (*Naja naja atra*) venom. *J.chin. Chem. Soc.* 2, 16.
- Chijiwa, T., Yamaguchi, Y., Ogawa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakashima, K., Oda-Ueda, N., Fukumaki, Y., Hattori, S., Ohno, M. 2003. Interisland evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes. *J. Mol. Evol.* 56, 286-293.
- Chioto, L., and Ward, R. 2003. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A<sub>2</sub> by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon*. 42, 869-883.
- Damico, D., Lilla, S., De Nuca, G., Ponce-Soto, L., Winck, F., Novello, J., Marangoni, S. 2005. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp 49 phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1726: 75-86.
- Da Silva, M., and Goulherme, O. 1982. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Toxicon*. 20, 563-569.

- De Oliveira, M. R and M. S. Palma. 1998. Polybitoxins: A group of phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the neotropical social wasp paulistina (*Polybia paulista*). *Toxicon* 36. 189-199.}
- Dennis, E. A., Rhee, S. G., Billab, M. M., Hannun, Y. A. 1991. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* 5, 2068-2077.
- Dennis, E. A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function for phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 269, 13057-13060.
- Diaz, C., Lomonte, B., Zamudio, F., Gutierrez, J.M. 1995. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A<sub>2</sub> variant, from *Bothrops asper* snake venom. *J. Natural Toxins* 3: 26-31
- Diaz-Oreiro, C and Gutierrez, J. M. 1997. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venom: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon.* 35, 241-252.
- Dufton, M., and Hider, R. 1983. Classification of phospholipase A<sub>2</sub> according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *J. Biochem.* 137, 545-551.
- Escobar, E. 1992. Purificación y caracterización bioquímica de una enzima fibrinogenolítica del veneno de la serpiente *Lacheis muta*. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica. UNMSM. Lima-Perú.
- Fortes-Diaz, C., Jannoil, M., Franco, F., Magalhaes, A., Diniz, C. 1999. studies on the specificity of CNF, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Interaction with PLA<sub>2</sub> from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon.* 37, 1747-1759.

- Fry, M. R., Ghosh, S. S., East, J. M., Franson, R. C. 1992. Role of human sperm phospholipase A<sub>2</sub> in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A<sub>2</sub> activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol. Reprod.* 47, 751-759.
- Fuly, A. L., Calil-Elias, S., Zingali, R. B., Guimarães, J. A., Melo, P. A. 2000. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon.* 38, 961-972.
- Fuly, A. L., De Miranda, A. L., Zingali, R. B., Guimarães, J. A., 2002. Purification and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1589-1597.
- Gene, J., Robles, A. 1987. Determinación de la dosis letal 50% por el método de Spearman Karber. *Rev. Med. Hops. Nal. Niños de Costa Rica.* 22, 35-40.
- Gutierrez, J. M., Arroyo, O., Bolaños, R. 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18, 603-610.
- Gutierrez, J. M., Lomonte, B., Cerdas, L. 1986. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon.* 22, 115-128.
- Gutierrez, J. M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L. 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon.* 26, 411-413.
- Haberman, E., Hardt, K. 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analyt. Biochem.* 50, 163.
- Haberman, E., Breithaup, H. 1978. The crotoxin complex on example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon.* 16, 19.

- Hendon, R and Fraenkel-Conrat. 1971. Biological roles of the components of crotoxin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68, 1560-1563
- Iwanaga, S y Suzuki, T. 1979. Enzymes in snake venoms. In Lee. C. Y. Ed. Berlin, Springer V. 52. 61-158.
- Jain, M. K., Berg, O. G. 1989. The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A<sub>2</sub> and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. Biochim. Biophys. Acta 736, 127-156.
- Kaiser, I., Gutierrez, J. M., Plummer, D., Aird, S, and Odeli, G. 1990. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. Arch. Biochem. Biophys. 278, 319-325.
- Khupulsup, K., Poopyruchpong, N., Rechclai, B., Ratanabanangkoon, C. 1981. A passive hemagglutination test for antibody *Naja naja siamensis* toxin 3. Toxicon 19, 863.
- Kamaguchi, S., Samejima, Y., Iwanaga, S y Suzuki, T. 1971. isolation and characterization of two phospholipases a from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Biochem. Biophys. Acta. 236. 142.
- Kemparaju, K., Nijaguna, B., Gowda, V. 1994. Purification of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from indian saw scaled viper *Echis carinatus* venos: caracterization of antigenic, catalytic and pharmacological properties. Toxicon. 32, 1178-1196.
- Kini, R. M., and Evan, H. 1989. A model to explain the Excitament ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Toxicon 42: 827-840.
- Kini, R. M. 2003. Excitament ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Toxicon 42, 827-840.

- Kondo, H., S. Kondo, I., Ikezawa, R., Murata and Osaka, A. 1960. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 13: 43-51.
- Kudo, I., Murakami, M., Hara, S., Inoue, K. 1993. Mammalian nonpancreatic phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 1170, 217-231.
- Lacerda, J. 1884. *Lecons sur le venin des serpents du Brasil.* Rio de Janeiro. Lombarts.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lazo, F., Rodriguez, E., Yarleque, A. 1998. Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A en venenos de serpientes. *Rev. Perú. Biol.* 5, 98-102.
- Lizano, S., Lambeau, G., Lazdunski, M. 2001. cloning and cDNA sequence analysis of Lys 49 and Asp 49 basic phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33, 127-132.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Lomonte, B. 1985. Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) in Central American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venoms neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon.* 23, 173-176.
- Lomonte, B. and Gutierrez, J. M. 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon.* 27, 725-733.
- Maraganore, J. M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezd, F. J., Heinrikson, R. L. 1984. A new class of phospholipase A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49.

