

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**Aproximación venómica y pro-inflamatoria de isoformas de fosfolipasas A2 (PLA2)
provenientes de venenos de serpientes de la familia viperidae: *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon
piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus***

Tesis presentada por la Bachiller:

Barreda Salas, Sheyla Fernanda

ORCID: 0009-0008-0133-4391

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ph.D. Ponce Soto, Luis Alberto

ORCID: 0000-0001-5976-2913

Arequipa - Perú

2024

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 01 de Diciembre del 2023

Dictamen: 006428-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 006428, presentado por:

2011600272 - BARREDA SALAS SHEYLA FERNANDA

Titulado:

**APROXIMACIÓN VENÓMICA Y PRO-INFLAMATORIA DE ISOFORMAS DE FOSFOLIPASAS A2
(PLA2) PROVENIENTES DE VENENOS DE SERPIENTES DE LA FAMILIA VIPERIDAE: BOTHORPS
BARNETTI, AGKISTRODON PISCIVORUS LEUCOSTOMA Y AGKISTRODON CONTORTRIX
LATICINCTUS**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29389056 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN
DICTAMINADOR**



**41404327 - BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



Aproximación venómica y pro-inflamatoria de isoformas de fosfolipasas A2 (PLA2) provenientes de venenos de serpientes de la familia viperidae: Bothorps barnetti, Agkistrodon piscivorus leucostoma y Ag

INFORME DE ORIGINALIDAD

32%

INDICE DE SIMILITUD

32%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	8%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	5%
3	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	3%
4	scientiarvm.org Fuente de Internet	2%
5	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
6	doczz.es Fuente de Internet	1%
7	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080 Fuente de Internet	1%

DEDICATORIA

En primer lugar, quiero dedicar este trabajo de investigación a mis dos hermosos niños, los cuales son la razón de mi felicidad.

Agradezco a mis padres y hermanos por el amor incondicional, confianza y paciencia que me brindan día a día, gracias a expresar mi gratitud a Dios por haberme brindado una familia y una vida llena de amor, de la cual he aprendido cada lección buena y mala de la vida, así mismo, por haberme concedido ellos hoy puedo seguir cumpliendo mis objetivos. A mi compañero de vida, por enseñarme que con unidad y alegría podremos seguir adelante y que siempre estaremos juntos cumpliendo cada sueño y meta de la mano de nuestros bellos hijos.

Agradezco en especial, a mi madre, gracias a ella puedo lograr una meta más en mi camino. Gracias mamá, por cada enseñanza, pero sobre todo gracias por nunca dejarme caer y siempre impulsarme a culminar y cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Católica de Santa María, por brindarme la oportunidad de haber compartido y aprendido de profesores, los cuales me guiaron y enseñaron con paciencia y determinación; ellos me demostraron que, a pesar de todos los problemas que podamos afrontar, siempre podremos salir adelante con mucho esfuerzo.

Así mismo, agradezco haber pertenecido al proyecto “Aproximación Venómica de *Bothrops*, correlación farmacológica”, dicho proyecto corresponde a la movilidad de fondos de equipamiento Tipo III para la adquisición de equipo de Electroforesis bidimensional (BIO RAD) ayudaron y brindaron conocimientos para culminar este trabajo de investigación.

RESUMEN

Las fosfolipasas A2 (PLA₂) pertenecen a un grupo de enzimas que se caracterizan por cumplir un papel importante en los diversos procesos celulares y fisiológicos de los organismos vivos. En el grupo de las fosfolipasas existe un subgrupo de proteínas que se conoce como las “PLA₂ homólogas”, estas proteínas se caracterizan por no ejercer actividad catalítica, todo ello a causa de una mutación que tiene lugar en un aminoácido del sitio activo; sin embargo, a pesar de que estas toxinas no tienen acción lipolítica, generan efectos biológicos parecidos a los de sus homólogas que son catalíticamente activas, entre ellas se puede distinguir la miotoxicidad y la inflamación.

En el presente trabajo de investigación se comparó la potencia pro inflamatoria de fosfolipasas A2 de tres especies distintas que pertenecen a la misma familia viperidae, PLA₂ de *Bothrops barnetti*, PLA₂ *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y PLA₂ K49 homóloga de *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Para las tres muestras se realizó el mismo procedimiento, con la finalidad de purificar las PLA₂ y demostrar su potencia pro inflamatoria, mediante el uso de una columna de interacción hidrofóbica se consiguió separar diferentes enzimas de las muestras de veneno, las cuales posteriormente fueron analizadas en una electroforesis PAGE-SDS para aislar muestras de aproximadamente 14 kDa. Seguidamente se realizó una electroforesis bidimensional (2D) de las PLA₂ purificadas para determinar posibles isoformas. Con las PLA₂ purificadas de las diferentes muestras de veneno se determinó la actividad fosfolipásica utilizando el sustrato cromogénico 4-nitro-3-(octanoiloxi) ácido benzoico. Finalmente se analizó el potencial pro inflamatorio de las PLA₂ de las diferentes muestras de veneno, evaluando los mediadores envueltos en la migración leucocitaria y en el efecto inflamatorio como son la IL-1 y la IL-6 en miotubos (C2C12).

Se obtuvo como resultado que las tres muestras de veneno de serpientes de la familia viperidae, a pesar de residir en diferentes ubicaciones geográficas, y tener mutaciones como es el caso de la PLA K49 de homóloga de *Agkistrodon contortrix laticinctu*,

mantienen la actividad farmacológica , la cual se encarga de la actividad pro inflamatoria, como se pudo observar en la evaluación realizada en miotubos (C2C12) , donde se demostró un aumento de los mediadores dentro de las 3 a 6 primeras horas, demostrando de esta manera que es un efecto local.

Palabras clave: *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, fosfolipasa A2, homóloga K49 , interacción hidrofóbica, IL-1, IL-6.



ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂) belong to a group of enzymes that are characterized by playing an important role in various cellular and physiological processes in living organisms. In the group of phospholipases there is a subgroup of proteins known as "homologous PLA₂", these proteins are characterized by not exerting catalytic activity, all due to a mutation that occurs in an amino acid in the active site; however, despite the fact that these toxins do not have lipolytic action, they generate biological effects similar to those of their catalytically active counterparts, including myotoxicity and inflammation.

In the present research work, the pro-inflammatory potency of phospholipases A₂ from three different species belonging to the same viperidae family was compared: PLA₂ from *Bothrops barnetti*, PLA₂ *Agkistrodon piscivorus leucostoma* and PLA₂ K49 homologous from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. For the three samples, the same procedure was carried out, in order to purify the PLA₂ and demonstrate its pro-inflammatory potency, by using a hydrophobic interaction column it was possible to separate different enzymes from the venom samples, which were later analyzed in a PAGE-SDS electrophoresis to isolate samples of approximately 14 kDa. Two-dimensional (2D) electrophoresis of the purified PLA₂ was then performed to determine possible isoforms. With the PLA₂ purified from the different venom samples, the phospholipase activity was determined using the chromogenic substrate 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid. Finally, the pro-inflammatory potential of PLA₂ from the different venom samples was analyzed, evaluating the mediators involved in leukocyte migration and the inflammatory effect, such as IL-1 and IL-6 in myotubes (C2C12).

It was obtained as a result that the three venom samples from snakes of the viperidae family, despite residing in different geographical locations, and having mutations such as the PLA K49 homologous of the *Agkistrodon contortrix laticinctu*, maintain the pharmacological activity, the which is responsible for the pro-inflammatory activity, as

could be observed in the evaluation carried out in myotubes (C2C12), where an increase in mediators was demonstrated within the first 3 to 6 hours, thus demonstrating that it is a local effect.

Key words: *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, phospholipase A2, K49 homolog, hydrophobic interaction, IL-1, IL-6.



ÍNDICE

DEDICATORIA.....	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
ÍNDICE.....	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	
ÍNDICE DE TABLAS.....	
HIPOTESIS	
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL.....	
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	4
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. VENENO DE SERPIENTE Y SUS COMPONENTES.....	4
1.2. FACTORES QUE VARIAN LA COMPOSICIÓN DEL VENENO.....	5
1.3. FOSFOLIPASAS A2	6
1.4. EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS FOSFOLIPASAS A ₂ DE SERPIENTES	8
1.5. MIOTOXINAS PLA ₂ D49 Y K49 HOMÓLOGAS.....	11
1.6. ACCIDENTES OFIDICOS.....	12
1.7. Bothrops barnetti	13
1.8. Agkistrodon piscivorus leucostoma	14
1.9. Agkistrodon contortrix laticinctus	15
CAPITULO II.....	16
2. UBICACIÓN, MATERIALES Y METODOS	16
2.1. UBICACIÓN	16
2.2. MATERIALES	16
2.3. METODOS.....	18
2.3.1. VENENOS, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	18

2.3.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA.....	18
2.3.3. ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS.	18
2.3.4. GELES BIODIMENSIONALES (2D).....	19
2.3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPÁSICA A ₂	21
2.3.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PRO INFLAMATORIA EN CULTIVO CELULAR DE MIOBLASTOS Y MIOTUBOS (C2C12)	21
2.3.7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA	22
2.3.8. ANALISIS ESTADÍSTICO	23
CAPITULO III.....	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1. RESULTADOS.....	24
3.1.1. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA DE LAS PLA ₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE <i>Bothrops barnetti</i> , <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> y <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	24
3.1.2. ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS DE LAS PLA ₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE <i>Bothrops barnetti</i> , <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> y <i>Agkistrodon</i> <i>contortrix laticinctus</i>	28
3.1.3. ELECTROFORESIS BIODIMENSIONAL (2D) DE LAS PLA ₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE <i>Bothrops barnetti</i> , <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> y <i>Agkistrodon</i> <i>contortrix laticinctus</i>	29
3.1.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPÁSICA A ₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE <i>Bothrops barnetti</i> , <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> y <i>Agkistrodon</i> <i>contortrix laticinctus</i>	32
3.1.5. ACTIVIDAD PRO INFLAMATORIA EN CULTIVO CELULAR DE MIOBLASTOS Y MIOTUBOS (C2C12) DE LAS PLA ₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE <i>Bothrops</i> <i>barnetti</i> , <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> y <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	34
3.1.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PRO INFLAMATORIA. DOSAJE DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINAS IL-1 E IL-6 DE LAS PLA ₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE <i>Bothrops barnetti</i> , <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> y <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	36
3.2. DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- <i>Bothrops barnetti</i>	14
Figura 2.- <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	15
Figura 3.- <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	15
Figura 4.- Perfil cromatográfico de purificación de una PLA ₂ a partir de veneno total de <i>Bothrops barnetti</i>	25
Figura 5.- Perfil cromatográfico de purificación de una PLA ₂ a partir de veneno total de <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	26
Figura 6.- Perfil cromatográfico de purificación de una PLA ₂ a partir de veneno total de <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	27
Figura 7.- Electroforesis en PAGE-SDS	28
Figura 8.- Electroforesis bidimensional en PAGE-SDS 2D aislados a partir del veneno total de <i>Bothrops barnetti</i>	29
Figura 9.- Electroforesis bidimensional en PAGE-SDS 2D aislados a partir del veneno total de <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	30
Figura 10.- Electroforesis bidimensional en PAGE-SDS 2D aislados a partir del veneno total de <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	31
Figura 11.- Actividad PLA ₂ de los venenos recolectados	32
Figura 12.- Representación gráfica de la actividad citotóxica	34

Figura 13.- Niveles de IL-1 en plasma inducido por PLA₂ aislados a partir del veneno de total de *Bothrops barnetti*36

Figura 14.- Niveles de IL-6 en plasma inducido por PLA₂ aislados a partir del veneno de total de *Bothrops barnetti*37

Figura 15.- Niveles de IL-1 en plasma inducido por PLA₂ Ap aislados a partir del veneno de total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma*38

Figura 16.- Niveles de IL-6 en plasma inducido por PLA₂ Ap aislados a partir del veneno de total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma*39

Figura 17.- Niveles de IL-1 en plasma inducido por PLA₂ Ac K49 aislados a partir del veneno de total de *Agkistrodon contortrix laticinctus*40

Figura 18.- Niveles de IL-6 en plasma inducido por PLA₂ Ac K49 aislados a partir del veneno de total de *Agkistrodon contortrix laticinctus*41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Principales serpientes venenosas del Perú	
.....		13
Tabla 2.-	Actividad PLA ₂ de fracciones correspondientes a los venenos de <i>Bothrops barnetti</i> , <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> , <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	
.....		33
Tabla 3.-	Porcentaje (%) de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) por acción de PLA ₂	
.....		35



HIPOTESIS

- NO EXISTE la presencia de isoformas de PLA_2 , con actividad proinflamatoria, en el veneno de serpientes de la familia viperidae, *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.
- SI EXISTE la presencia de isoformas de PLA_2 , con actividad proinflamatoria, en el veneno de serpientes de la familia viperidae, *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar por una aproximación venómica y pro-inflamatoria, isoformas de fosfolipasas A_2 (PLA_2) provenientes de venenos de serpientes de la familia viperidae: *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Purificar fosfolipasas A_2 de serpientes de la familia viperidae *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* por cromatografía de interacción hidrofóbica.
2. Estudiar los niveles de expresión de PLA_2 de la familia viperidae *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* a través de electroforesis uni y bidimensional.

3. Determinar la actividad fosfolipásica A_2 de las diferentes muestras obtenidas del veneno de serpiente de la familia viperidae *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.
4. Evaluar la actividad pro inflamatoria, en cultivo celular de mioblastos y miotubos (C2C12), a través del dosaje de interleucinas 1 y 6.



INTRODUCCIÓN

El veneno de las serpientes está conformado por una mezcla heterogénea de sustancias simples y complejas, entre las sustancias simples se pueden identificar diferentes moléculas orgánicas como son los aminoácidos libres, péptidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos y aminas biogénicas; así mismo se puede encontrar constituyentes inorgánicos los cuales son cationes y aniones, entre los iones se puede enfatizar al calcio como un cofactor importante de algunas enzimas hidrolítica (lipasa) como es la fosfolipasa A_2 . En las sustancias complejas se tienen a las proteínas y enzimas.¹⁵

Dentro del veneno de las serpientes se pueden encontrar diversas enzimas, de las cuales ya han sido descritas aproximadamente 26 tipos, de las cuales resalta que la mayoría son de naturaleza hidrolítica. De las enzimas descritas previamente, 12 se encuentran comúnmente en proporciones variadas en las diferentes serpientes, el resto de enzimas se encuentran distribuidas en forma puntual. De estas enzimas se encuentra un grupo especial, las que se denominan Lipasas, dentro de las que encontramos a las fosfolipasas.¹⁶

De la fosfolipasa A_2 (PLA_2) se puede indicar que se encuentra en todos los venenos de las serpientes y es la encargada del daño tisular local, estas enzimas son dependientes de Ca^{2+} y se caracterizan por hidrolizar el enlace éster de la posición sn-2 de un glicerofosfolípido de la membrana celular, generando la producción de un ácido graso y un lisofosfolípido. La PLA_2 del veneno de la serpiente genera efectos tóxicos, los cuales incluyen neurotoxicidad pre o postsináptica, miotoxicidad local o sistémica, anticoagulación, cardiotoxicidad, modulación de la agregación plaquetaria, actividades hemolíticas, edematizante e hipertensora, así como también un daño directo en órganos como riñón, pulmón e hígado, es necesario indicar también que no todas las PLA_2 tienen la capacidad de generar todos los efectos tóxicos antes mencionados.¹⁷

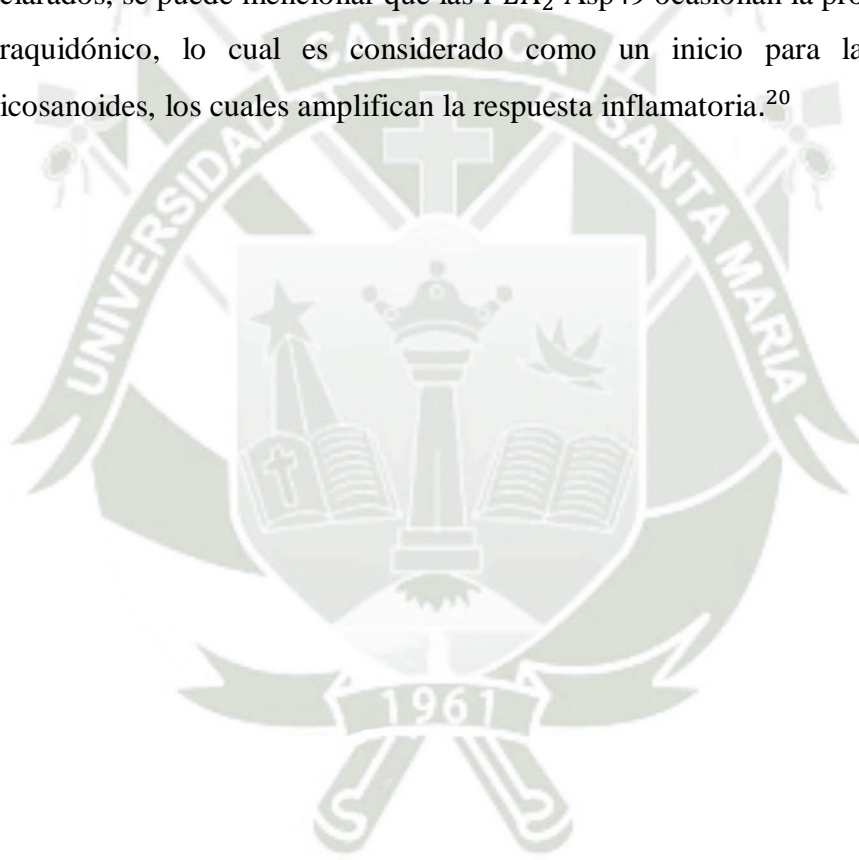
La acción catalítica es un factor importante para que los daños antes citados puedan ser realizados por la PLA_2 , sin embargo, se ha demostrado que existe un subgrupo de la PLA_2 las cuales son enzimáticamente inactivas, esto se debe a una variación en la posición 49, donde se suplanta el ácido aspártico (Asp) por Lisina (Lys), Arginina (Arg), Serina (Ser) o Glutamina (Gln), ello conlleva a que sufra la pérdida de la actividad enzimática por la degeneración del loop de unión al Calcio.¹⁴

En los últimos años se han realizado diferentes estudios e investigaciones para poder determinar y evaluar las características físico-químicas de las fosfolipasas, sobre todo de las PLA_2 ; estas enzimas generan interés de investigación debido a que se ha demostrado que, algunas de estas moléculas que poseen las mismas características físico-químicas propias de las PLA_2 son responsables de actividades biológicas tóxicas, a pesar de carecer completamente de actividad enzimática. Este importante hallazgo impulsó a la identificación de dichas moléculas, permitiendo de esta manera encontrar que, dentro del veneno de la serpiente, coexisten otro tipo de moléculas semejantes a las PLA_2 con la diferencia que existe una sustitución de un aminoácido en la posición 49 de Asp por Lys, esta sustitución es la responsable de la pérdida de la actividad enzimática.⁸

El veneno de serpiente genera un daño irreversible a las células musculares, es posible que ello se deba a la unión de las PLA_2 con la molécula blanco, aunque no se ha descrito aún cuales son exactamente los aceptores de las PLA_2 , algunos autores han denominado a estos receptores del tipo M por su procedencia de las células musculares.¹⁸ Seguido al reconocimiento inicial por la célula blanco, estas toxinas generan la rotura de la permeabilidad celular por mecanismos que no son relacionados a la catálisis, este punto describe la actividad de las PLA_2 Asp49, a consecuencia de la pérdida de la permeabilidad se produce una despolarización, pérdida de los gradientes iónicos, salida de moléculas citosólicas como es el caso de la creatina quinasa (CK) y deshidrogenasa láctica (LDH) los cuales son marcadores del daño muscular; así mismo ocurre una entrada a gran escala de Ca^{2+} lo que induce una hipercontracción de las fibras musculares. Además de ello se produce una

sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria lo que implica una posible apoptosis de las células, derivada de la activación de las caspasas.¹⁹

Las recientes investigación han determinado que la inyección intramuscular de la PLA_2 causa inflamación, debido al incremento en la permeabilidad vascular, formación de edema, reclutamiento leucocitario en los tejidos dañados y posterior liberación de mediadores inflamatorios, a pesar de que estos efectos aún no han sido aclarados, se puede mencionar que las PLA_2 Asp49 ocasionan la producción de ácido araquidónico, lo cual es considerado como un inicio para la producción de eicosanoides, los cuales amplifican la respuesta inflamatoria.²⁰



CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. VENENO DE SERPIENTE Y SUS COMPONENTES.

Los ofidios o serpientes pertenecen a la clase de los reptiles. Actualmente hay descritas cerca de 3000 especies en todo el mundo, de las cuales tan sólo 250 especies son venenosas. Se alimentan de animales vivos que tragan enteros, especialmente mamíferos (roedores), y aves, también de anfibios, lagartos, peces, insectos, arácnidos, huevos y, en algunas ocasiones, de otras serpientes, para lo cual han desarrollado diferentes características en su dentadura, lo que permite clasificarlos y, a su vez, identificar el tipo de maniobras de agresión, defensa, captura de sus presas. En Perú se encuentran dos familias de serpientes venenosas, Viperidae y Elapidae, con algunos géneros respectivamente.¹

Su mordedura causa efectos locales y sistémicos con diversas secuelas, además de una variedad de disturbios hematológicos y bioquímicos, los cuales en la mayoría de los casos llevan a la muerte. El diagnóstico por mordedura de serpiente, depende de la condición del paciente (signos clínicos) y si es posible, de la identificación del espécimen. Su tratamiento se basa en brindar un soporte hemodinámico al paciente mientras las toxinas son eliminadas del organismo y en controlar los efectos de las toxinas mediante el manejo adecuado del anti-veneno ofídico.^{2,5}

Los componentes y mecanismos de acción de las toxinas presentes en los venenos son muy variados, donde se encuentran componentes no proteicos (inorgánicos y orgánicos) tales como carbohidratos y sales, y proteicos con acción necrotizante, coagulante o hemorrágica, entre otras, algunos de estos compuestos han sido aislados y caracterizados o descritos como toxinas letales, o se les han atribuido acciones potentes sobre proteínas específicas como, por ejemplo, las involucradas en la coagulación sanguínea.

En estas mezclas biológicas sin embargo predominan péptidos y proteínas, por lo que es posible establecer las características cualitativas de los mismos basados en su análisis electroforético y cromatográfico. Usando la técnica de electroforesis (en

geles de poliacrilamida) y cromatográfica como HPLC se pueden analizar los perfiles de los venenos de diferentes especies de serpientes.³

Los venenos de serpiente son rasgos de complejidad genética moderada compuestos en gran parte por toxinas proteínicas que funcionan en la depredación y la defensa.¹ Con algunas excepciones, se ha encontrado que los venenos de serpiente evolucionan rápidamente bajo selección positiva dentro y entre especies, lo que implica cambios en los patrones de expresión de toxinas y secuencias de proteínas. Se cree que esta rápida evolución es el resultado de los roles evolutivamente críticos del veneno en la alimentación y la defensa y las interacciones co-evolutivas antagónicas con depredadores y presas.¹ Sin embargo, las mismas presiones selectivas que resultan en la adaptación local y la divergencia a nivel de especie en los venenos también pueden operar en las etapas del ciclo de vida, particularmente si la presa o los depredadores cambian con la edad o el tamaño. Se han identificado cambios ontogenéticos en la composición del veneno en numerosas especies de serpientes, pero ciertamente no en todas las especies que se han examinado.⁵

1.2. FACTORES QUE VARIAN LA COMPOSICIÓN DEL VENENO.

A pesar de que las serpientes puedan ser de una misma familia, inclusive de una misma especie, la composición del veneno puede ser variable dependiendo de diferentes factores, de los cuales podemos destacar:

- Distribución geográfica: el veneno de serpientes que son de la misma especie, pero que son colectadas en diferentes ubicaciones, puede presentar variaciones en su actividad.
- Carácter individual entre serpientes: Se demostró que serpientes que son de la misma especie, inclusive de la misma procedencia, pueden variar en su composición de veneno, debido a circunstancias especiales que afectan a cada una de ellas.
- Edad del animal: Se ha identificado que el veneno de las serpientes jóvenes posee mayor actividad pro-coagulante y menor actividad lipasica que las serpientes adultas de la misma especie.

1.3. FOSFOLIPASAS A₂

Las fosfolipasas A₂ son macromoléculas compuestas por cerca de 110 a 135 residuos de aminoácidos que poseen una estructura básica de las fosfolipasas A₂ cuantitativamente activas. Las miotoxinas fosfolipasas A₂ pueden ser divididas en dos grandes grupos. Las fosfolipasas A₂ miotóxicas Asp49 (D49) que poseen un residuo de Asp 49 conservado esencial para su pleno funcionamiento. Otro grupo de miotoxinas son caracterizadas por tener en lugar de Asp, Lys 49, llevando la pérdida de unión al Ca²⁺, disminuyendo sustancialmente o reduciendo la actividad hidrolítica sobre sustratos purificados o sobre la lecitina de huevo.⁴

El modo de acción de las fosfolipasas miotóxicas Lys49 y de las Asp49 sobre el músculo son generalmente del mismo tipo, tanto las miotoxinas Lys49 y Asp49 pueden causar lisis rápida del sarcolema, llevando a un rápido estado de mionecrosis.⁵

El papel de la actividad catalítica, llevado a cabo por estas miotoxinas es un punto no esclarecido y controversial ya que las miotoxinas, con estructura fosfolipasa A₂ “like” Lys 49 no poseen una actividad lipolítica, portando otros mecanismos deben estar relacionados en la expresión de actividad miotóxica.⁴

En América Latina, de modo general la mayoría de los accidentes ofídicos son causados por serpientes del género Bothrops. La picada de estas serpientes lleva generalmente a un cuadro de mionecrosis local, provocadas por la presencia de las miotoxinas fosfolipasa A₂ “like”, que son proteínas estructuralmente semejantes a las fosfolipasas A₂ activas, no obstante, sin o con actividad enzimática residual o baja.⁶

El veneno de las serpientes de la familia viperidae, así como el veneno de otras, han mostrado la presencia de isoformas, tanto para diferentes individuos de una misma especie, como para el mismo individuo. Se sabe que serpientes, poseen varios genes que codifican varias isomorfias, con todo la expresión y la síntesis de diferentes isoformas permanece aún desconocido. La separación de estas isoformas ha sido posible por el uso de HPLC de fase reversa, en la mejor de las hipótesis.⁷ Sin embargo con el avance tecnológico, la plataforma proteómica que combina una serie de técnicas desde la cromatografía líquida de alta eficiencia o performance (HPLC), así como la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas, ha optimizado

los procesos en la identificación de nuevas isoformas presentes en un veneno, de tal forma que hoy es necesario reevaluar muchas toxinas que se conocían como una sola pero hoy se puede identificar como dos nuevas isoformas que podrían actuar de manera sinérgica en el procesos de envenenamiento.⁸

Las fosfolipasas A₂ miotóxicas han sido objeto de muchos estudios en razón de tres motivos principales:

- 1) Son factores importantes.
- 2) Son de fácil aislamiento.
- 3) Representan cerca del 20 a 30 % de veneno total.

Muchas de las miotoxinas ya fueron aisladas y parcialmente estudiadas desde el punto de vista bioquímico y farmacológico.

El mecanismo de acción de las miotoxinas fosfolipasa A₂ “like” aún permanece oscuro.⁵ La hipótesis del mecanismo de acción de las miotoxinas indica que las fosfolipasas A₂ miotóxicas se ligan a determinados receptores para intermediar la acción miotóxica. En líneas generales la hipótesis tendría los siguientes eventos:

- a) La miotoxina se une a receptores de membrana,
- b) Ocurre una alteración de los flujos iónicos de sodio y potasio.
- c) Ocurre un aumento de concentración de fluido para dentro de la célula.
- d) Se inicia una vacuolización.
- e) Se inicia un proceso de desorganización de las fibras musculares.
- f) Pérdida acentuada de la integridad celular.

Las fosfolipasas A₂ tanto D49 como K49 pueden estar o no en forma agregada, más comúnmente en forma dimérica.⁹ Estas neurotoxinas necesitan para llevar a cabo el evento miotóxico de residuos cargados positivamente tales como Lisina, Arginina e Histidina. De acuerdo con Selistre de Araujo et al., (1996) las fosfolipasas A₂ ácidas de *Bothrops jararacussu* no causan miotoxicidad, por tanto, aminoácidos cargados positivamente son extremadamente importantes para la expresión de miotoxicidad.

Todas estas nuevas conjeturas, como se mencionó anteriormente, necesitan ser reevaluadas en el empleo de una nueva plataforma de identificación de toxinas, así el presente proyecto se enmarca en el empleo de una plataforma proteómica que se inicia con los estudios de aproximación a fin de conocer mejor la presencia de

nuevas isoformas de esta familia de proteínas de interés en todas las áreas de investigación biológica.

Con fines de estudio comparativo el presente trabajo pretende evidenciar posibles diferencias en los estudios de homología secuencial respecto de las PLA₂ miotóxicas sistémicas procedentes del veneno de serpientes del género *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*, en ese entender el presente trabajo de investigación, a evaluado la potencia proinflamatoria de fosfolipasas A₂, procedentes de los veneno de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* estableciendo claras diferencias respecto de la potencia pro-inflamatoria revelada en las regiones responsables de la estructura primaria de las fosfolipasas A₂ estudiadas, procedentes de una misma región intercontinental, sin embargo con una diferencia geográfica significativa, como lo es entre América del Sur y América del Norte.

1.4. EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS FOSFOLIPASAS A₂ DE SERPIENTES

Las PLA₂s de las glándulas de veneno pueden sufrir rápida adaptación microevolutiva para generar variaciones de diversas funciones.

La primera secuencia de un cDNA codificador de una PLA₂ de veneno de serpiente fue reportado en la literatura por Guignery-Frelat et al., 1987. Desde entonces numerosas secuencias de cDNAs de PLA₂s de los grupos I y II ya fueron realizadas. Con el objetivo de entender la estructura, la función y la evolución molecular de las PLA₂s fueron aislados y secuenciados diversos cDNAs codificadores de PLA₂s del veneno de *Trimeresurus flavoviridis* incluyendo dos proteínas homólogas PLA₂s Lys 49. La comparación de estos cDNAs con otros ya descritos reveló algunos puntos interesantes, como la alta homología de las regiones 5' y 3' no traducidas del cDNA de las PLA₂s cuando comparadas con la región que codifica la proteína.¹⁰ Además de comparaciones realizadas entre las PLA₂s que contienen en su estructura en la posición 49 un residuo de aspartato en el lugar de lisina que está directamente envuelto con la actividad farmacológica y catalítica, pudiendo la PLA₂ desencadenar su actividad Biológica independiente de la actividad catalítica, a través de la liberación del ácido araquidónico.

Estudios comparativos del cDNA de dos fosfolipasas del grupo I NnkPLA-I y NnkPLA-II, aisladas de la biblioteca de cDNA de la serpiente Elapidae *Naja naja kauothiai*, con otros cDNAs que codifican fosfolipasas A2 de los grupos I y II, también demostraron que las regiones 5' y 3' no traducidas se mantienen más conservadas que las regiones procesadas que codifican proteínas. Estos datos sugieren que una acelerada micro-evolución viene ocurriendo en las fosfolipasas A2 que están directamente relacionadas con el desenvolvimiento de varias actividades fisiológicas y farmacológicas atribuidas a esa proteína.

El estudio de las proteínas bioactivas ha sido durante mucho tiempo un enfoque clave de las ciencias de la vida y la salud. En 1995, Marc Wilkins definió la expresión "proteoma" como el conjunto completo de proteínas expresadas por el genoma de un organismo, tejido o célula. En consecuencia, la expresión "proteómica" es un estudio integral a gran escala de un proteoma específico, que incluye información sobre la abundancia de proteínas, la modificación postraducciona (PTM), la interacción proteína-proteína, la función de la proteína y la ubicación de la proteína.¹¹

En 1980, Celis y su equipo desarrollaron un método de separación de proteínas que utilizaba una electroforesis en gel 2-D excepcionalmente eficaz seguida de una secuencia de degradación de Edman para identificar proteínas específicas. Esto, junto con la mayor disponibilidad de bases de datos de secuencias de proteínas, abrió la puerta a un amplio uso de la proteómica. Desde estos esfuerzos pioneros, la utilidad de un enfoque proteómico ahora se ha demostrado para muchos organismos y tipos de células. Las estrategias proteómicas permiten a los investigadores caracterizar, comparar y distinguir numerosas proteínas en un organismo o en un entorno de múltiples especies.