- functional consequences for calcium and substrate binding. *J. Biol Chem*; 259: 13839-13843.
- Martin, S., Luthra, M., Wells, M., Wats, R., Hanahan, D. 1975. Phospholipase A<sub>2</sub> as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes: factors influencing the apparent specificity of the reaction. *Biochemistry*. 14. 5400.
- Mejia, J. 1994. Purificación y caracterización parcial de la fosfolipasa A del veneno de la serpiente *Lachesis muta* (shushupe). Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en microbiología y parasitología. UNMSM. Lima-Perú.
- Mejia, J., Inga, R., Lazo, F., Rodriguez, E., Zavaleta, A., Yarlequé, A. Aislamiento, purificación y caracterización bioquímica de una fosfolipasa A<sub>2</sub> de la serpiente peruana *Lachesis muta* “shushupe”. *Rev. Soc. Química del Perú*. Vol 70 pag 86 – 96.
- Minh-Zhou, H., Quing-Chuan, W., Guang-Fen, L. 1993. Effects of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. *Toxicon*. 31, 5, 627-635.
- Murakami, M., Kudo, I. 2002. Phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biochem*. 185, 263-270.
- Nisembum, C., Vidad, J. 1986. Phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* (víbora de la Cruz) venom purification and some characteristics properties. *Toxicon*. 24, 3, 259-273.
- Nuñez, V., Arce, V., Guitiérrez, J. M., Lomonte, B. 2004. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*. 44, 91-101.
- Ogawa, T., Nakashima, K., Nobushi, I., Deshimaru, M., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Sakaki, Y., Hattori, S., Ohno, M. 1996. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes for acquisition of diverse physiological functions, *Toxicon* 34, 1229-1236.

- Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T., Hattori, S. 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. *Toxicon*. 42, 841-854.
- Ouchterlony, O and Nilsson, L. A. 1967. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental Immunology*. I (34): 655-660
- Ownby, C., Colberg, T., White, S. 1997. Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon* 35, 111-124
- Ownby, C., Selistre de Araujo, H., White, S. and Fletches, J. 1999. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon* 37, 411-445.
- Prado-Franceschi, J., Hyslop, S., Cogo, J., Andrade, A., Assakura, M., Richi, A., Cruz-Hofling, M, and Rodrigues-Simioni, L. 1998. Characterization of a myotoxin from the Duvenoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): Effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon*. 36, 1407-1421.
- Pantigoso, C. 2000. Aislamiento, caracterización bioquímica y mecanismo de acción de una miotóxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica. UNMSM. Lima-Perú
- Rodríguez, E. and Yarlequé, A. 1990. Purification and characterization of two proteinases from bushmaster *Lachesis muta* snake venom. III Symposium on Animal, Plant and Microbial toxins. International society on toxinologia. Pan American Society. Mexico (Oaxtepec, 9<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> of January).
- Rosenberg, P. 1970. Pharmacology of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. In: snake venoms. Berlin-springer. 403.



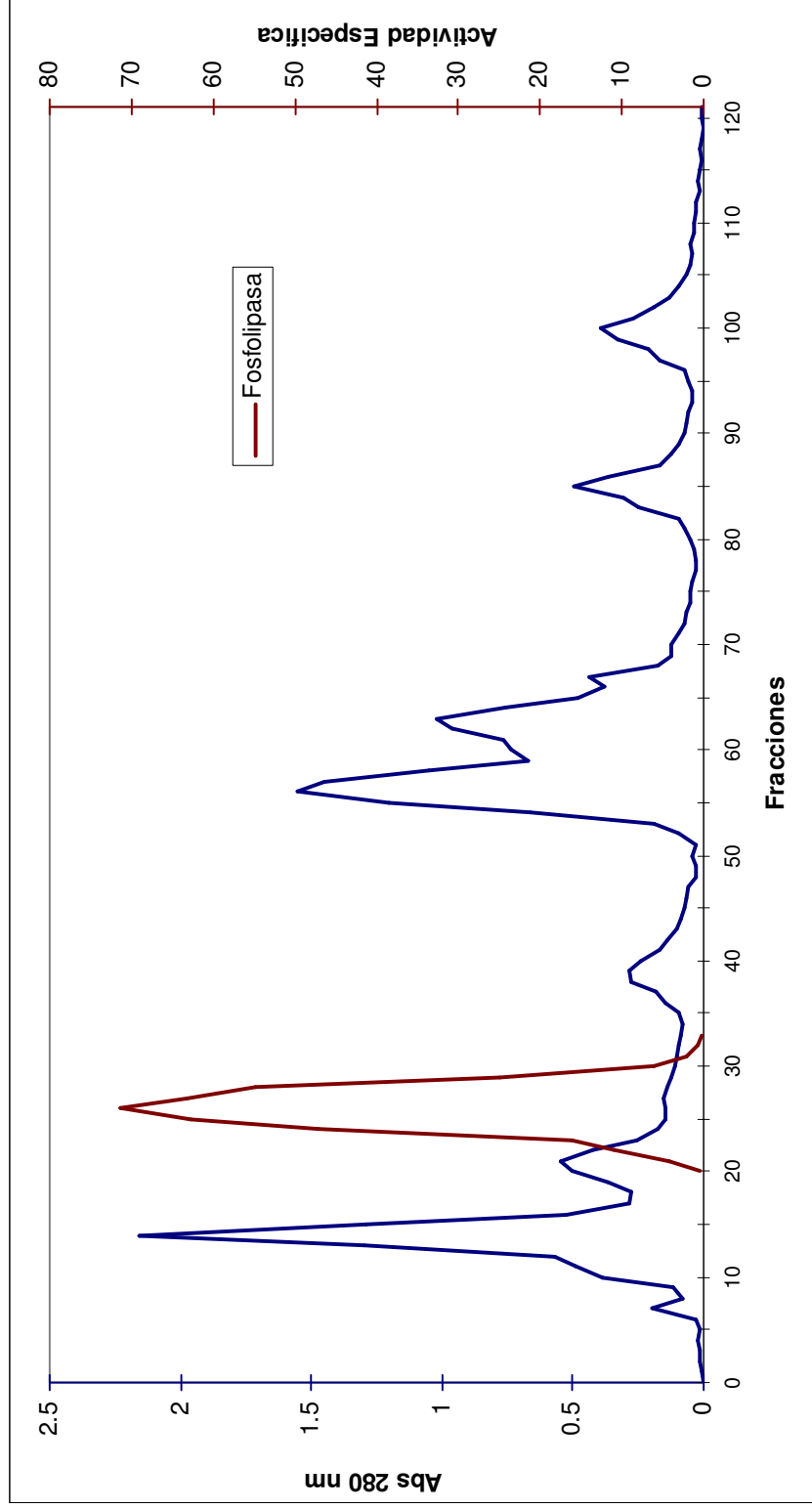
- Slotta, K.H., Fraenkel-Conrat. H. L. 1938-1939. Estudos quimicos sobre os venenos ofidicos. 4. Purificacao e cristalizaçao do veneno de cobra cascavel. Mem. Inst. Butantan 12; 505-513.
- Soares, A., Rodriguez, B., Homsí-Brandeburgo, M., Toyoma, M., Lombardi, F., Arni, R. And Giglio, J. 1998. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characteriazation, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon*. 36, 503-514.
- Soares, A. M., Giglio, J. R. 2003. Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon* 42.
- Stocker, K., Fisher, H. and Meyer, J. 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon*. 20: 265-273.
- Takasaki, C., Yutani, F., Kajiyashiki, T. 1990. Amino acid sequences of eight phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of Australian king brown snake *Pseudechis australis*. *Toxicon*. 28, 329-339.
- Teng, C., Chem, Y., Ouyang, C. 1984. Purification and properties of the main procoagulant and anticoagulant principies of *Vipera russelli* snake venom. *Biochem. Biophys. Acta* 786, 204.
- Theakston, R., Reid, H. 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon* 17, 511.
- Toyoma, M., Mancuso, L., Giglio, J., Novello, J., Oliveira, B., Marangoni, S. 1995. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: N-terminal sequencing. *Biochem. Mol. Bio. Int.* 37, 1047-1055.