La proteómica es un campo en desarrollo, que se basa en el rápido desarrollo de la instrumentación analítica y la programación bioinformática. Las principales áreas en las que este campo está mejorando es la comprensión de la abundancia de proteínas, la vida media, la localización subcelular, la actividad precisa, el estado de modificación, la estructura y las interacciones con otras moléculas bioactivas. En consecuencia, la proteómica ahora se usa ampliamente en la investigación farmacéutica, lo que permite a los científicos y las empresas comerciales identificar nuevos medicamentos más rápidamente y probar los efectos secundarios de manera

más eficiente. También se ha vuelto ampliamente utilizado en la investigación clínica, el diagnóstico de enfermedades y la identificación de biomarcadores moleculares.¹¹

Los biólogos lo utilizan para investigar funciones básicas de células y microbios y organizaciones moleculares. También se ha convertido en una herramienta importante para el estudio de venenos de animales que permite una investigación detallada de la composición del veneno.

Los venenos de serpiente son saliva altamente modificada que contiene una mezcla compleja de proteínas biológicamente activas y moléculas no proteicas que se utilizan con mayor frecuencia para incapacitar, inmovilizar y digerir presas. Las proteínas representan alrededor del 90-95% del peso seco de la mayoría de los venenos y juegan un papel principal en los efectos biológicos de los venenos. Por lo tanto, los venenos de serpientes a menudo se consideran minibibliotecas para el desarrollo de fármacos novedosos.⁵

Recientemente, muchas compañías farmacéuticas y expertos en el campo de la toxínología han dirigido su atención a los componentes del veneno de serpiente como un producto natural, recurso de materiales para aplicaciones biotecnológicas. Los venenos de serpientes se han utilizado en la industria farmacéutica como una fuente valiosa de fármacos terapéuticos que incluyen Captopril, Aggrastat y Eptifibatide.

El conocimiento sobre la composición de muchos venenos de serpientes se ha incrementado recientemente mediante la mejora progresivamente rápida de los métodos analíticos para incluir mejoras en la espectrometría de masas, las estrategias de separación y la bioinformática.¹² No obstante, para manifestar el beneficio completo de la proteómica en los venenos, los métodos de separación deben continuar mejorando. Esto es particularmente cierto para los pasos iniciales en el fraccionamiento del veneno.

El establecimiento de perfiles proteómicos de veneno de alta calidad:

- Revelará la diversidad biológica de las estrategias de composición de toxinas utilizadas por las serpientes para cumplir.
- Probablemente ayudará a predecir las manifestaciones clínicas del envenenamiento.
- Mejoran la taxonomía.

- Revelan cambios ontogenéticos intrigantes.
- Proporcionan una herramienta útil para investigar las posibles diferencias en la composición del veneno asociadas con distintos orígenes geográficos dentro del rango de distribución de las especies.
- Revelan nuevos componentes biológicamente activos importantes del veneno.

La presente revisión resume el conocimiento actual y destaca importantes avances recientes en venenos con especial énfasis en técnicas de separación contemporáneas y bioinformática que han comenzado a elaborar la complejidad de los venenos de serpientes.

1.5. MIOTOXINAS PLA₂ D49 Y K49 HOMÓLOGAS

Las miotoxinas PLA₂ son los componentes tóxicos principales y más abundantes en los venenos de serpientes de la familia Viperidae. El modo de acción de las miotóxicas PLA₂ K49 y D49 en el músculo ocurre por diferentes vías, pero en general pueden causar una lisis rápida del sarcolema y un estado rápido de mionecrosis.⁴ Estas miotoxinas PLA₂ también se caracterizan por su fuerte carácter asociativo en dímeros, que es la forma más común de polimerización encontrada para las PLA₂ miotóxicas y, eventualmente, en tetrámeros. Estas asociaciones dependen principalmente de los residuos de tirosina (Y).⁹

Las miotoxinas PLA₂ aisladas hasta el momento son moléculas compactas, estables a variaciones de temperatura, pH, alta concentración salina y en presencia de disolventes orgánicos. Debido a estas características, no se desnaturalizan en las condiciones habituales de trabajo durante los procesos de depuración y ensayos biológicos.⁵ Estas características se acentúan principalmente cuando las PLA₂ se asocian, por ejemplo, en dímeros, lo cual es común para la homóloga PLA₂ K49.

Las PLA₂ miotóxicas que se han caracterizado son las de los venenos de *Bothrops asper*, *B. jararacussu*, *B. jararaca*, *B. newidi*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. marajoensis*, *B. pauloensis*, *B. alternatus*, *B. brazili*, *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus ruruima*, etc. conocer la secuencia de aminoácidos de algunos de ellos, así como su estructura cristalina.¹³

A pesar de sus diferencias en la actividad enzimática, PLA₂ D49 y K49 son miotóxicas, lo que implica dos mecanismos de acción diferentes. Las miotoxinas PLA₂ D49 dependen de su capacidad catalítica para producir necrosis en las fibras musculares.⁶ Por el contrario, la PLA₂ K49 miotóxica y catalíticamente inactiva utiliza un sitio que abarca los residuos 115-129 en la región C-terminal como el principal determinante de la toxicidad, que incluye una combinación variable de residuos catiónicos y aromáticos/hidrofóbicos.¹⁴ Existe evidencia de que ambos tipos de miotoxinas alteran la permeabilidad de la membrana plasmática e inician una serie de eventos degenerativos cuyos mecanismos moleculares aún están poco caracterizados.

Una vez producida la lesión de la membrana plasmática, se produce una entrada masiva de calcio, lo que genera pequeños cambios en la membrana plasmática, denominados lesiones delta, hipercontracción de miofilamentos, alteraciones mitocondriales, ruptura de membranas y formación de densidades floculantes que resultan de la aglomeración de proteínas. la membrana interna de las mitocondrias.⁶ La degradación de los componentes fosfolipídicos provoca graves alteraciones en la integridad estructural y funcional de las membranas plasmáticas, con el consiguiente influjo de iones Ca²⁺ provocando la liberación de proteasas dependientes de Ca²⁺, activación de PLA₂ endógena y colapso mitocondrial. La suma de todos estos cambios puede resultar en la muerte celular. Las diferentes miotoxinas PLA₂ inducen un patrón similar de cambios morfológicos, independientemente de su actividad enzimática.

1.6. ACCIDENTES OFIDICOS

Un accidente ofídico ocurre cuando una serpiente muerde a su víctima, inoculando sustancias tóxicas las cuales lesionan tejidos y provocan alteraciones fisiopatológicas, estos accidentes ocurren en todo el mundo; es por ello que, estos accidentes son considerados como problemas de salud pública, en especial en países de clima tropical. Se han identificado 3000 especies de serpientes, entre las que se considera 10 al 14% venenosas, en Perú de acuerdo al Ministerio de Salud suceden alrededor de 7,000 a 8,000 accidentes ofídicos por año, en gran cantidad producidos por la especie de Bothrops.

En el Perú se encuentran diferentes especies endémicas, en su mayoría de la familia Bothrops, las cuales presentan mayor índice de accidentes ofídicos. Sin embargo, a pesar de ser considerados como un problema de salud pública, las serpientes ofrecen apoyo a las áreas rurales con mayor pobreza, debido a que proporcionan un control de los roedores que contaminan los productos almacenados y que son los causantes de la transmisión de enfermedades en seres humanos.²¹

Tabla 1. Principales serpientes venenosas del Perú.⁵⁴

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN
Viperidae	<i>Bothrops atrox</i>	Jergón de la selva
	<i>Bothrops brazili</i>	Jergón shushupe
	<i>Bothrops pictus</i>	Jergón de la costa
	<i>Bothrops roedingeri</i>	Jergón de la costa
	<i>Bothriopsis bilineata</i>	Loromachaco
	<i>Bothriopsis oligolepis</i>	Lamon o jergón negro
	<i>Lachesis muta</i>	Shushupe
Elapidae	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Cascabel sudamericana
	<i>Micrurus spixii</i>	Coral o naca naca
	<i>Micrurus surinamensis</i>	Coral o naca naca
	<i>Micrurus tschuddi</i>	Coral de la costa

1.7. *Bothrops barnetti*

Bothrops Barnetti o conocida comúnmente como “Punta de lanza de Barnett”, es una especie de serpiente que se encuentra ubicada en el norte del Perú, entre los 0 y 1000 metros sobre el nivel del mar, es una especie endémica del Perú y se le puede

encontrar en los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Piura y recientemente se han registrado avistamientos en la zona sur del Perú, específicamente en Arequipa, Moquegua y Tacna.

La *Bothrops Barnetti* presenta una morfología a manera de triángulos blancos y negros, por lo general tiene un crecimiento hasta los 120 cm, entre las serpientes de esta especie ocurre un dimorfismo sexual, lo cual se puede diferenciar en el tamaño de las hembras, las cuales son más pequeñas y son más finas.²²



Figura 1. *Bothrops barnetti*²²

1.8. Agkistrodon piscivorus leucostoma

Agkistrodon piscivorus leucostoma o también conocida como “Boca de algodón”, es una serpiente ubicada en Estados Unidos, es la especie más grande del género *Agkistrodon*, es una víbora semiacuática de cuerpo mediano a grande, presenta en su adultes un tamaño promedio de 76 a 114 cm y un tamaño máximo de 188 cm, las hembras son típicamente más pequeñas que los machos.

Este tipo de serpiente posee una cabeza ancha, distinta al cuello, el hocico tiene un perfil romo con el borde de la parte superior de la cabeza que se extiende hacia adelante un poco más allá de la boca, poseen una sola placa anal, escamas dorsales con quilla y típicamente 25 filas de escamas en la parte media del cuerpo.²³



Figura 2. *Agkistrodon piscivorus leucostoma*²³

1.9. *Agkistrodon contortrix laticinctus*

Agkistrodon contortrix laticinctus o también conocida como “Cabeza de cobre” es una serpiente ubicada en Estados Unidos, es una víbora de tamaño mediano con un promedio de 60 a 90 cm y con un tamaño máximo de 132 cm. Típicamente presenta un color canela claro, con bandas transversales anchas de color marrón oscuro. En su juventud este tipo de serpiente presenta un color amarillo verdos brillante en la cola, la cual se va desvaneciendo a un color marrón en su adultez.²⁴



Figura 3. *Agkistrodon contortrix laticinctus*²⁴

CAPITULO II

2. UBICACIÓN, MATERIALES Y METODOS

2.1. UBICACIÓN

Todos los procedimientos realizados en el presente trabajo de investigación, fueron realizados en:

- Las pruebas de cromatografía de interacción hidrofóbica, electroforesis en PAGE-SDS, geles biodimensionales y la determinación fosfolipásica, fueron desarrollados en el Laboratorio de Química de Proteínas F-401, del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María.
- Los estudios de la actividad pro-inflamatoria en cultivo celular de mioblastos y miotubos fue realizado en el Laboratorio de ciencias biológicas de la Universidad San Antonio Abad del Cusco bajo la supervisión de la Doctora María Holgado Rojas.

2.2. MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

- Veneno crudo de *Bothrops barnetti*.
- Veneno crudo de *Agkistrodon piscivorus leucostoma*.
- Veneno crudo de *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

MATERIAL DE VIDRIO

- Placas Petri.
- Tubos de 16 x 150 mm.
- Asa de drigalski.
- Laminas porta objetos.
- Matraces.
- Probetas.

EQUIPOS, APARATOS E INSTRUMENTOS

- Incubadora.
- Refrigeradora.

- Autoclave.
- Microscopio.
- Micropipetas 0.5-10 uL, 20-200 uL, 100-1000 uL, 1-5 mL.
- Cámara de flujo laminar.
- Centrifuga refrigerada.
- Cámara de Neubauer.
- Espectrofotómetro UV visible.
- Equipo de electroforesis.
- Columnas sistema HItap
- Placas de poliacrilamida.
- Miniplacas SE 250 Mighty Small II.
- Densitómetro Image Scanner III.
- Placa de ELISA.

REACTIVOS

- Solución de acrilamida.
- Tampón Tris-HCl 0,5 M, pH=6,8.
- Tampón Tris-HCl 1M, pH=8,8.
- SDS (Sodium dodecyl Sulfate).
- Tampón Tris-HCl 0,075M, pH 6,8.
- Glicerol.
- Bromofenol.
- Solución Comassie Blue.
- Ácido acético al 7%.
- DTT (Ditiotreitol).
- Solución de iodoacetamida.
- Ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico.
- Ácido acético al 30%.
- Anticuerpos monoclonales anti-IL-6 y anti-IL-1.
- Suero fetal bovino.
- Orthophenyldiamine (OPD).

PROGRAMAS Y SOFTWARE

- Software Image Master Platinum 7.0.

2.3. METODOS

2.3.1. VENENOS, REACTIVOS Y EQUIPOS

Todos los solventes, productos químicos y reactivos químicos utilizados fueron de alto grado de pureza, procedentes de Aldrich (Aldrich Chemical Co, Inc. - Wisconsin, U.S.A.), Applied Biosystems (Applied Biosystems - Perkin Elmer Division, U.S.A.), Bio-Rad (Bio Rad Laboratories - California, U.S.A.), Merck (Merck - Darmstadt, Germany), Sigma (Sigma Chemical Co - St. Louis, U.S.A.), Pierce (Pierce Chemical Company - Illinois, U.S.A.).

Los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*, fueron cedidos por el Dr. Luis Alberto Ponce Soto. Los experimentos fueron realizados en 2 laboratorios compartidos:

2.3.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

Las PLA₂ del veneno de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* son purificadas en columnas del sistema HITrap (H&C USA.) El sistema cromatográfico usado, es el de cromatografía convencional. Fueron colectadas fracciones de 1mL. por tubo determinándose actividad enzimática. Las fracciones que exhibían mayor actividad fosfolipásica A₂ y/o masa de 14 kDa fueron empleadas para la obtención del “pool” y guardadas a 0°C.

2.3.3. ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS.

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada siguiendo la metodología descrita por Laemmli, en que las placas de poliacrilamida (PAGE) serán preparadas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas serán preparadas utilizando una solución de acrilamida stok (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % se preparará usando un tampón Tris-HCl 0.5M de pH = 6,8 y el gel de corrida será preparado usando tampón Tris-HCl 1M de pH = 8,8. A ambos geles se les agregará SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

La corrida electroforética fue realizada en un sistema doble de miniplacas SE 250 Mighty Small II (Hoeffer scientific instruments). Tanto las muestras y los marcadores de masa molecular fueron disueltos en tampón de muestra (Tris-HCl 0,075M; pH = 6,8; 10% glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). La corrida electroforética fue realizada a 30 mA. Los geles fueron coloreados con solución de Comassie Blue 0,05% a 37°C, y el exceso de colorante fue removido con ácido acético al 7%.

2.3.4. GELES BIODIMENSIONALES (2D)

La electroforesis bidimensional se utilizó para las proteínas separadas en la primera dimensión por enfoque isoeléctrico (IEF) y en la segunda dimensión por peso molecular mediante electroforesis en SDS-PAGE. Los geles en dos dimensiones fueron realizados según O'Farrell (1975). Para la primera dimensión se utilizaron tiras de gradiente de pH IpG de General Electric (U.S.A.), con un rango de pH distribuido linealmente entre 3 y 10, de siete centímetros de longitud. El protocolo para el uso de estas tiras comprende tres pasos:

- Rehidratación: 18 horas en una solución buffer DeStreak™ (GE Health Care Amersham Biosciences) que contiene: urea, tiourea, CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (Sigma Aldrich U.S.A.) y 1% de anfólitos con rango lineal de pH 3 a 10; en esta solución se disolvieron los extractos proteicos de las muestras. Para cada muestra se colocó un volumen de extracto que correspondía aproximadamente a 15 µg de proteínas.
- Equilibración: dos incubaciones de 15 minutos cada una con ditiotreitól (DTT) al 1% en buffer de equilibrio (úrea, Tris-HCl, glicerol, SDS y azul de bromofenol) y otra con una solución de iodoacetamida al 4% en buffer de equilibrio.
- Enfoque: Finalmente las tiras se colocaron en una cámara de isoelectroenfoque utilizando el equipo Ettan IPGphor (GE Health Care Amersham Biosciences U.S.A.) y las especificaciones del fabricante.

IEF se realizó utilizando geles prefabricados Immobiline DryStrip, de rangos de pH 3-10 (24 cm-IPG tira) usando una unidad de IPGphor (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). En cada gel, se cargó 1 mg de proteína. La tira IPG y la muestra se cubrieron con Dry Strip, cubierta de fluido (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se

corrieron a voltaje constante de 100V durante 12h y 500V hasta la acumulación de 500Vh, seguido por el voltaje de gradiente desde 500 a 1000V hasta la acumulación de 800Vh, otra gradiente de tensión desde 1000 a 10000Vh hasta la acumulación de 16500Vh, y el voltaje constante de 10000V hasta la acumulación de 22200Vh.

IEF fue seguida por una SDS-PAGE usando geles de resolución de 10%, de acuerdo con el protocolo de Laemmli (1971), en el sistema de DALTsix (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Los geles se corrieron a amperaje constante de 15mA y la tensión constante de 80V durante 1h y el amperaje entonces constante de 60mA y el voltaje constante de 500V. Los spots de proteínas se visualizaron utilizando azul de Coomassie R350 de acuerdo al protocolo de tinción de acuerdo con GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Cada muestra se analizó por triplicado. La adquisición de imágenes de los geles se realizó utilizando el densitómetro Image Scanner III (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y los geles fueron analizados mediante el software Image Master Platinum 7.0 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

Los spots se cuantificaron utilizando el criterio del porcentaje (%) de volumen del área, que se calcula automáticamente por el software ImageMaster. El análisis de identidad (estadístico) se llevó a cabo en un modo automático, y una edición manual, se realizó para corregir los puntos coincidentes y no coincidentes. Un criterio de $P < 0.05$ se utilizó para definir la diferencia significativa en el análisis de los spots emparejados entre los dos grupos (n 3) de acuerdo con la ANOVA.

Análisis de Imágenes

Una vez teñidos los geles, se llevó a cabo un análisis comparativo de los mismos, para ello se fotografiarán con un equipo Perkin Elmer (Waltham MA, Estados Unidos) modelo ProXCISION. Las imágenes digitales obtenidas fueron analizadas empleando el programa Phoretix 2D versión 2004. Este programa, mediante la comparación de imágenes digitales de los diversos geles, permitieron analizar los geles de electroforesis bidimensionales y determinar la presencia de manchas o spots comunes. Como criterios que permitirán ubicar las zonas de las imágenes de los geles donde se ubicaron las proteínas de interés, el resultado del inmuno-ensayo también fue digitalizado e introducido como referencia en el análisis de los geles, y se utilizaron valores teóricos de punto isoeléctrico y masa molecular para calibrar todo el experimento.

2.3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPÁSICA A₂

La determinación de la actividad fosfolipásica A₂ fue realizada según el método descrito por Cho & Kézdy, (1991) y Holzer & Mackessy (1996), se utilizó como sustrato el ácido 4-nitro-3- (octanoiloxi) benzóico. Se utilizaron muestras con una concentración inicial de 1,0 mg/ml. en el caso del veneno total y fosfolipasa A₂ aisladas. El ensayo contiene 0,5 ml. de muestra, 0,5 ml de sustrato y 4,0 ml. de tampón Tris-HCl 0,1M Ca²⁺ 0,01M pH 8.0. Las muestras se encontraron en una concentración final de 0,1 mg en 5 ml del volumen final de reacción y se incubaron por 20 minutos a 37°C. Enseguida la reacción fue bloqueada con ácido acético al 30%.

2.3.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PRO INFLAMATORIA EN CULTIVO CELULAR DE MIOBLASTOS Y MIOTUBOS (C2C12)

La actividad citotóxica pro-inflamatoria, fue estudiado en cultivo celular de mioblastos y miotubos C2C12, por la acción de las PLA₂ procedentes de la purificación a partir de los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

Se utilizó como diseño experimental, una microplaca de 96 pocillos, eligiendo un n de 3, correspondientes a 3 pocillos previamente llenados con un cultivo celular de mioblastos C2C12, en medio DME con 10 – 15% de suero fetal bovino (FBS) a 37°C y 5% CO₂ (50 µL) previamente incubado en estufa de cultivo celular.

Luego de remover 150 µl de medio (sobrenadante), se agregaron 150 µl de muestra previamente disueltos en PBS, conteniendo las siguientes concentraciones: 5, 10, 20 y 40 µg. Se consideran dos tipos de controles: positivos en presencia de Triton X-100 (+) y negativos solo en presencia de medio de cultivo DME que contenga 1% de suero fetal bovino (-), con el fin de poder establecer parámetros porcentuales (%) de 0 a 100% de cuantificación de lactato deshidrogenasa (LDH).

Después de 3 horas, se retiraron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo y se determinará la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), liberada como resultado de la lisis celular por acción de la PLA₂ en estudio.

El medio de reacción contenía 1ml del sustrato preparado según el kit del fabricante (LDH-P UV Optimized UV Method SFBC Lab. Winer), previamente incubado

durante dos minutos a 30°C. Luego se agregaron 80 µL del sobrenadante, luego se incubó durante aproximadamente 3 minutos. Y luego se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm. Luego del valor obtenido como negativo, se convierte en positivo simple y se multiplica por 1000. El valor obtenido se convierte en valor porcentual (%), en relación al control positivo máximo encontrado con el Triton X-100.

2.3.7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA

Citoquinas

Los niveles de citoquinas IL-6 y IL-1 en mioblastos y miotubos (C2C12) fueron realizados a través de la técnica de ELISA (Enzyme-Like ImmunoSorbent Assay).

Brevemente, las placas de ELISA se revistieron con 100µl (1µg/mL) de los anticuerpos monoclonales anti-IL-6 y anti-IL-1. En tampón de carbonato sódico 0,1 M (pH 8,2) y se incuban durante 6 horas a temperatura ambiente. Los pozos son lavados con 0,1% tampón fosfato salino (PBS/Tween-20) y se bloquea con 100µl de 10% de suero fetal bovino (FCS) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, por duplicado, las muestras de suero de 50 µl, se añaden a cada pocillo. Después de 18 horas de incubación a 4°C, los pocillos se lavan y se incuban con 100µl (2µg/mL) de los anticuerpos biotinilados monoclonales anti-IL-6 y anti-IL-1 como segundos anticuerpos durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado final, la reacción se desarrolla mediante la adición de orthophenyldiamine (OPD) a cada pocillo. Las densidades ópticas se miden a 405 nm en un lector de microplacas. El contenido de citoquinas de cada muestra se lee a partir de una curva estándar establecida con las citocinas recombinantes apropiados (expresado en picogramos por mililitro). Los niveles mínimos de cada uno de citoquinas detectable en las condiciones de los ensayos son de 10 pg / ml para la IL-6 e IL-1 y 300 pg / ml.

Para medir la citotoxicidad de TNF-α presente en mioblastos y miotubos (C2C12), un ensayo estándar con células L-929, una línea celular de fibroblastos continua se utiliza como se ha descrito previamente por Ruff M R and Gifford G E, (1980). El porcentaje de citotoxicidad se calcula como sigue: $(A_{control} - A_{sample} / A_{control}) \times 100$. Los títulos se calculan como el recíproco de la dilución de la muestra en la que

se lisa 50% de las células en la monocapa. La actividad del TNF- α se expresa como unidades/ml, estimados a partir de la relación de una dosis de 50% citotóxico de la prueba estándar de TNF- α recombinante.

2.3.8. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron representados por la media de experimentos error padrón. La significancia es obtenida a través del test no-pareado t-Student y considerado como $p < 0,05$.



CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA DE LAS PLA₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

De acuerdo a la metodología descrita, fueron aplicados 1 ml de veneno total de *Bothrops barnetti* disueltos en agua desionizada y posteriormente centrifugada a 3000 rpm y el sobrenadante aplicado a una columna de Interacción Hidrofóbica mini HiTrap HIC, utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0,05M a 1M. Se obtuvieron 8 picos denominados 1 al 8, como se puede apreciar en la figura 4. La medida de actividad fue monitoreada a 280 nm. La actividad fosfolipásica A₂, fue registrada en el pico 7, con el cual se procedió a realizar el “pool” respectivo para su posterior liofilización y ensayos físico-químicos, cuanto farmacológicos.

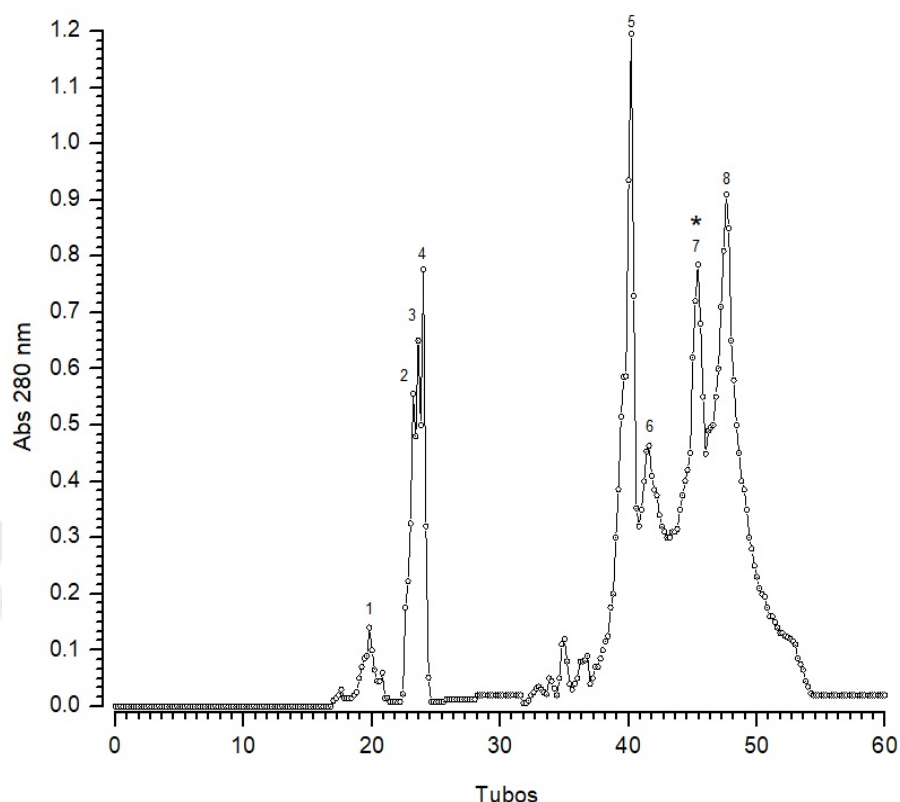


Figura 4. Perfil cromatográfico de purificación de una PLA₂ a partir de veneno total de *Bothrops barnetti* (1 ml) en una columna de Interacción Hidrofóbica mini HiTrap HIC, equilibrada con tampón acetato de sodio 100mM, pH 5.0 con un flujo de 0.5 ml/min. Se colectaron fracciones de 250 μ L.

De acuerdo a la metodología descrita, fueron aplicados 1 ml de veneno total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* disueltos en agua desionizada y posteriormente centrifugada a 3000 rpm y el sobrenadante aplicado a una columna de Interacción Hidrofóbica mini HiTrap HIC, utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0,05M a 1M. Se obtuvieron 8 picos denominados 1 al 8, como se puede apreciar en la figura 5. La medida de actividad fue monitoriada a 280 nm. La actividad fosfolipásica A₂, fue registrada en el pico 5, con el cual se procedió a realizar el “pool” respectivo para su posterior liofilización y ensayos físico-químicos, cuanto farmacológicos.

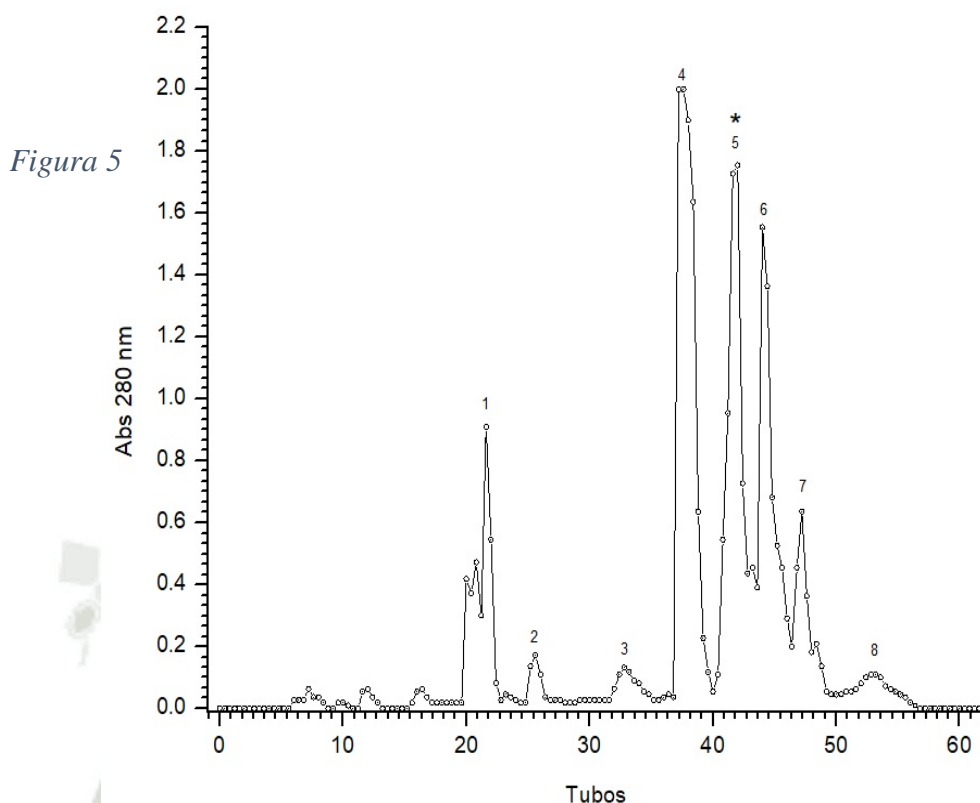


Figura 5. Perfil cromatográfico de purificación de una PLA₂ a partir de veneno total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* (1 ml) en una columna de Interacción Hidrofóbica mini HiTrap HIC, equilibrada con tampón acetato de sodio 100mM, pH 5.0 con un flujo de 0.5 ml/min. Se colectaron fracciones de 250 μ L.

De acuerdo a la metodología descrita, fueron aplicados 1 ml de veneno total de *Agkistrodon contortrix laticinctus* disueltos en agua desionizada y posteriormente centrifugada a 3000 rpm y el sobrenadante aplicado a una columna de Interacción Hidrofóbica mini HiTrap HIC, utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0,05M a 1M. Se obtuvieron 10 picos denominados 1 al 10, como se puede apreciar en la figura 6. La medida de actividad fue monitoriada a 280 nm. La actividad fosfolipásica A₂, residual fue registrada en el pico 9, con el cual se procedió a realizar el “poll” respectivo para su posterior liofilización y ensayos físico-químicos, cuanto farmacológicos.

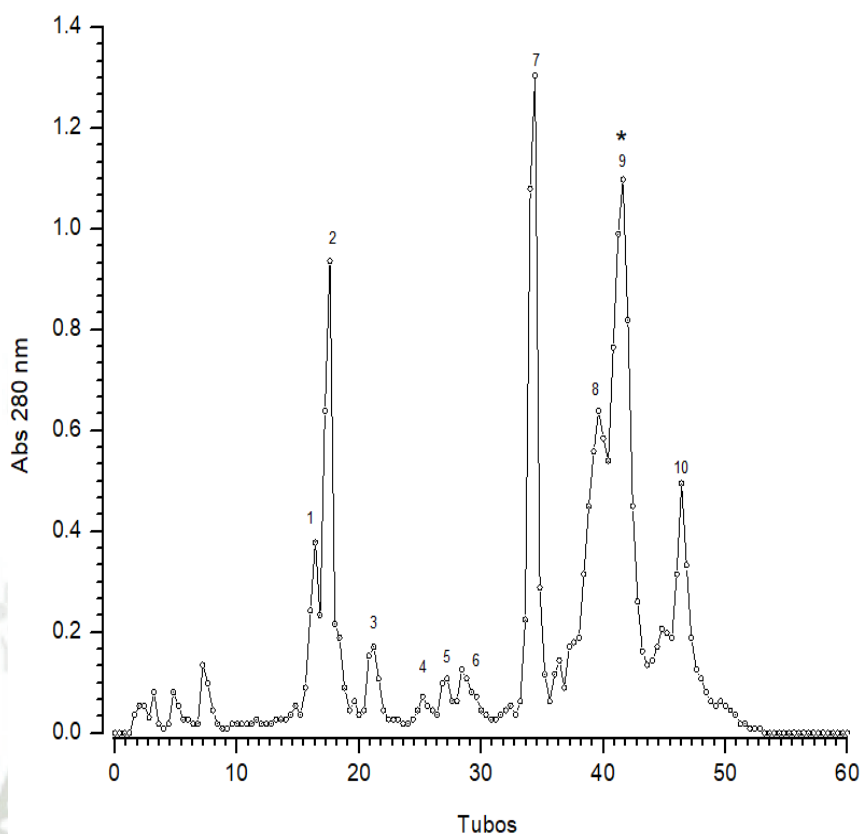


Figura 6. Perfil cromatográfico de purificación de una PLA₂ a partir de veneno total de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (1 ml) en una columna de Interacción Hidrofóbica mini HiTrap HIC, equilibrada con tampón acetato de sodio 100mM, pH 5.0 con un flujo de 0.5 ml/min. Se colectaron fracciones de 250 μ L.