- Touque, L., Alaoui-El-Azher, M. 2001. Mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub> and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. *Curr. Mol. Med.* 1, 739-754.
- Tu, A., Passey, R., Toom, P. 1970. isolation and characterization of phospholipase A from sea snake *Laticauda semifasciata* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 96-106.
- Verheij, H. M., Slotboom, A. J., De Haas, G. H. 1981. Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91, 92-203.
- Vidal, C., Cattaneo, P., Stoppani, A. 1972. Some characteristic properties of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedii* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 168-179.
- Vidal, J. C and Stoppani A. O. M. 1971. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms archives of Biochemistry and Biophysics. 145: 543-555.
- Warburg, O. and Christian, W. 1941. Isolierung and Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem.* 2(130): 384-421
- Wells, M., Hanahan, D. 1969. Studies on phospholipase A isolation and characterization of two enzymes from *Crotalus adamanteus* venom. *Biochemistry.* 8, 414-421.
- Woll, P. 1976. Aislamiento y purificación parcial de una fosfolipasa a en el veneno de la serpiente *Lachesis muta*. Análisis de algunos métodos usados en la determinación de su actividad. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima-Perú.

- World Health Organization. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenom. Geneva: World Health Organization.
- Wu, T. and Tinker, D. 1969. Phospholipase  $A_2$  from *Crotalus atrox* venom. Purification and some properties, *Biochem.* 8, 1558-1569.
- Yamakawa, M., Nosake, M. and Hokama, Z. 1976. Fractionation of sakishima-hyabu (*Trimererusus elegans*) venom, and lethal, hemorrhagic and edemaforming activities of the fractions. In animal, plant, and microbial toxins. *Biochemistry*, 1.
- Yarlequé, A., Campos, S., Escobar, E., Lazo, F., Sanchez, N., Hyslop, S., Marsh, N. A., Butterworth, P. J. and Price, R. G. 1989. Isolation and characterization of a Fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). *Toxicon*, 27, 1189-1197.
- Zevallos, J. 1996. Aislamiento y caracterización parcial de la fosfolipasa A presente en el veneno de la serpiente *Bothrops brazili* (Jergón shushupe). Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Genética. UNMSM. Lima-Perú.