3.1.2. ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS DE LAS PLA₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

El perfil de masa molecular en SDS-PAGE, de las fosfolipasas A₂ purificada a partir de los venenos totales de *Bothrops barnetti* (1), *Agkistrodon piscivorus leucostoma* (2) y *Agkistrodon contortrix laticinctus* (3), evidencian una masa molecular alrededor de 14 kDa con una alta homogeneidad molecular, tal como se muestra en la Figura 7. Padrones de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa).

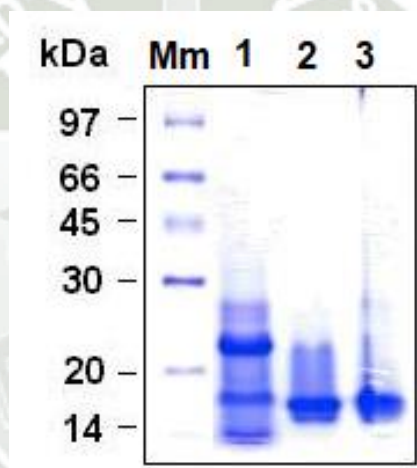


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (12.5 %) de las fosfolipasas A₂ aisladas a partir de los venenos totales de *Bothrops barnetti* (1), *Agkistrodon piscivorus leucostoma* (2) y *Agkistrodon contortrix laticinctus* (3). Mm marcadores de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa).

3.1.3. ELECTROFORESIS BIODIMENSIONAL (2D) DE LAS PLA₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

El perfil de masa molecular en electroforesis bidimensional en presencia de dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE 2D, de dos (2) posibles isoformas de fosfolipasas A₂ purificada a partir del veneno total de *Bothrops barnetti* con masas de ~14 kDa y rangos de pH 7.6 y 7.8 y con un alto grado de homogeneidad molecular, tal como se muestra en la Figura 8.

Padrones de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa) y rangos de pH entre 6.0 a 8.5.

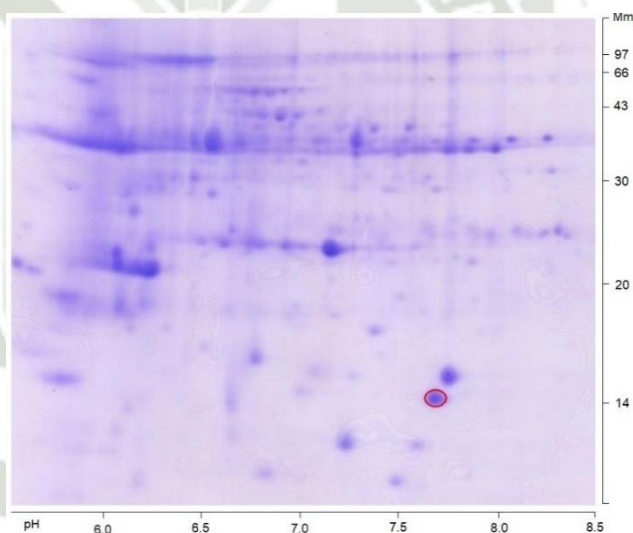


Figura 8. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS 2D) (12.5 %) de (2) dos posibles isoformas fosfolipasas A₂ aisladas a partir del veneno total de *Bothrops barnetti*. Mm marcadores de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa).

El perfil de masa molecular en electroforesis bidimensional en presencia de dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE 2D, de una fosfolipasa A₂ purificada a partir del veneno total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* con masas de ~14 kDa y rangos de pH 7.6 y 7.8 y con un alto grado de homogeneidad molecular, tal como se muestra en la Figura 9.

Padrones de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa) y rangos de pH entre 6.0 a 8.5.

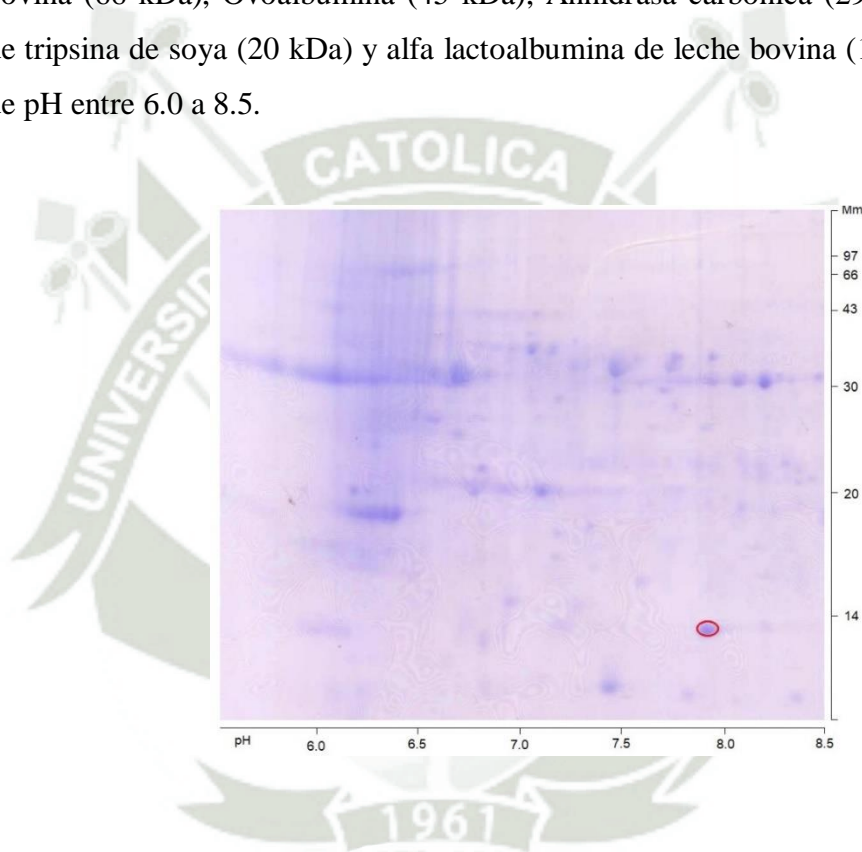


Figura 9. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS 2D) (12.5 %) de una fosfolipasa A₂ aislada a partir del veneno total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma*.

Mm marcadores de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa) y rangos de pH entre 6.0 a 8.5.

El perfil de masa molecular en electroforesis bidimensional en presencia de dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE 2D, de una fosfolipasa A₂ purificada a partir del veneno total de *Agkistrodon contortrix laticinctus* con masas de ~14 kDa y rangos de pH 7.6 y 7.8 y con un alto grado de homogeneidad molecular, tal como se muestra en la Figura 10.

Padrones de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa) y rangos de pH entre 6.0 a 8.5.

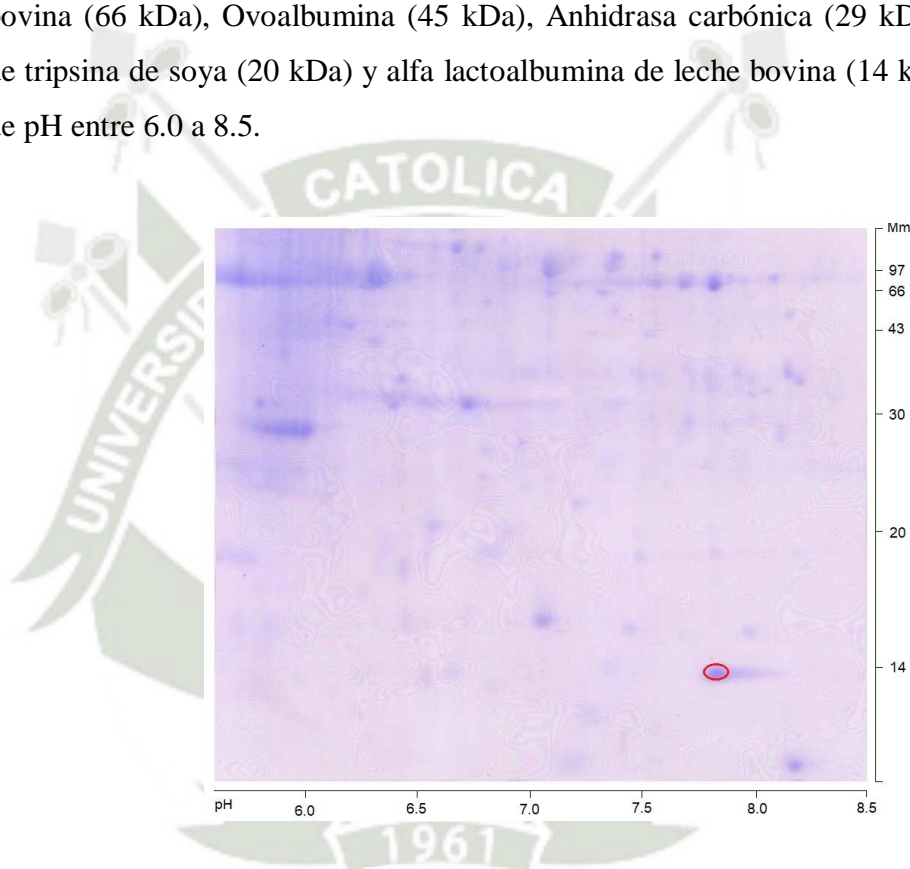


Figura 10. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS 2D) (12.5 %) de una fosfolipasa A₂ aislada a partir del veneno total de *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

Mm marcadores de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa) y rangos de pH entre 6.0 a 8.5

3.1.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPÁSICA A2 PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

La actividad de PLA₂ se expresa como velocidad de reacción inicial (Vo). El valor de actividad de las PLA₂ purificadas y de los venenos totales de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* se muestra en la figura 11.

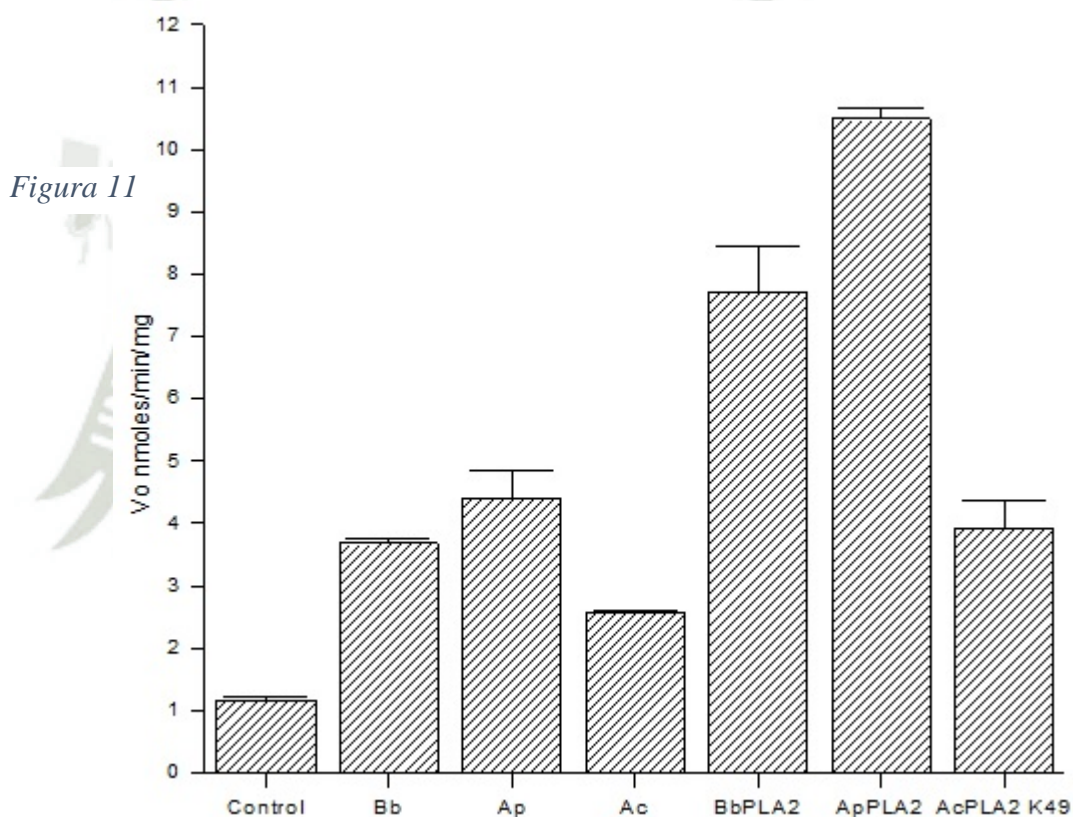


Figura 11. Actividad PLA₂ de los venenos totales de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* y de las fracciones PLA₂ BbPLA₂, ApPLA₂ y AcPLA₂ K49 utilizando el sustrato cromogénico 4-nitro-3-(octanoiloxi) ácido benzoico (NOAB).

La tabla 2 muestra los valores de actividad enzimática de los venenos totales en comparación con la actividad de cada PLA₂ purificada BbPLA₂, ApPLA₂ y AcPLA₂, de cada veneno de *Bothorps barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*, sobre el sustrato 4-nitro-3- (octanoiloxi) ácido benzoico (NOAB).

Muestra	Actividad: Vo nmoles/min/mg
Control	1.17 ± 0.0628
V.T. de <i>Bothorps barnetti</i>	3.68 ± 0.0785
V.T. de <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> y <i>Agkistrodon</i>	4.41 ± 0.4317
V.T. de <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	3.77 ± 0.0424
PLA ₂ BbPLA ₂	7.7 ± 0.7373
PLA ₂ ApPLA ₂	10.49 ± 0.166
PLA ₂ AcPLA ₂ K49	3.93 ± 0.4263

Tabla 2. Actividad PLA₂ de fracciones correspondientes a los venenos de *Bothorps barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*

3.1.5. ACTIVIDAD PRO INFLAMATORIA EN CULTIVO CELULAR DE MIOBLASTOS Y MIOTUBOS (C2C12) DE LAS PLA₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

El efecto citotóxico ensayado en cultivo celular de mioblastos y miotubos (C2C12) de las fracciones con actividad PLA₂ BbPLA₂, ApPLA₂ y AcPLA₂, procedentes de los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* en la dosis de 10 µg, muestran un comportamiento citotóxico en razón del incremento de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), los cuales se incrementan significativamente tras la adición de las fracciones, tal como se muestra en la figura 12 y sus respectivos valores en la Tabla 3 .

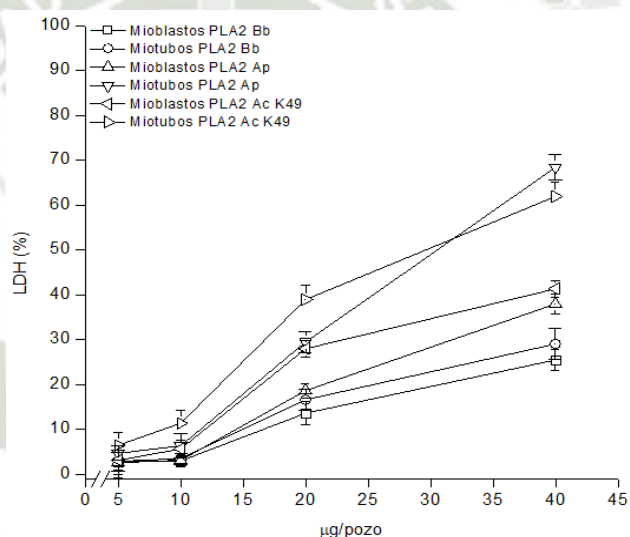
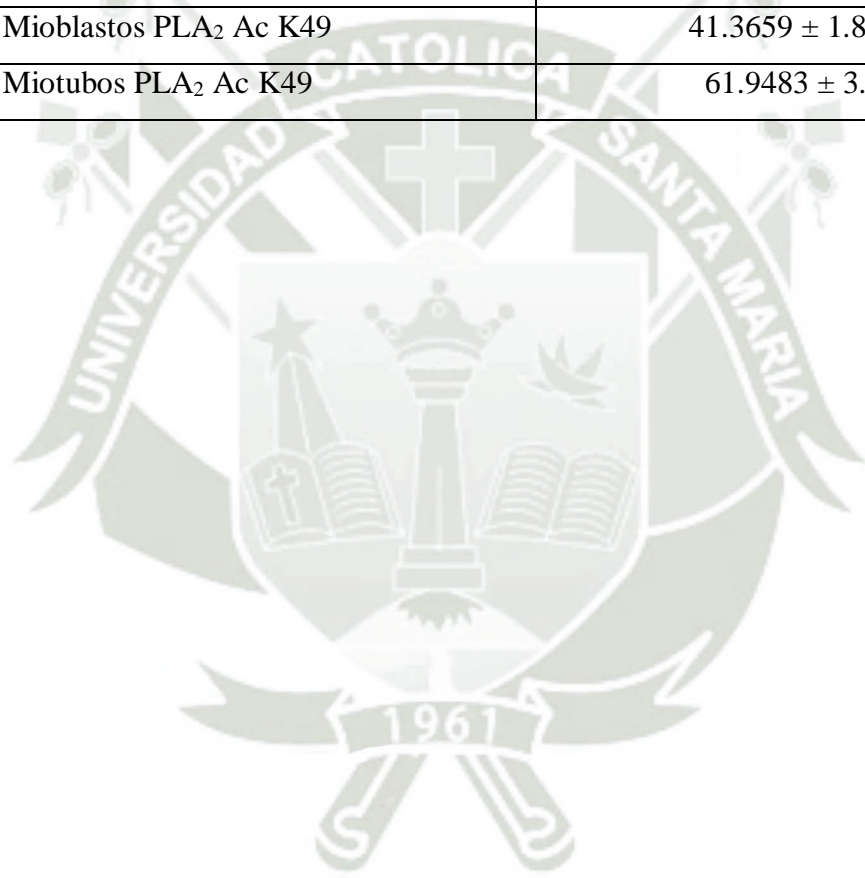


Figura 12. Representación gráfica de la actividad citotóxica de las fracciones con actividad PLA₂ BbPLA₂, Ap PLA₂ y Ac PLA₂ K49 procedentes de los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* “in vitro”, bajo cultivo celular de mioblastos y tubos (C2C12). La lisis celular se estimó por la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) del sobrenadante, después de 3 horas de exposición de la fracción, en un volumen de 150 µL/pocillo. Cada punto representa la media ± DE del cultivo celular por triplicado.

Tabla 3. Porcentaje (%) de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) por acción de PLA₂ procedentes de los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*

<i>Fracción de PLA₂</i>	<i>Porcentaje (%) de LDH</i>
Mioblastos PLA ₂ Bb	25.49532 ± 2.3961
Miotubos PLA ₂ Bb	29.05203 ± 3.45272
Mioblastos PLA ₂ Ap	37.9846 ± 2.1597
Miotubos PLA ₂ Ap	68.4573 ± 2.948
Mioblastos PLA ₂ Ac K49	41.3659 ± 1.87934
Miotubos PLA ₂ Ac K49	61.9483 ± 3.184



3.1.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PRO INFLAMATORIA. DOSAJE DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINAS IL-1 E IL-6 DE LAS PLA₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

Se inyectaron 10 µg de la PLA₂ purificada a partir del veneno de *Bothrops barnetti* en mioblastos y miotubos (C2C12) y se midió la concentración de IL-1 en el plasma. La fracción PLA₂ provocó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL-1, en comparación con el control, alcanzando un aumento máximo a las 6 horas de la aplicación (160.01 ± 7.0 pg/ml). Veinticuatro horas después de la inyección, la concentración de IL-1 disminuye, alcanzando niveles plasmáticos normales después de las 24 horas (Figura 13).

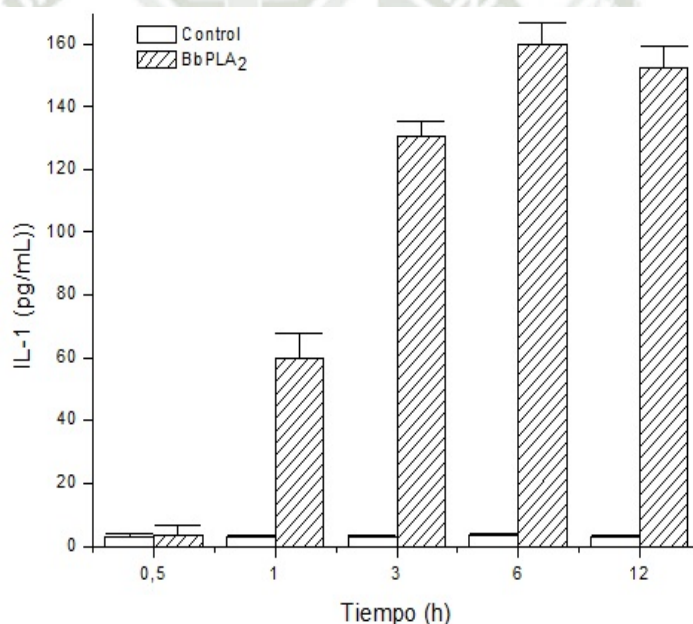


Figura 13. Niveles de concentración de interleucina 1 (IL-1) en plasma inducidos por 10 µg de la PLA₂ Bb en mioblastos y miotubos (C2C12). La concentración de IL-1 en plasma se determinó a diferentes horas después de la aplicación de la toxina.

Se inyectaron 10 μg de la PLA₂ purificada a partir del veneno de *Bothrops barnetti* en mioblastos y miotubos (C2C12) y se midió la concentración de IL-6 en plasma. La fracción PLA₂ provocó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL-6, en comparación con el control, alcanzando un aumento máximo a las 3 horas de la aplicación (115.45 ± 2.67 pg/ml). Veinticuatro horas después de la inyección, la concentración de IL-6 disminuye, alcanzando niveles plasmáticos normales después de las 24 horas (Figura 14).

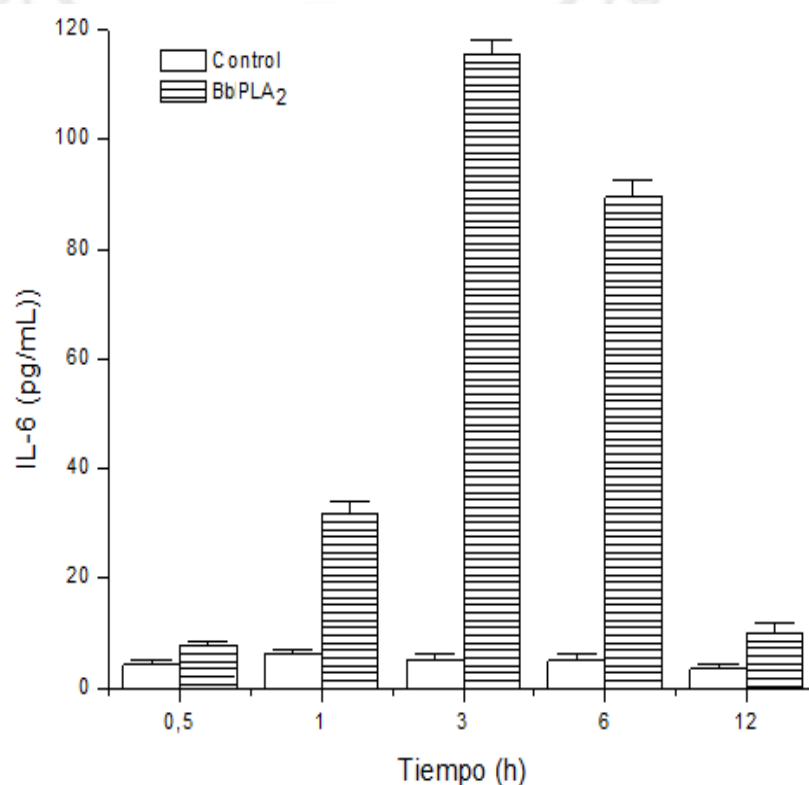


Figura 14. Niveles de concentración de interleucina 1 (IL-6) en plasma inducidos por 10 μg de la PLA₂ Bb en mioblastos y miotubos (C2C12). La concentración de IL-6 en plasma se determinó a diferentes horas después de la aplicación de la toxina.

Se inyectaron 10 μg de la PLA₂ purificada a partir del veneno de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* en mioblastos y miotubos (C2C12) y se midió la concentración de IL-1 en plasma. La fracción PLA₂ provocó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL-1, en comparación con el control, alcanzando un aumento máximo a las 6 horas de la aplicación (174.65 ± 5.14 pg/ml). Veinticuatro horas después de la inyección, la concentración de IL-1 disminuye, alcanzando niveles plasmáticos normales después de las 24 horas (Figura 15).

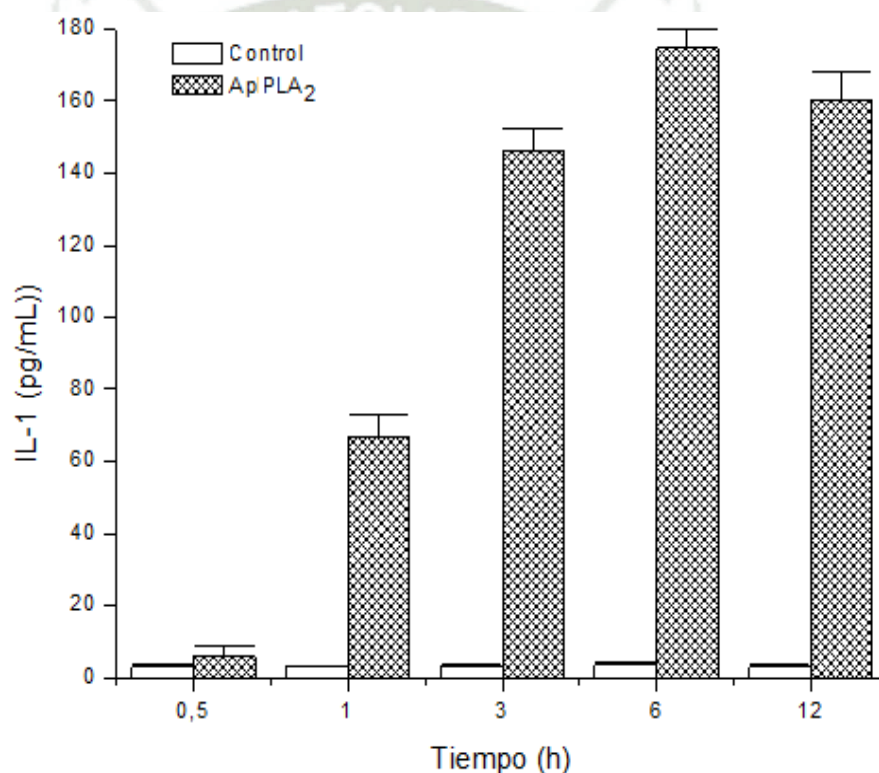


Figura 15. Niveles de concentración de interleucina 1 (IL-1) en plasma inducidos por 10 μg de la PLA₂ Ap purificada a partir del veneno total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y aplicada en mioblastos y miotubos (C2C12). La concentración de IL-1 en plasma se determinó a diferentes horas después de la aplicación de la toxina.

Se inyectaron 10 μg de la PLA₂ purificada a partir del veneno de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* en mioblastos y miotubos (C2C12) y se midió la concentración de IL-6 en plasma. La fracción PLA₂ provocó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL-6, en comparación con el control, alcanzando un aumento máximo a las 3 horas de la aplicación (139.67 ± 2.94 pg/ml). Veinticuatro horas después de la inyección, la concentración de IL-6 disminuye, alcanzando niveles plasmáticos normales después de las 24 horas (Figura 16).

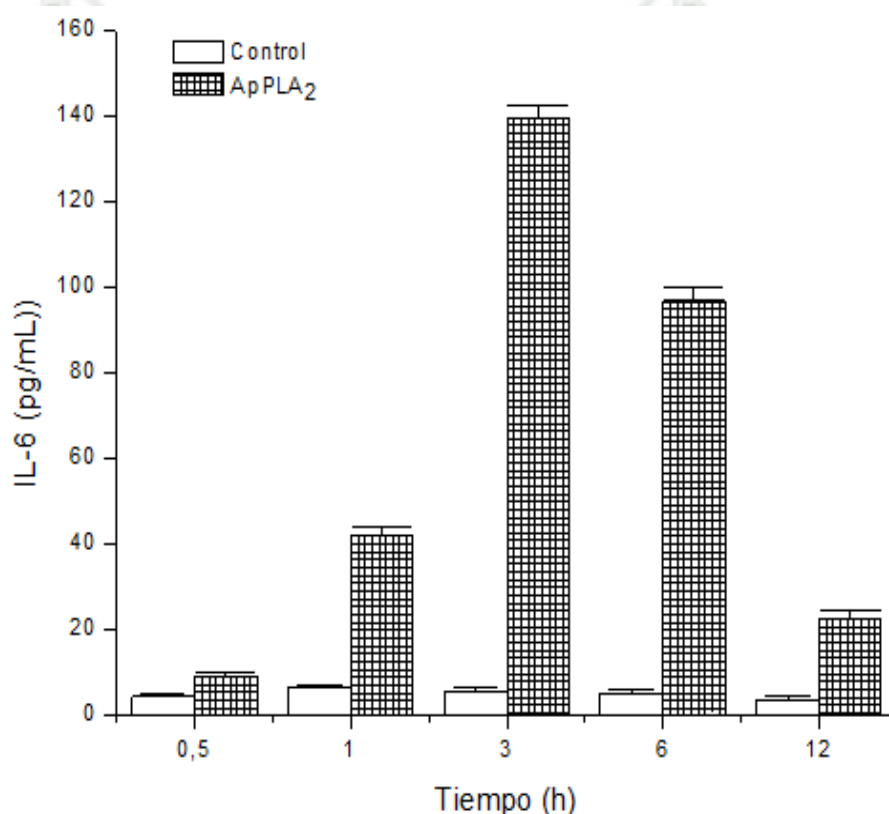


Figura 16. Niveles de concentración de interleucina 1 (IL-6) en plasma inducidos por 10 μg de la PLA₂ Ap purificada a partir del veneno total de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y aplicada en mioblastos y miotubos (C2C12). La concentración de IL-1 en plasma se determinó a diferentes horas después de la aplicación de la toxina.

Se inyectaron 10 μg de la PLA₂ K49 purificada a partir del veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* en mioblastos y miotubos (C2C12) y se midió la concentración de IL-1 en plasma. La fracción PLA₂ provocó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL-1, en comparación con el control, alcanzando un aumento máximo a las 12 horas de la aplicación (187.68 \pm 6.91 pg/ml). Veinticuatro horas después de la inyección, la concentración de IL-1 disminuye no tan drásticamente, alcanzando niveles plasmáticos normales después de las 24 horas (Figura 17).

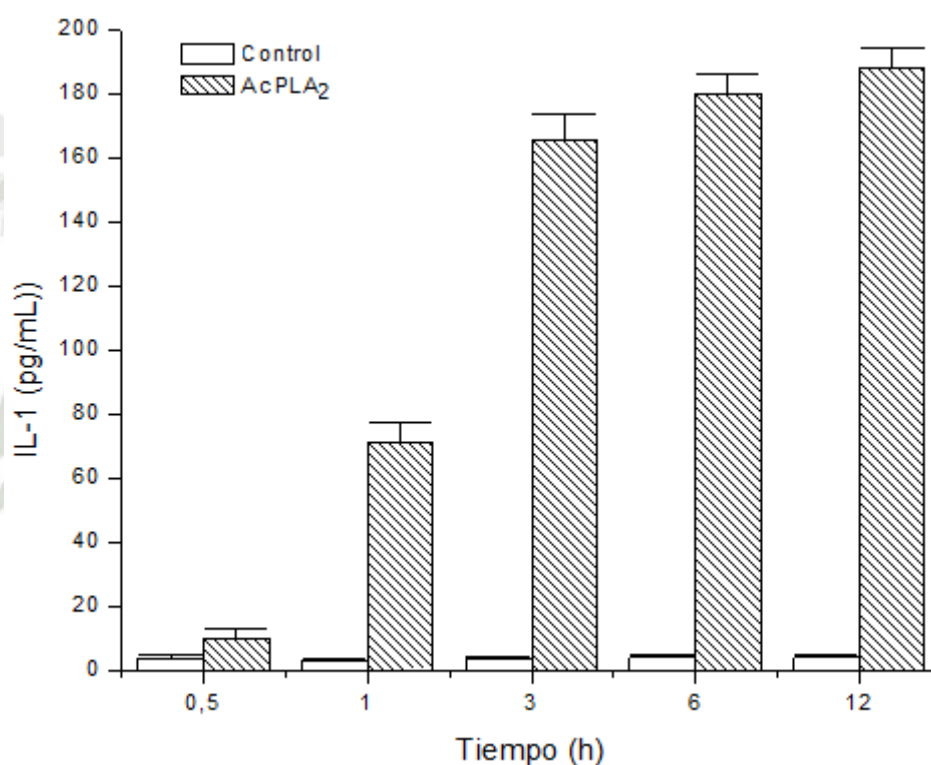


Figura 17. Niveles de concentración de interleucina 1 (IL-1) en plasma inducidos por 10 μg de la PLA₂ Ac K49 purificada a partir del veneno total de *Agkistrodon contortrix laticinctus* y aplicada en mioblastos y miotubos (C2C12). La concentración de IL-1 en plasma se determinó a diferentes horas después de la aplicación de la toxina.