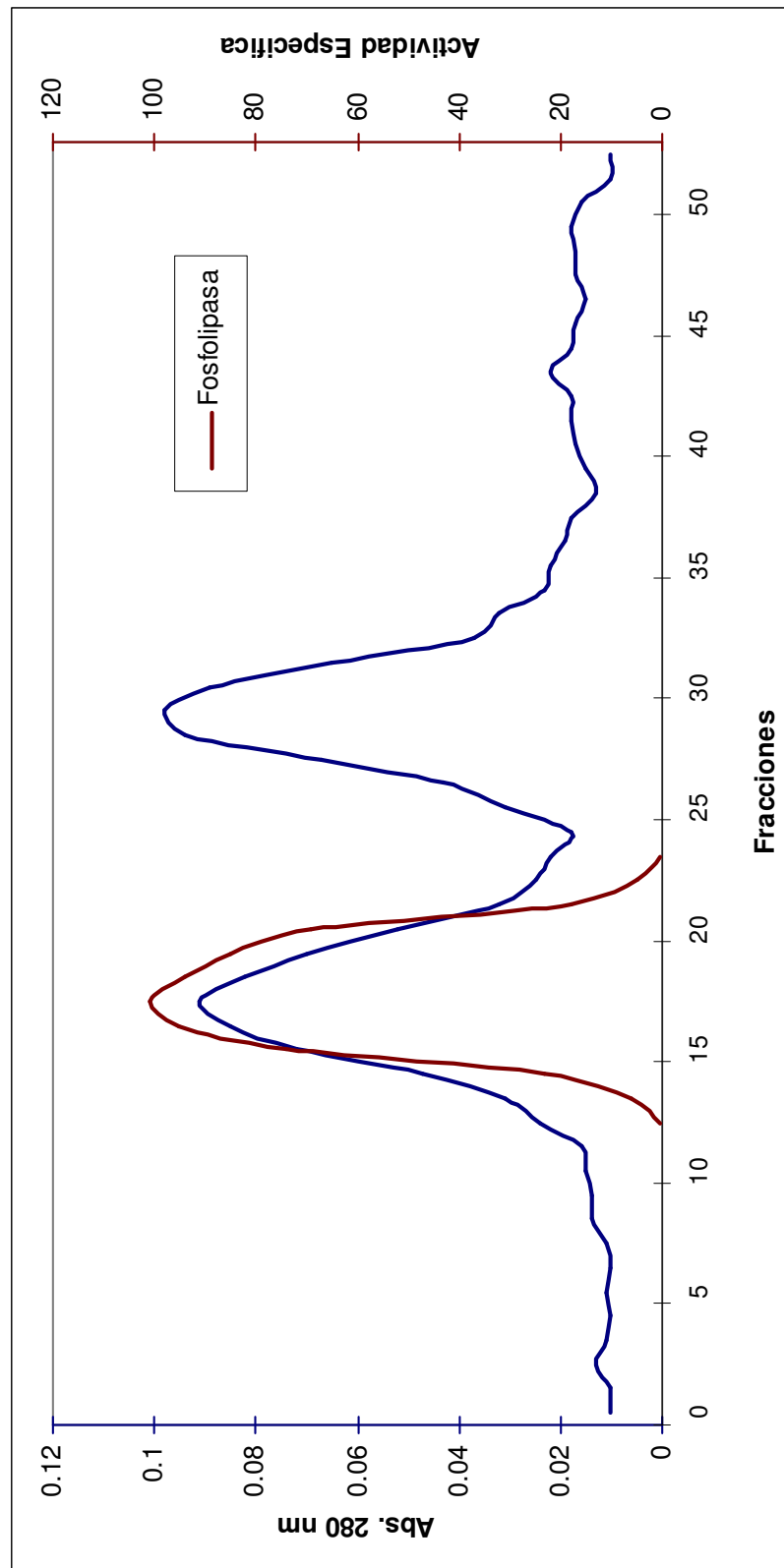
## **TABLAS Y FIGURAS**

**FIGURA N°1**  
 PRIMER PASO EN LA PURIFICACIÓN DE FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DEL VENENO DE *Lachesis muta* EN  
 CM-SEPHADEX C-50



**FIGURA N°2**

SEGUNDO PASO EN LA PURIFICACIÓN DE FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DEL VENENO DE *Lachesis muta* EN SEPHADEX G-50



**TABLA N°1**

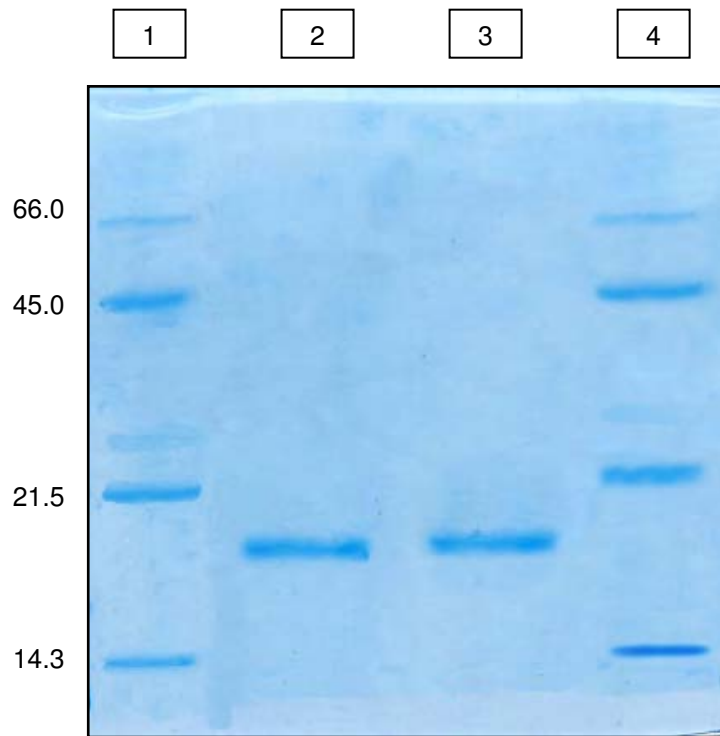
**PURIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DEL VENENO DE *Lachesis muta***

PROCEDIMIENTO	PROTEINA TOTAL		* ACTIVIDAD ESPECÍFICA	UNIDADES TOTALES DE ACTIVIDAD	RENDIMIENTO %	PURIFICACIÓN (veces)
	mg	%				
INICIAL. (Veneno Crudo)	110,07	100	1.56	171.7	100	1
CM-SEPHADEX C-50	2,28	2.07	59.8	136.3	79.4	38.3
SEPHADEX G-50	0,678	0.62	86.3	58.5	34.1	55.3

\* Actividad Específica: min. de retardo/min. Incubación/mg. proteína

### FIGURA N°3

#### ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> PURIFICADA

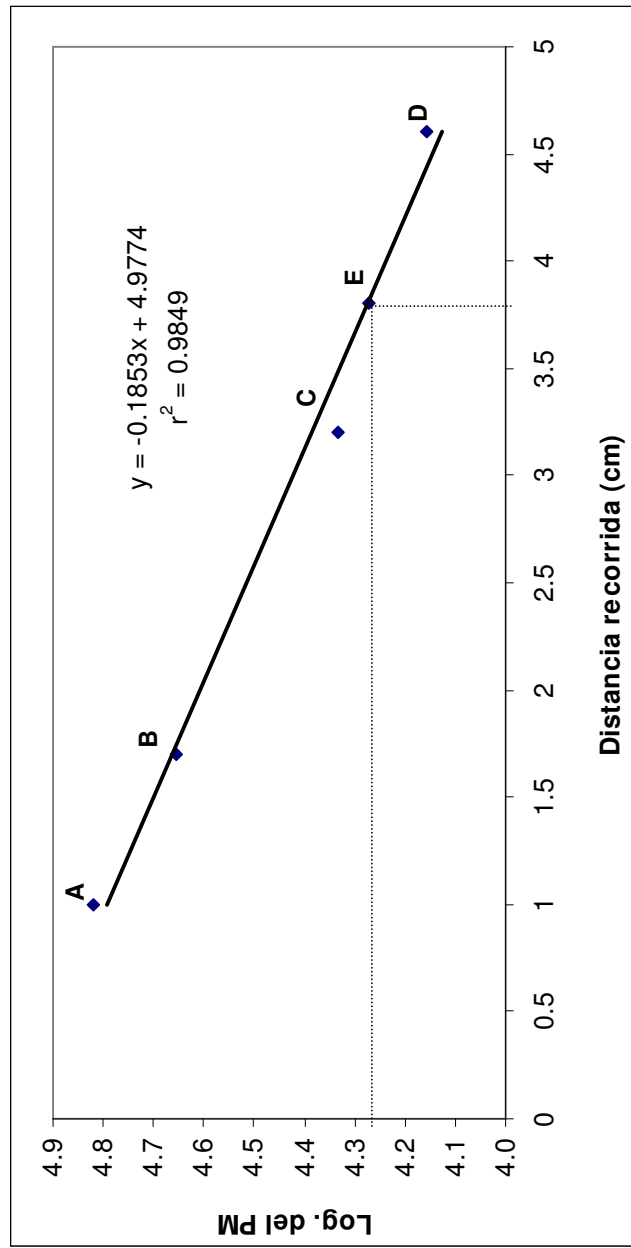


(1 y 4) marcadores de peso molecular albumina bovina (66 000 Daltons), ovoalbumina (45 000 Daltons), inhibidor de tripsina (21 500 Daltons) y lizosima (14 300 Daltons), (2) en condiciones no reductoras (3) en condiciones reducidas por el agente 2  $\beta$ -Mercaptoetanol.