Se inyectaron 10 μg de la PLA₂ K49 purificada a partir del veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* en mioblastos y miotubos (C2C12) y se midió la concentración de IL-6 en plasma. La fracción PLA₂ K49 provocó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL-6, en comparación con el control, alcanzando un aumento máximo a las 3 horas de la aplicación (165.98 ± 3.65 pg/ml). Veinticuatro horas después de la inyección, la concentración de IL-6 disminuye, alcanzando niveles plasmáticos normales después de las 24 horas (Figura 18).

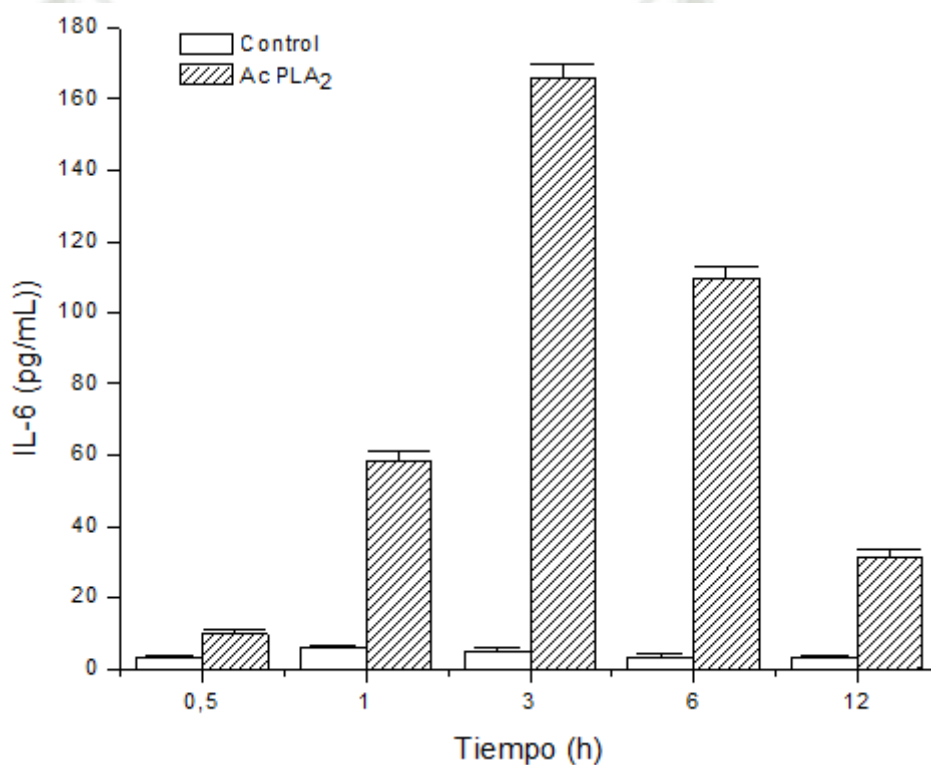


Figura 18. Niveles de concentración de interleucina 1 (IL-6) en plasma inducidos por 10 μg de la PLA₂ Ac K49 purificada a partir del veneno total de *Agkistrodon contortrix laticinctus* y aplicada en mioblastos y miotubos (C2C12). La concentración de IL-6 en plasma se determinó a diferentes horas después de la aplicación de la toxina.

3.2. DISCUSIÓN

En el estado de Amazonia (Perú), los envenenamientos por mordedura de serpiente ocurren por al menos siete serpientes de la familia Viperidae: *Bothriopsis bilineata*, *Bothriopsis taeniata*, *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Crotalus durissus*, *Lachesis muta muta* y *Porthidium hyoprora*; y en la costa del litoral peruano *Bothrops barnetti*. No obstante, se han identificado y caracterizado numerosas PLA₂ a partir de estos venenos, la información sobre las actividades tóxicas de PLA₂ del veneno de *Bothrops barnetti*, aún es escasa.⁵

Según Angulo y Lomonte, el aislamiento y caracterización de los componentes individuales del veneno constituye el sustento de la Toxinología, como estrategia fundamental para analizar y comprender la compleja serie de eventos involucrados en el envenenamiento.²⁵

Agkistrodon piscivorus leucostoma, denominada como serpiente de cascabel de boca de algodón occidental) son serpientes de cascabel grandes, abundantes y típicas de las zonas templadas de la región sureste de los Estados Unidos, que van desde el sur de Virginia hasta el centro de Texas. Son animales semiacuáticos que viven en zonas húmedas, con fuentes de agua dulce, cuerpos de agua, bahías, arenales, lagunas, arroyos, acequias e incluso en el fondo de los ríos. Se les conoce como bocas de algodón por el color blanco dentro de sus bocas. Jia et al., construyeron una biblioteca de ADNc a través de un análisis de los ARN transcritos en glándula de veneno de *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, y ha demostrado que las PLA₂ son las proteínas que constituyen la mayor parte del veneno de esta especie.²⁶ De hecho, Lomonte et al. (2014) también han confirmado que PLA₂ es el principal componente de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* a través de estudios proteómicos comparativos.²⁷ Los estudios han demostrado que hay al menos tres isoformas de sPLA en *Agkistrodon piscivorus leucostoma*: dos básicos (D49 y K49) y uno ácido (D49). Aunque la concentración inusualmente alta de PLA₂ en el veneno de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* (aprox. 35%) se ha convertido en un fuerte punto de interés en la investigación, la comprensión de las actividades farmacológicas y tóxicas de estas moléculas en este veneno específico sigue siendo aún limitada.

Una serpiente de interés desde el punto de vista de la salud pública y que no se encuentra en la amazonia, es la cabeza de cobre de banda ancha *Agkistrodon*

contortrix laticinctus, que se ha descrito en las áreas occidentales de los Estados Unidos, desde las regiones del sur de Kansas y Oklahoma hasta el norte de Texas, alrededor de los 97° Norte y 99° Oeste de 30 a 460 m de altitud.²⁸ La serpiente se encuentra en las riberas de los cursos naturales de agua como arroyos o bancos que están expuestos al flujo de agua solo durante etapas esporádicas de aguas altas y, por lo tanto, mantienen una vegetación escasa. También se encuentran en pequeños hábitats, como un grupo de prados o espacios entre grava, madera descompuesta, colecciones de hojas y flora en descomposición.

Desde un punto de vista médico, Keyler & Vande Voort (1999) reportaron que los envenenamientos por *Agkistrodon contortrix laticinctus* causó síntomas restringidos de dolor, edema y equimosis; y síntomas clínicos combinados más severos apoyados por hiperémesis, diarrea sanguinolenta y hematuria.²⁹

El veneno de cabeza de cobre es altamente hemolítico, con niveles moderados de proteasas, ligeramente alcalino, con presencia de actividad fosfomonoesterasa, L-amino oxidasa y hialuronidasa que actúan sobre la hemostasia y las proteínas de la matriz extracelular. Johnson & Ownby (1993) aislaron una toxina metaloproteínasa hemorrágica de 29 kDa de *Agkistrodon contortrix laticinctus* con actividad “in vitro” frente a la caseína y el fibrinógeno bovino. Pero, no tuvo actividad desfibrinogénante in vivo, aunque el veneno crudo in vitro mostró esta actividad.³⁰

Dado que las PLA₂ K49 homólogas parecían ser enzimáticamente inactivas y, sin embargo, causaban una mionecrosis idéntica a la D49 enzimáticamente activa, se suponía que la hidrólisis de fosfolípidos no desempeñaba un papel en la mionecrosis. Se ha identificado la actividad de PLA₂ en sistemas de cultivo celular tratados con miotoxinas PLA₂ K49 homólogas, incluida la botropstoxina-I del veneno de *Bothrops jararacussu*, ACLMT del veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* y miotoxina II de Veneno de *Bothrops asper*, aumenta los niveles de ácidos grasos libres casi 10 veces, una concentración 1000 veces menor de miotoxina III, una miotoxina D49 PLA₂ de *Bothrops asper*, provoca un aumento mayor. Existen al menos dos posibilidades para explicar la actividad lipolítica observada en la célula a nivel de cultivo celular. La primera es que la toxina en sí es enzimáticamente inactiva y que el estado de la membrana celular o la contribución de un receptor o cofactores asociados a la célula son necesarios para activar las toxinas. La segunda es que la

toxina puede estar activando las lipasas tisulares, ya sea directamente o mediante la señalización de un segundo mensajero.

En el presente trabajo se describe la purificación, caracterización bioquímica/farmacológica de dos PLA₂ purificadas a partir del veneno de *Bothrops barnetti* denominada Bb PLA₂, de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* denominada Ap PLA₂ y de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, una PLA₂ K49 homóloga, con el fin de comprender su participación en los eventos fisiopatológicos provocados por el envenenando a estas serpientes de importancia médica.

Con respecto a la purificación de las proteínas que se encuentran en el veneno de serpientes, los diferentes estudios que se realizaron en las PLA₂ homologas presentaron variados métodos de cromatografía, de los que se podría nombrar la cromatografía líquida convencional, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo, los resultados demostraron que es más eficaz el uso de la cromatografía de intercambio iónico, esto debido a que, la fuerza iónica que produce el tampón de elución va a ser determinante en la elución de las miotoxinas que tienen un carácter básico, esto se debe a que son los últimos componentes en ser eluidos cuando se utiliza gradientes de sales neutras.⁵⁰

Al investigar los compuestos del veneno de serpiente, se ha determinado que las proteínas y las enzimas presentan isoformas, estos son generados por la expresión de uno o variados genes. En cuanto a la PLA₂ homóloga K49 se han aislado y caracterizado bioquímica y farmacológicamente diferentes isoformas en el veneno de serpientes de la familia Bothrops, este hallazgo de isoformas han ocasionado que se realicen mayores investigaciones sobre el tema, intentando determinar metodologías más eficientes para la purificación e identificación de las mismas.⁷

El método de purificación propuesto es adecuado para la purificación de las PLA₂ y la PLA₂ homóloga K49 procedentes de los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* ya que fue posible aislar las proteínas en un único paso cromatográfico a través de una mini columna de hidrofobicidad Hit TRAP, esto debido a que este sistema potencia la separación de las diferentes proteínas de acuerdo a la interacción hidrofóbica en una cromatografía convencional. En las figuras 4, 5 y 6 se muestra el fraccionamiento de los venenos totales dando como una separación de picos proteicos con una alta

selectividad, eficiencia y separación los cuales fueron seleccionados para su caracterización bioquímica y farmacológica.

Las PLA₂ miotóxicas se encuentran conformadas por 110 a 135 residuos de aminoácidos, lo cual demuestra que es una estructura básica; las fosfolipasas se encuentran divididas en dos grupos, un primer grupo de PLA₂ miotóxicas Asp49 (D49) en las cuales se puede encontrar un residuo de Asparragina en la posición 49 lo cual produce que se conserve el dominio para la actividad catalítica, por otro lado tenemos al grupo de PLA₂ miotóxicas Lys49 (K49) las cuales tienen la característica de tener una Lisina en lugar de Asparragina en la posición 49, negando la unión al Ca⁺², lo cual genera una disminución parcial o total de la actividad hidrolítica.⁴

El perfil electroforético en SDS-PAGE en una dimensión (Figura 7), revela que tanto las PLA₂ como la PLA₂ K49 homóloga, presentan una única banda electroforética con una masa molecular relativa en torno a 14 kDa, estando por tanto constituidas por una única cadena polipeptídica, de acuerdo a los reportado para esta familia de proteínas, como es para el caso de Brasilitoxina III de *B. brazili*³¹, bID- PLA₂ de *B. leucurus*³² y LmTX-I de *L. muta muta*³³ siendo algunos de los venenos de serpiente con presencia de PLA₂ de la familia Viperidae que también tienen una estructura monomérica.

Estudios previos con PLA₂ homologas K49 han demostrado que debido a su característica de hidrofobicidad y su fuerte carácter básico tienden a formar dímeros, esto se debe a que los dímeros son la forma más común de polimerización que se encuentran en las PLA₂, empero ocasionalmente se pueden encontrar tetrameros, por este motivo en los estudios realizados durante la última década se puede identificar a estas miotoxinas como proteínas básicas que poseen una masa molecular aproximadamente de 13 a 16 kDa.⁵¹

Por otro lado, la electroforesis bidimensional 2D, muestra la presencia de isoformas de PLA₂ para el caso del veneno de *Bothrops barnetti* (Figura 8), y solo un spot para el caso de la PLA₂ procedente del veneno de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* (Figura 9) y un spot para el caso de la PLA₂ K49 homóloga procedente del veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (figura 10).

Las fosfolipasas A₂ procedentes del veneno de serpientes de la familia viperidae, por ser consideradas como D49 PLA₂ extracelulares de bajo peso molecular,

hidrolizan sustratos en su forma micelar o lipídica, evidenciando así un comportamiento tipo Michaelis-Menten.³⁴ Sin embargo, frente a un sustrato sintético, cromogénico y no micelar, como el ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico, las PLA₂ Bb y Ap, se comportaron como una enzima alostérica que podría estar relacionada con la característica no micelar del sustrato o el arreglo molecular de PLA₂, para formar agregados como dímeros, trímeros o tetrameros, como se presenta para la PLA₂ de *Crotalus durissus cscavella* descrito por Beghini (2000) lo que constituye una diferencia estructural.³⁵

Sin embargo, no todas las enzimas que muestran una curva alostérica pueden considerarse enzimas alostéricas, hecho que sugiere un comportamiento alostérico que debe comprenderse más y mejor.

En la presente investigación, para evidenciar la actividad fosfolipásica se utilizó el ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico, esto nos demuestra que es un sustrato cromogénico no micelar que tiene la característica de poseer un alto grado de sensibilidad, lo cual es ideal para poder determinar la actividad catalítica, esto se debe a que aparenta una reacción similar al de la célula cuando esta entra en contacto con la PLA₂, este sustrato cromogénico ha sido usado en la detección de enzimas, debido que tiene una elevada precisión en la detección fotocolorimétrica.⁵²

El uso del ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico y posterior análisis con un fotocolorímetro en la identificación de la PLA₂, demostró ser más eficaz que otros métodos presentados antiguamente; sin embargo, este método es más complicado y costoso que el uso de fosfolípidos que se obtienen de la yema de huevo como sustrato para luego ser analizados por titulación con NaOH.⁵³

Sabemos que las PLA₂ de venenos de serpientes de la familia viperidae, dependen de calcio, ya que el ion calcio es un cofactor importante para que ocurra la catálisis.³⁴ Para el caso de nuestros experimentos de actividad fosfolipásica A₂. Se evidenció dicha dependencia (Figura 11), tal como los describe Breithaupt (1976) para la PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus atrox* y *Liticauda semifasciata*.³⁶

Las PLA₂, cuando se unen a su sitio “diana”, pueden inducir sus efectos farmacológicos a través de mecanismos dependientes o independientes de su actividad enzimática. En los mecanismos dependientes de la actividad catalítica, el producto de la hidrólisis de los fosfolípidos o los productos liberados, como los

lisofosfolípidos y los ácidos grasos, pueden desencadenar efectos farmacológicos. La actividad enzimática inherente puede hacer que la membrana se rompa y generar un cambio en el entorno de la proteína límite de la membrana, particularmente en la proteína “diana”.³⁷

En mecanismos independientes de la actividad enzimática, PLA₂ como es el caso de la PLA₂ K49 homóloga de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, se une a proteínas diana, provocando el efecto farmacológico y actuando como agonista o antagonista e interfiriendo en la interacción de la proteína “diana” con su ligando fisiológico. Sin embargo, la presencia de PLA₂ catalíticamente activa puede hidrolizar los fosfolípidos en la zona de sus proteínas objetivo, y el efecto farmacológico mostrado es intrascendente. En algunos casos, es probable que los efectos farmacológicos se deban a una combinación de mecanismos específicos y no específicos. Como resultado, se vuelve crítico determinar el papel de la actividad enzimática en la inducción de efectos farmacológicos.³⁷

Los estudios que utilizan una variedad de líneas celulares en cultivo han demostrado que las PLA₂ del grupo II ejercen una amplia actividad citolítica que se correlaciona con su actividad miotóxica “in vivo”. El uso de cultivos de mioblastos y miotubos como “dianas” para las PLA₂ del grupo II se ha propuesto como un modelo in vitro útil para estudiar los mecanismos miotóxicos, pro-inflamatorios, así como su correlación con la actividad de lesión muscular observada “in vivo”. Este estudio investigó si la fusión y diferenciación de los mioblastos C2C12 los hace más susceptibles a la acción citolítica de las PLA₂ Bb de *Bothrops barnetti* y Ap *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y la PLA₂ K49 homóloga de *Agkistrodon contortrix laticinctus*.³⁸

Tanto ambas PLA₂ como la PLA₂ K49 homóloga, no mostraron ningún efecto citolítico sobre las células de mioblastos del músculo esquelético a dosis bajas (5 a 10 µg/pocillo). Sin embargo, se observó claramente una mayor susceptibilidad de los mioblastos y miotubos diferenciados utilizando dosis a partir de 20 y 40 µg/pocillo. Este resultado probablemente se deba a la capacidad de esta toxina para desestabilizar la membrana celular, lo que parece implicar la expresión de un mayor número de receptores en la membrana plasmática. La diferenciación de mioblastos a miotubos debe conducir a cambios que favorezcan específicamente la acción de las

PLA₂ y de las PLA₂ K49 homólogas independiente de la actividad catalítica, todas del grupo II, por lo cual es probable que estos cambios impliquen la expresión de un mayor número, o un tipo de afinidad mayor, de sitios receptores en la membrana plasmática para las PLA₂. Sin embargo, no se puede descartar la posible participación de procesos intercelulares surgidos tras la fusión de mioblastos, como se ha observado causando mayor daño en los miotubos.³⁸

Nuestros resultados de citotoxicidad de las PLA₂ y de las PLA₂ K49 homóloga en mioblastos y miotubos confirman lo propuesto por Angulo y Lomonte (2005), al mostrar un aumento en los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivo de células de miotubos, mostrando una mayor susceptibilidad que en mioblastos C2C12.³⁸

Numerosas PLA₂ de veneno muestran actividad citolítica en otros tipos de células, incluidas las células cancerosas, como *Bothrops jararacussu* PLA₂³⁹, N. naja PLA₂⁴⁰ y MTX PLA₂ -I y II de *Bothrops brazili*⁴¹, entre otros. Varias PLA₂ muestran una alta actividad citotóxica contra varias líneas celulares, como LmTX-I y la toxina de Mojave.⁴²

El mecanismo molecular de acción citotóxica de las PLA₂ aún se desconoce, algunos autores han propuesto que la actividad citotóxica sobre células tumorales está asociada con la inducción de apoptosis⁴³ y se propone que la actividad de PLA₂ acelera el número de células y fosfolípidos, que influyen en los cambios de membrana que se producen durante la apoptosis.⁴⁴ Sin embargo, la relación entre la eficiencia catalítica de PLA₂ y su actividad citotóxica aún no está claramente definida. Algunos homólogos de PLA₂ K49 como MTX-II toxina de mojave de *Crotalus scutulatus*, ejercen sus actividades farmacológicas, incluida la actividad citotóxica, independientemente de la actividad catalítica.⁴¹

Se sabe que las PLA₂ presentes en los venenos de serpientes de la familia viperidae, desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios al proporcionar precursores de sustancias lipídicas pro-inflamatorias, como los mediadores derivados del ácido araquidónico y los factores activadores de plaquetas, pero los mecanismos por los cuales los venenos inducen edema no están claros, lo que hace necesarios más estudios para investigar en detalle si las PLA₂ inducen edema a través de productos de la vía lipoxigenasa o a través de productos de la vía de la ciclooxigenasa.²⁰

La mionecrosis puede ser el impulso para desencadenar la actividad proinflamatoria y la liberación sistémica de interleucina-6 (IL-6), según las observaciones presentadas por la miotoxina II (PLA₂ K49) del veneno de *Bothrops asper*⁴⁵ y BmTX -I de *Bothrops moojeni*.⁴⁶ La IL-6 es la primera citoquina multifuncional implicada en la regulación de la respuesta inmunitaria, la hematopoyesis y la inflamación y se han documentado niveles elevados en envenenamientos clínicos por especies botrópicas.⁴⁷

Tanto las PLA₂ de *Bothrops barnetti* como la PLA₂ K49 homóloga de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, han mostrado ser pro-inflamatorias, al elevar los niveles de IL-1 como IL-6 como fue evidenciado en las figuras 13 al 18 mostrando un efecto local de inicio y recuperación.

Los tejidos dañados por las PLA₂ que ejercen acción local son rápidamente infiltrados por leucocitos. Como en otros procesos agudos, en el envenenamiento en modelos animales en los que se utilizaron venenos botrópicos, las primeras células del infiltrado inflamatorio en extravasarse son los neutrófilos polimorfonucleares, siendo sustituidos progresivamente por la aparición de células mononucleares, monocitos y linfocitos.⁴⁸ Las células infiltradas son una fuente importante de mediadores como las citocinas, producidas no solo por los leucocitos infiltrados, sino también por las células que residen en los tejidos lesionados.

Se observó una rápida inducción de IL-6 detectable sistémicamente desde la primera hora cuando se inyectó en mioblastos y miotubos (C2C12) una miotoxina PLA₂ purificada del veneno de *Bothrops moojeni*, lo que sugiere que la producción de esta citocina depende del daño tisular, iniciando una respuesta de fase aguda.⁴⁶ Se observaron niveles séricos elevados de IL-1, IL-8, interferón-gamma (IFN- λ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO) después de la inyección intraperitoneal del veneno de *Bothrops asper*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox* en un cultivo celular de miotubos (C2C12).⁴⁹ Aún no se ha establecido el papel que juegan estos mediadores en la patogenia del envenenamiento.

CONCLUSIONES

1. Se ha purificado en un solo paso cromatográfico de interacción hidrofóbica en mini columna Hit TRAP, dos (2) PLA₂ procedentes de los venenos de *Bothrops barnetti* y *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y una PLA₂ K49 homóloga de *Agkistrodon contortrix laticinctus*.
2. Se han caracterizado físico-químicamente las dos (2) PLA₂ y la PLA₂ K49 homóloga procedentes de los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* por electroforesis uni y bidimensional confirmando su masa molecular en torno de los 14 kDa para las 3 proteínas.
3. Se ha caracterizado la actividad catalítica fosfolipasa A₂, de las toxinas purificadas a partir de los venenos de *Bothrops barnetti*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y *Agkistrodon contortrix laticinctus* usando como sustrato cromogénico el 4-nitro-3-(octanoiloxi) ácido benzoico (NOAB), evidenciando ser catalíticamente activas las PLA₂ Bb de *Bothrops barnetti* y la Ap de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* y con una actividad catalítica residual la PLA₂ K49 homóloga de *Agkistrodon contortrix laticinctus*.
4. Se ha caracterizado su actividad citotóxica de las 3 proteínas en cultivo celular de mioblastos y miotubos C2C12, evidenciando su actividad citotóxica al elevar los niveles de lactato deshidrogenasas (LDH) como indicador de dicho efecto.
5. Se ha estudiado su comportamiento pro-inflamatorio de las tres (3) proteínas purificadas al elevar los niveles de las interleuquinas IL-1 e IL-6 como un efecto local a lo largo del tiempo de estudio como fue de 24 horas mioblastos y miotubos (C2C12).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meneses O. Los animales venenosos y sus peligros. Instituto de la Salud Publica. Perú. 1974; 2: 3-14.
2. Wilson B., Larsen J., Smelski G., Dudley S., Shirazi F. Use of Crotalidae equine immune F(ab')₂ antivenom for treatment of an Agkistrodon envenomation. *Clinical Toxicology*. 2021.
3. Resende L, Almeida J., Guaraca T., Viegas M., Soares A., et al. Structural, enzymatic and pharmacological profiles of ApITX-II - A basic sPLA₂ (D49) isolated from the Agkistrodon Piscivorus Leucostoma snake venom. UNICAMP BRASIL. 2021.
4. Fletcher JE, Hubert M, Wieland SJ, Gong QH and Jiang MS. Similarities and difference in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. 1996
5. Gutierrez JM. and Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venom. *Toxicon*. 1995; 33(11): 1405-24.
6. Gutierrez JM, Ownby CL and Odell GV. Isolation of a myotoxin from Bothrops asper venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*. 1984; 22(1): 115-28.
7. Bruses J, Capaso J, Katz and Pilar G. Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. *Journal of Neurochemistry*. 1993; 60(3): 1030-1042.
8. Ponce-Soto L, Leiva L and Teizem Landucci C. "Understanding the molecular mechanism and structure-function relationship of the toxicity of PLA₂ and K49 homologs in snake venom". *BioMed Research International*. 2013.
9. Arni R and Ward R. Phospholipase A₂- a structural review. *Toxicon*. 1996; 34(8): 827-41.
10. Ogawa T, et al. Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for Trimeresurus flavoviridis phospholipase A₂ isozymes. 1992.
11. De Hoffman E and Stroobant V. Mass spectrometry principles and applications. 2004.

12. Westermier R and Naven T. Proteomics in practice. WILEY-VCH, Germany. 2002.
13. Ponce-Soto L, et al. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta*. 2007.
14. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*. 2003; 42(8): 885-901.
15. Mebs D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *International J Biochem*. 1970; 1: 335-342.
16. Iwanaga S, Suzuki T. Enzymes in snake venom, in: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag, New York. 1979; 52:61–158.
17. Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 2003; 42(8): 827-40.
18. Lambeau G, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1990; 265(16): 9526-32.
19. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 2003; 42(8): 915-31.
20. Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*. 2003; 42(8): 947-62.
21. Manrique H. Ofidismo. Ministerio de Salud, Perú. 2000.
22. Uetz P, Hallerman J. *Bothrops barnetti*. The reptile database. Disponible en: https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=barnetti&search_param=%28%28search%3D%27bothrops+barnetti%27%29%29
23. Uetz P, Hallerman J. *Agkistrodon piscivorus*. The reptile database. Disponible en: <https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Agkistrodon&species=piscivorus>

24. Uetz P, Hallerman J. *Agkistrodon contortrix*. The reptile database. Disponible en: https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Agkistrodon&species=contortrix&search_param=%28%28search%3D%27Agkistrodon+contortrix+laticinctus%27%29%29
25. Angulo Y, Lomonte B, Calvete J, Sanz L, Gutierrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS letters*. 2009. 583(11): 1736-1743.
26. Jia Y, Cantu B, Sánchez E, Pérez J. Complementary DNA sequencing and identification of mRNAs from the venomous gland of *Agkistrodon piscivorus lucostoma*. *Toxicon*. 2008. 51(8): 1457-1466.
27. Lomonte B, et al. Venomics of new world pit vipers: Genus-wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. *Journal of proteomics*. 2014. 96: 103-116.
28. Campbell JA, Lamar W, Brodie E. The venomous reptiles of the western hemisphere. *Canadian Field Naturalist*. 2004.
29. Keyler D, Vandervoort J. Copperhead envenomations: clinical profiles of three different subspecies. *Europe PMC*. 1999. 41(3): 149-152.
30. Johnson E, Ownby C. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon*. 1993.
31. Huancahuire-Vega S, Ponce Soto L. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (Bb Tx-II and III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. *Toxicon*. 2009.
32. Higuchi D, et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie*. 2007. 89(3): 319-328.
33. Damico D, et al. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2005. 1726(1): 75-86.
34. Holzer M, Mackessy S. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 1996. 34(10): 1149-1155.

35. Beghini D, et al. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* Rattlesnake (Maracambóia) venom. 2000.
36. Breithaupt H. Enzymatic characteristics of *crotalus* phospholipase A2 and the crotoxin complex. *Toxicon*. 1976.
37. Kini R, Evans H. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon*. 1989. 27(6): 613-635.
38. Angulo Y, Lomonte B. Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms. *Cell Biochemistry and Function*. 2005. 23(5): 307-313.
39. Bonfim V, et al. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. *The protein journal*. 2006.
40. Das T, et al. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. *Toxicon*. 2011. 57(7-8): 1065-1072.
41. Costa T, et al. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*. 2008. 29(10): 1645-1656.
42. Damico D, et al. Cytotoxicity of *lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. *Toxicon*. 2007. 49(5). 678-692.
43. Cummings B, Hooks S. Role of Ca²⁺ independent phospholipase A2 in cell growth and signaling. *Biochemical pharmacology*. 2008. 76(9): 1059-1067.
44. Panini S, et al. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *Journal of lipid research*. 2001. 42(10): 1678-1686.
45. Nuñez V, et al. Neutralization of the edema-forming defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2004.

46. Calgarotto A, et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from Bothrops moojeni snake venom. *Toxicon*. 2008. 51(8): 1509-1519.
47. Avila-Aguero M, et al. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatric Emergency Care*. 2001. 17(6): 425-429.
48. Farsky S, et al. Leukocyte response induced by Bothrops jararaca crude venom: In vivo and in vitro studies. *Toxicon*. 1997. 35(2): 185-193.
49. Petricevich L, et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms. *Toxicon*. 2000. 38(9): 1253-1266.
50. Homsí-Brandenburgo M, et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from Bothrops neuwiedi snake venoms: biochemical characterization and biological activity. Departamento de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia- MG, Brazil. 1998
51. Díaz Oreiro C and Gutiérrez JM. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from Bothrops asper and Bothrops godmani snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon*. 1997; 35(2): 241-52.
52. Erlanger B.F. and Goode L. Antibacterial activity of acyclic decapeptide analogs of gramicidin S. *Science*. 1960
53. Geoghegan P, Angulo Y, Cangelosi A, Díaz M and Lomonte B. Characterization of a basic phospholipase A2 homologue myotoxin isolated from the venom of the snake Bothrops neuwiedii (yará chica) from Argentina. *Toxicon*. 1999
54. Yarleque A. Las serpientes peruanas y su veneno. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Peru. 2000.

ANEXOS

1.-Electroforesis

1.1.-Preparación de las soluciones:

1.1.1.- PSA 10% (Persulfato de amonio)

0.1 gr. PSA ----- 1 ml. de agua destilada

10 gr. PSA ----- 100 ml de agua destilada

1.1.2.- Tris HCl 1M pH 8.8

Para 50 ml.

$$1M = \frac{x \text{ mol}}{0.05 L} \rightarrow 0.05 \text{ mol}$$

$$0.05 \text{ mol} \left(\frac{157.6 \text{ gr.}}{1 \text{ mol}} \right) \rightarrow 7.88 \text{ gr.}$$

Corregir el pH para 8.8 con HCl

1.1.3.- Tris HCl 0.5 M pH 6.8

Para 50 ml.

$$0.5M = \frac{x \text{ mol}}{0.05 L} \rightarrow 0.025 \text{ mol}$$

$$0.025 \text{ mol} \left(\frac{157.6 \text{ gr.}}{1 \text{ mol}} \right) \rightarrow 3.94 \text{ gr.}$$

Corregir pH para 6.8 con HCl

1.1.4.- SDS 20%

20 gr. de Sodio dodecil sulfato \rightarrow 100 ml. de agua destilada

1.1.5.- DTT 1M

Masa = 154.

Para 5 ml \rightarrow 0.7715 gr.

Para 2.5 ml \rightarrow 0.3086 gr.

1.1.6.- Running Buffer (Tampón de corrida 10X Tris-HCl 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%, pH8.3)

Tris → 15,2 gr.

Glicina → 72,2 gr.

SDS → 5 gr.

Agua destilada → 500 ml.

1.1.7.- Colorante Azul de Coomasie

Para 250 ml.

Coomasie blue R 250 0.25% → 0.0625g.

Metanol 40% → 100 ml.

Acido acetico al 10% → 25 ml.

Agua 50% → 125 ml.