FIGURA N°4

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS



- A: Ovoalbumina (42 699 Da)
- B: Anhidrasa carbónica (31 000 Da)
- C: Inhibidor de tripsina (21 500 Da)
- D: Lizosima (14 400 Da)
- E: Enzima reducida y no reducida (18 749 Da)

**TABLA N°2**

TERMOESTABILIDAD DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> PURIFICADA A pH 7.6

<b>Tiempo de Incubación a 100°C (min)</b>	<b>Actividad Específica (%)</b>	<b>Inhibición (%)</b>
Control sin incubación	100,0	0,0
2.5	100,2	0,0
5	106,8	0,0
10	103,4	0,0
15	89,3	10,7
20	77,5	22,5
30	62,0	38

**TABLA N°3**

EFFECTO DE IONES SOBRE LA FOSFOLIPASA DEL VENENO DE  
*Lachesis muta*

ION	Actividad Especifica (%)			
	0.1mM	1mM	5mM	10mM
Control sin Ion	100 %			
Calcio	86.4	143.8	153.3	157.7
Magnesio	80.2	95.7	110.8	148.7
Ca1mM + Mg 5mM	60.4			
Ca1mM + Mg 1mM	75.6			
Ca1mM + Mg 0.1mM	109.9			

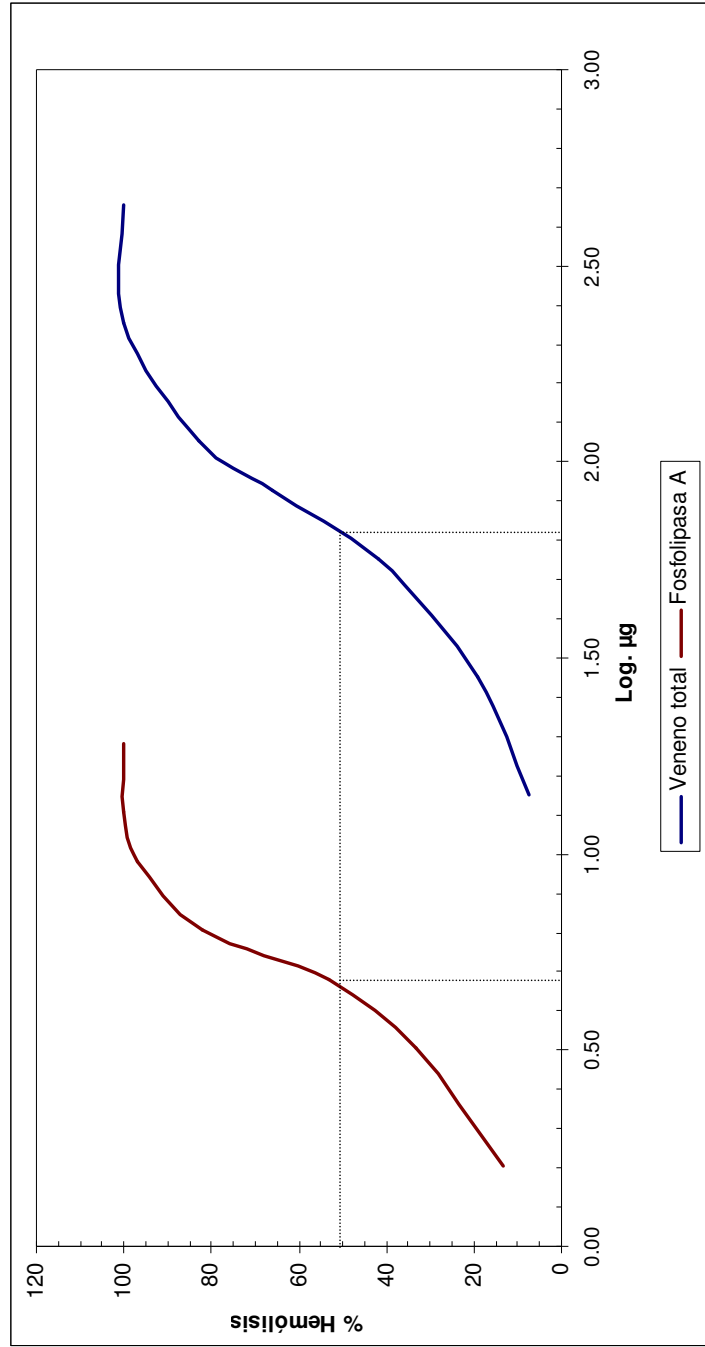
**TABLA N°4**

EFEECTO DE ALGUNOS AGENTES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DEL VENENO DE *Lachesis muta*

Agente quimico	Actividad Especifica (%)			
	2.5mM	5mM	10mM	20mM
<b>Control</b>	100%			
<b>DTT</b>	90.3	73.0	65.0	62.0
<b>2-Mercaptoetanol</b>	89.5	81.7	72.4	59.4
<b>Iodoacetato</b>	92.6	81.0	63.7	55.3
<b>TLCK</b>	88.0	76.1	58.1	49.5
<b>PMSF</b>	68.1	53.0	42.4	39.9
<b>EDTA</b>	70.8	52.4	35.8	32.7
<b>Ácido aspártico</b>	98.0	77.5	64.4	62.1
<b>Ácido glutámico</b>	90.9	69.2	51.3	47.7
<b>Cisteína</b>	80.3	54.9	41.6	31.6
<b>Glutation</b>	78.1	48.9	36.4	30.0

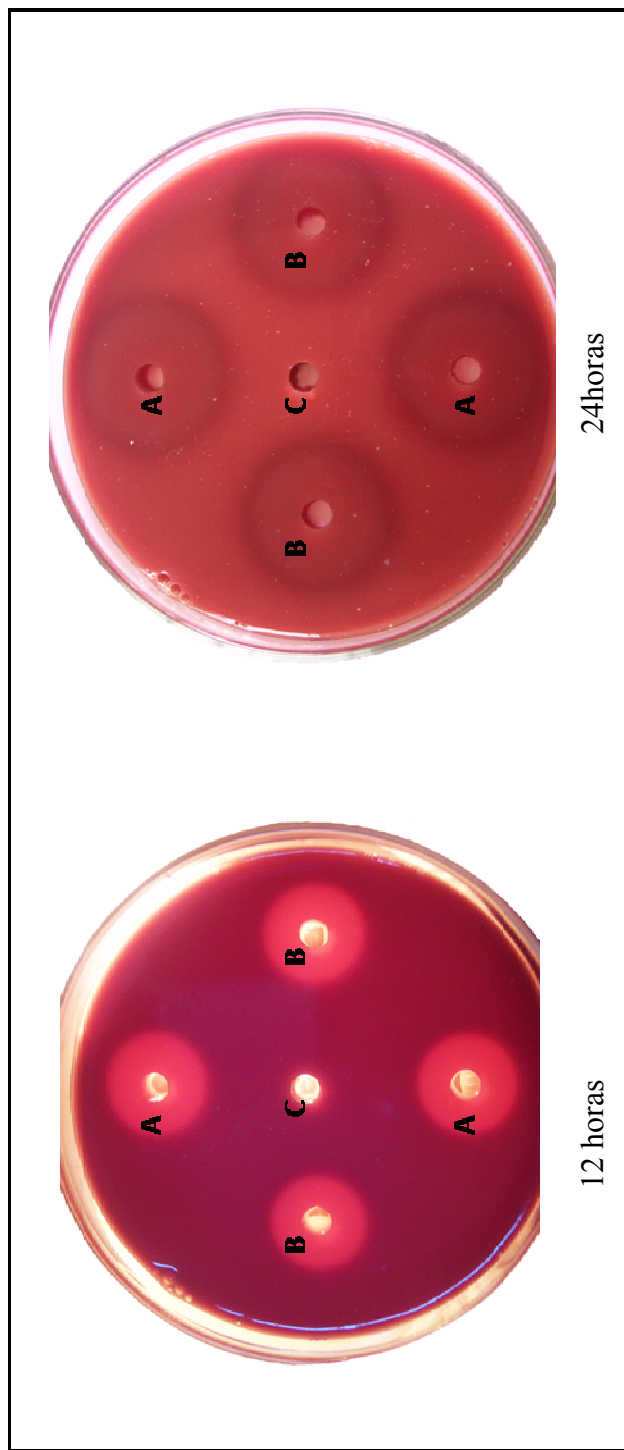
**FIGURA N°5**

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA EN TUBO DEL VENENO TOTAL Y LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DE *Lachesis muta*



**FIGURA N°6**

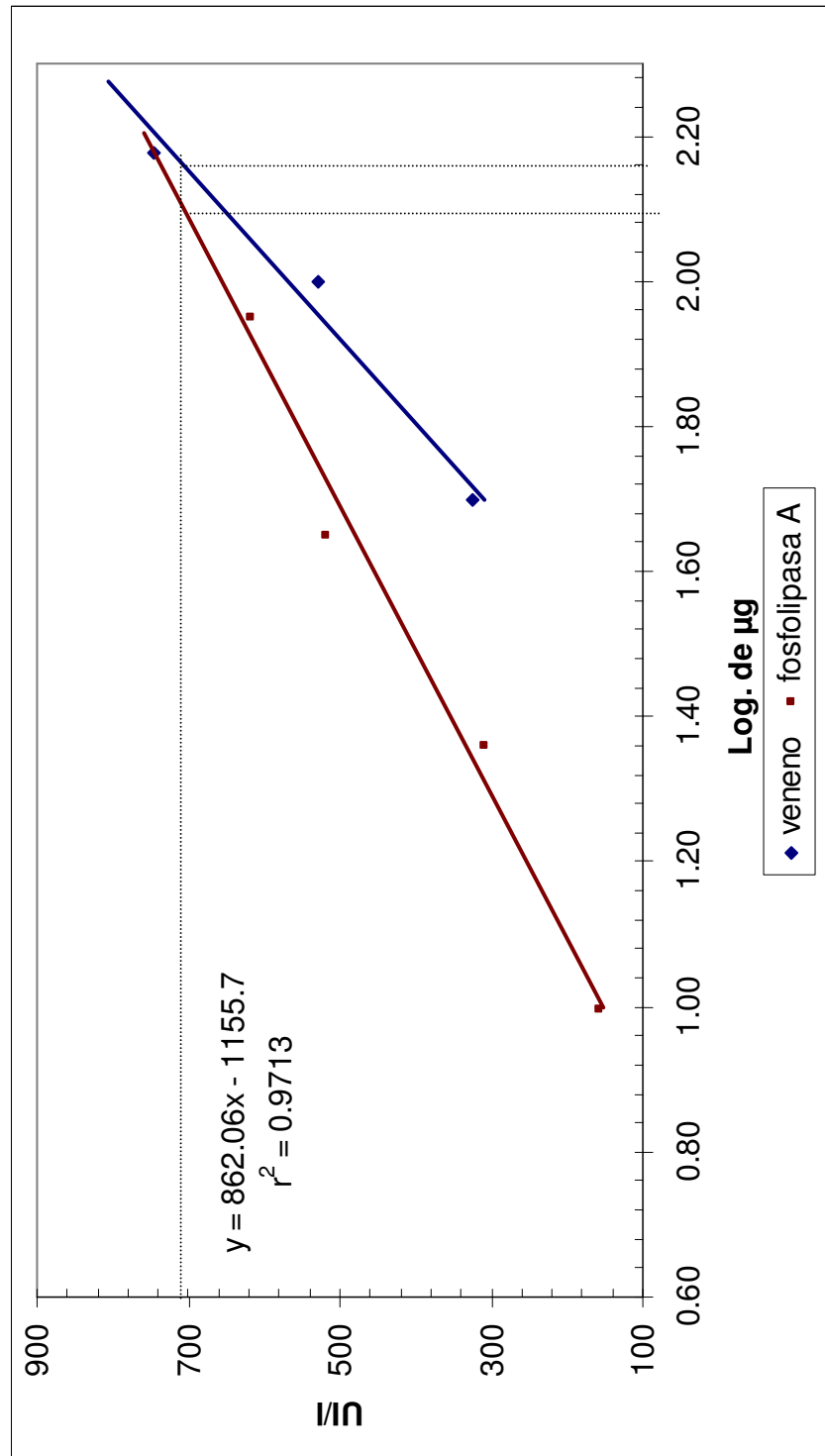
ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA EN PLACA DEL VENENO Y LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DE *Lachesis muta*



- A: halo formado por 4.35 µg de fosfolipasa A<sub>2</sub>
- B: halo formado por 67.6 µg de veneno total
- C: control negativo solución fisiológica.

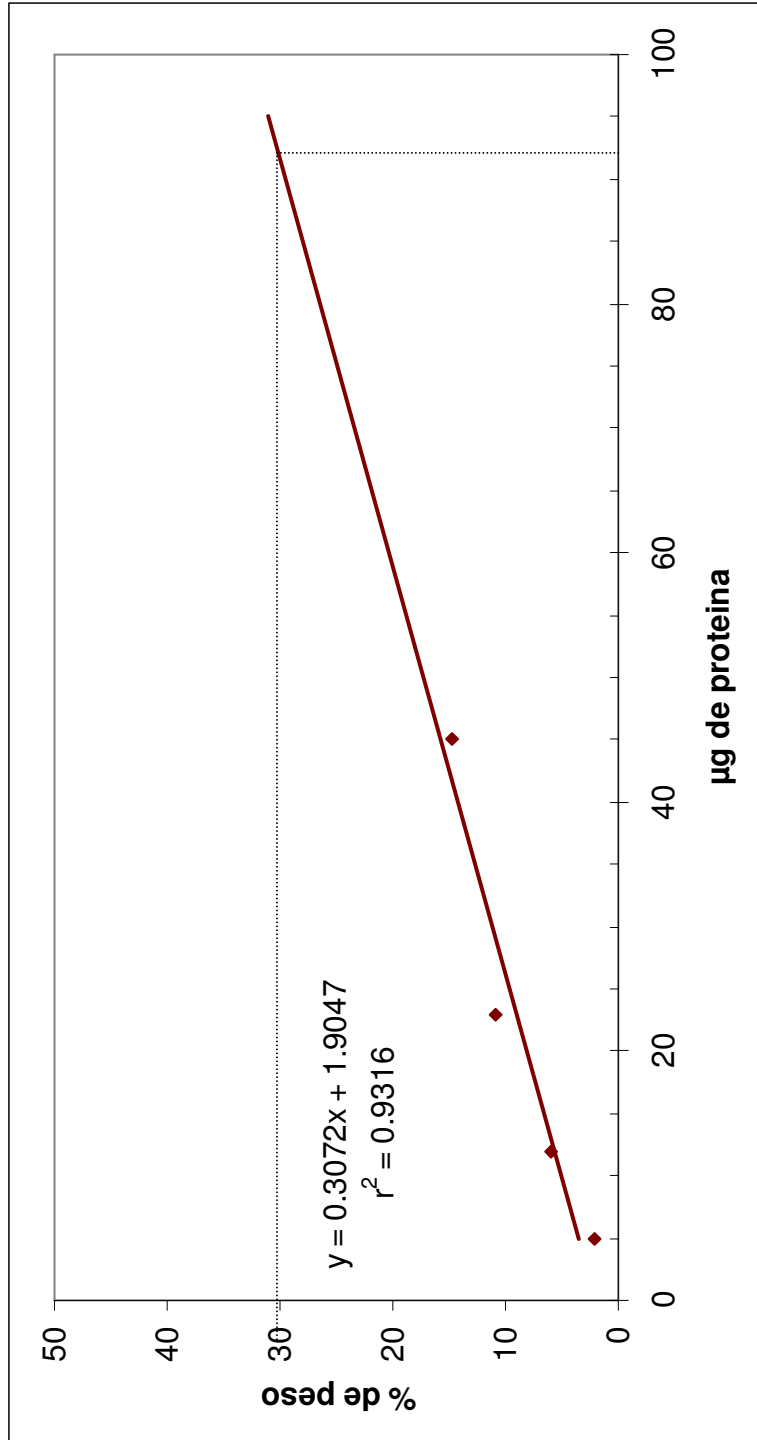
**FIGURA N°7**

ACTIVIDAD MIOTÓXICA POR CUANTIFICACIÓN DEL CK EN PLASMA DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>



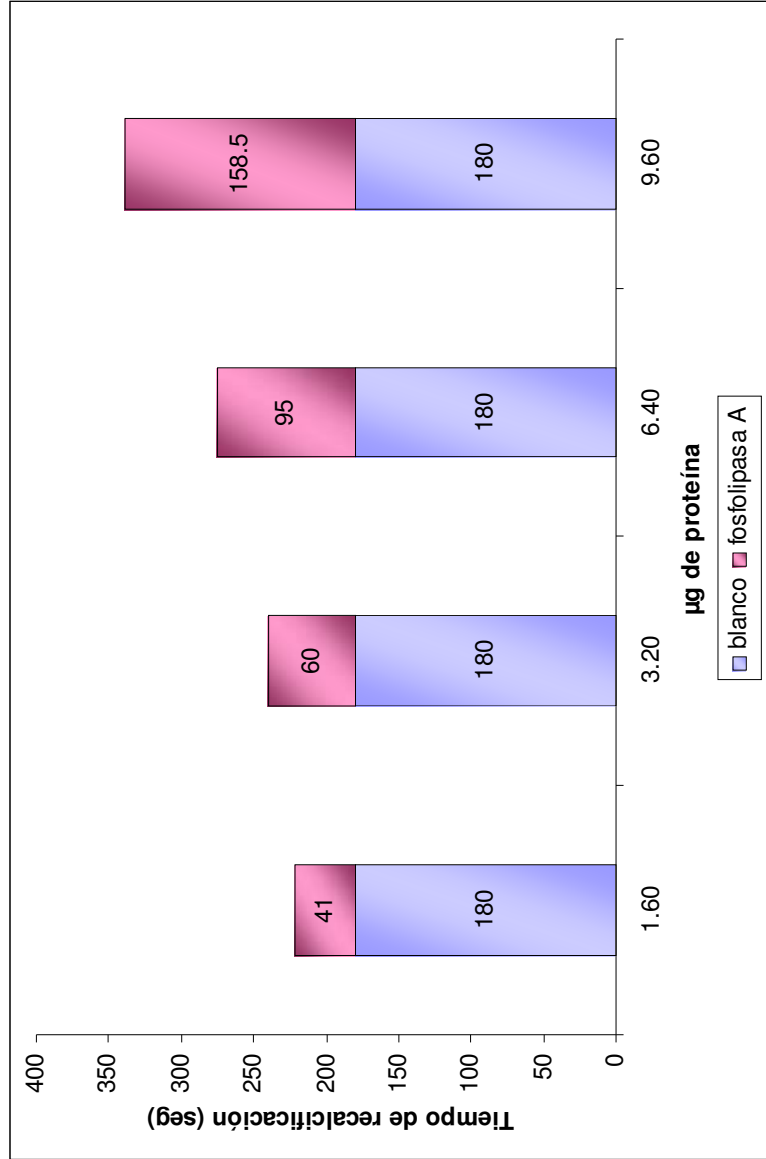
**FIGURA N°8**

**ACTIVIDAD EDEMÁTICA DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>**





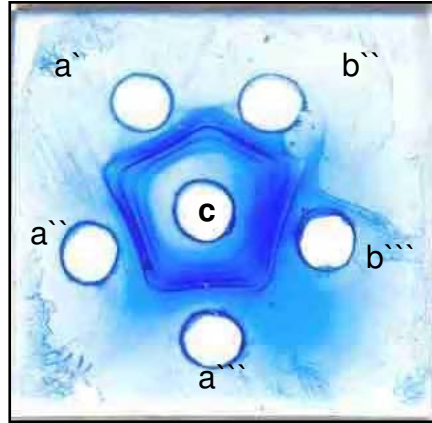
**FIGURA N°9**  
**ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>**



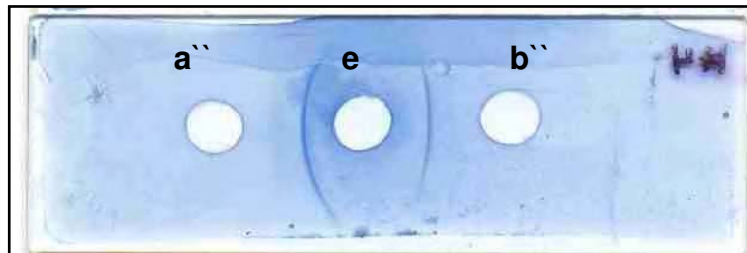
**FIGURA N°10**

**ANTIGENICIDAD DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DE *Lachesis muta***

A.



B.



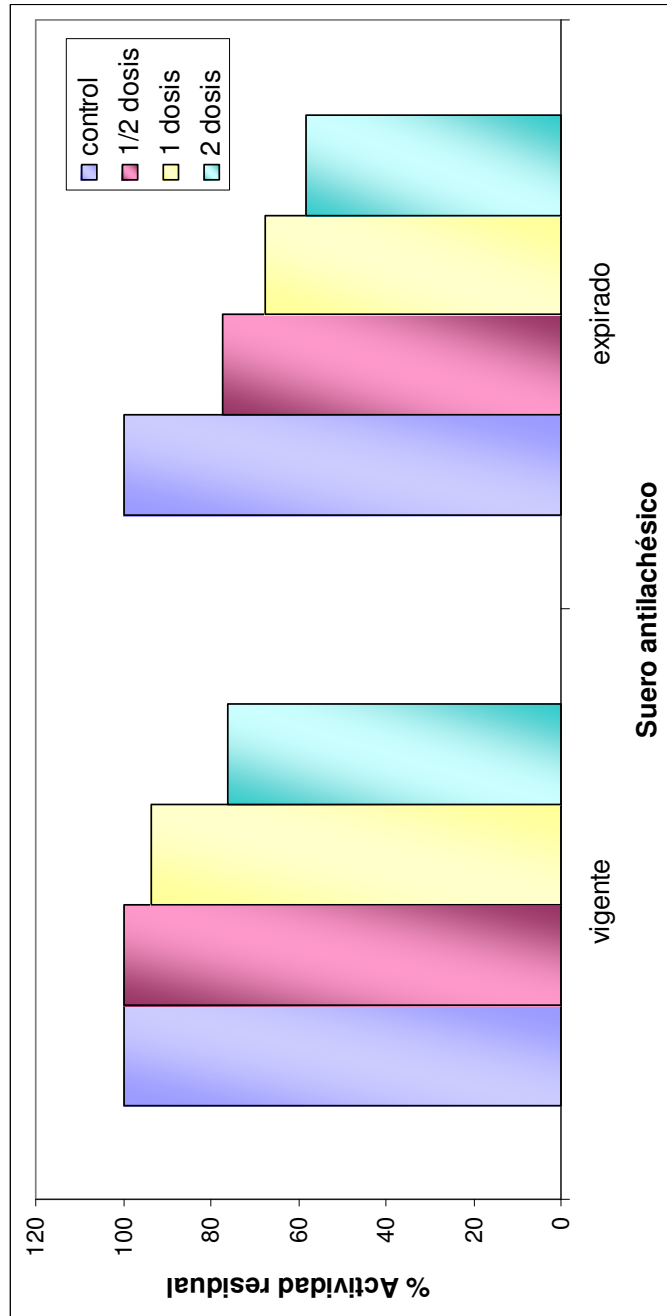
C.



- A. Immunodifusión: (c) veneno crudo de *L. muta*, (a', a'' y a''') suero vencido a 1/2, 1 y 2 dosis respectivamente, (b'' y b''') suero expirado a 1 y 2 dosis respectivamente.
- B. Immunodifusión: (e) FLA<sub>2</sub> purificada, (a'') sueros vigente y (b'') expirado.
- C. Inmunolectroforesis: (e) FLA<sub>2</sub> purificada, (c) veneno crudo, frente al suero vigente.

**FIGURA N°11**

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> PURIFICADA



**FIGURA N°12**

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DIRECTA DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> PURIFICADA

