

## Purificación y caracterización de una nueva PLA<sub>2</sub> del veneno total de *Micrurus spixii*

### Purification and characterization of a new PLA<sub>2</sub> of whole venom of *Micrurus spixii*

Valeriano-Zapana J.A.<sup>1,2</sup>, Cari-Cari Y.M.<sup>4</sup>, Arenas-Chavez C.<sup>3</sup>, Vera-Gonzales C.<sup>4</sup>, Martins-de-Souza D.<sup>5</sup>, Ponce-Soto L.A.<sup>1</sup> y Marangoni S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Institute of Biology (IB), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil;

<sup>2</sup>Immunology Research Group (GII), Faculty of Medicine (FM), National University of San Agustín (UNSA), Arequipa,

<sup>3</sup>University Católica of Santa María, Arequipa, Perú;

<sup>4</sup>Department of Chemistry National University of San Agustín Arequipa (UNSA) Arequipa, Perú

<sup>5</sup>Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany

### Resumen

Fue purificado una nueva PLA<sub>2</sub>, con actividad miotóxica del veneno de *Micrurus spixii* con un alto grado de pureza y homogeneidad molecular, mediante dos pasos cromatográficos: cromatografía de exclusión molecular G-75 (1 cm x 60 cm) y cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (RP-HPLC). La electroforesis en SDS-PAGE muestra una masa molecular ~14 KDa, que fue confirmado por la espectrometría de masa MALDI-TOF con una masa molecular de 14149.005 Da. Esta nueva PLA<sub>2</sub> mostró un potente efecto miotóxico local (vía intramuscular) así como sistémico (vena caudal) en ratones, a una concentración de 20ug/ml y una elevada actividad inflamatoria a una concentración de 5ug/ml. La reproductibilidad de la actividad biológica, a través de los efectos farmacológicos, solo es posible con la utilización de fracciones químicamente homogéneas que mantengan la integridad de la función biológica.

**Descriptores:** PLA<sub>2</sub>, *Micrurus spixii*, miotoxicidad, actividad formadora de edema.

### Abstract

A new PLA<sub>2</sub>, with myotoxic activity, was purified from de venom of *Micrurus spixii*, with a high degree of purity and molecular homogeneity by two chromatographic steps: molecular exclusion chromatography G-75 (1 cm x 60 cm) and high performance liquid chromatography pressure reverse phase (RP-HPLC). The SDS-PAGE electrophoresis shows a molecular mass ~ 14 kDa, which was confirmed by mass spectrometry MALDI-TOF with a molecular mass of 14149,005 Da. This new PLA<sub>2</sub> showed a potent myotoxic local effect (intramuscular way) and systemic too (tail vein) in mice, at a concentration of 20ug/ml compared to other snake of the same gender and high inflammatory activity at a concentration of 5ug / ml. The reproducibility of biological activity through the pharmacological effects is only possible with the use of chemically homogeneous fractions that keep the integrity of the biology activity

**Keywords:** PLA<sub>2</sub>, *Micrurus spixii*, myotoxic, edema-forming activity.

### Introducción

En el Perú se pueden encontrar 9 de las 15 familias de serpientes que se conocen en el mundo y 33 especies venenosas, de las cuales 9 son autóctonas y las 24 restantes son comunes a países vecinos [1,] El Perú ocupa el segundo lugar en Latinoamérica

por su variedad de serpientes, las dos principales familias de serpientes venenosas que habitan en el país son Viperidae y Elapidae [2,3 y 4].

Las serpientes corales comprenden un grupo de casi 50 especies del género *Micrurus* encontradas entre Estados Unidos de América del Norte hasta América del sur, logrando a si una gran diversidad

[5]. No en tanto la acción del veneno y el veneno propio han sido poco estudiados.

Los venenos de las cobras corales son neurotóxicos, poseen neurotoxinas de acción pré y pós-sináptica, también, componentes cardiotoxicos y fosfolipasas A<sub>2</sub>. [6]. La mordida de las cobras del genero *Micrurus* pueden llevar a la muerte por parálisis de los músculos respiratorios [6]. *Micrurus spixii* es una cobra peligrosa, su veneno es potente y de acción rápida.

Hasta hoy no existen trabajos relacionados con el aislamiento y caracterización físico-química o con estudios farmacológicos de fosfolipasas A<sub>2</sub> aisladas a partir del veneno de *Micrurus spixii*, por ello el presente trabajo se torna de gran interés por tratarse de una especie poco estudiada.

En este trabajo se pretende aislar una fracción biológicamente funcional con actividad miotóxica como también edematogénico mostrando así mejor el comportamiento de esta fracción, pudiendo correlacionar su estructura a si como su función biológica. La presencia de un sitio farmacológico distinto del sitio catalítico presente en las PLA<sub>2</sub> puede ser usada como herramienta molecular para el reconocimiento de los receptores de membrana desconocidos en células o tejidos.

## Materiales Y Metodos

### Veneno

El veneno total de *Micrurus spixii* fue donado por la Profa. Dra. Corina Vera Gonzáles, de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa – Perú.

### Animales

Fueron utilizados ratones de la línea SWISS, con peso entre 18-20g, cedidos por el Biotério Central de la Universidad Estadual de Campinas. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las normas establecidas por el comité de ética del Instituto de Biología de la Universidad Estadual de Campinas (Campinas-Brasil).

### Reactantes

Todos los solventes, productos 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.).

### Aislamiento y purificación de la PLA<sub>2</sub>

50 mg del veneno total de *Micrurus spixii* fue disuelto en 1 ml de tampón bicarbonato de amonio 0,05M, pH 8,0 y aplicado en una columna empacada previamente con Sephadex G-75 (60 x 1 cm) y equilibrada con tampón bicarbonato de amonio 0,05M, pH 8,0. (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). La muestra fue colectada a un flujo de 6 ml/min en un colector de fracciones (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). El perfil proteico fue monitoreado a una absorbancia de 280nm en un espectrofotómetro 700Plus (Femto, Brasil). La fracción de interés fue liofilizada y almacenada a -20 °C.

Las fracciones con actividad fosfolipasica PLA<sub>2</sub> fueron repurificadas en una columna u-Bondapack C-18 0,78 X 30cm (preparativa), previamente equilibrada con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% pH 3.5 (Tampón A) acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa. El sistema cromatográfico usado fue de HPLC-PDA 991 (Waters), equipado con dos bombas (Waters) modelo 510/B, un inyector automático de muestras U6K con un loop de 2,0 ml. Inicialmente la elusión de las muestras fue realizada a través de un gradiente lineal con Acetonitrilo 66% (Tampón B), modificado para la optimización de la purificación de las fracciones. La fracción de interés fue liofilizada y almacenada a -20 °C.

### Determinación de la masa molecular Electroforesis en PAGE-SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Las placas de poliacrilamida fueron hechas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas fueron preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % fue preparado utilizándose un tampón Tris-HCl 0.5M de pH = 6,8 y el gel de corrida fue hecho utilizándose un tampón Tris-HCl 1M de pH = 8,8. A ambos geles se les agregó SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

### Análisis por espectrometría de masa por MALDI-TOF(MS)

La masa molecular de la PLA<sub>2</sub> purificada se determino por espectrometría de masa utilizando el sistema MALDI-TOF a través de un Voyager DE PRO MALDI-TOF Mass Spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se mezcló 1 ml de la muestra disuelta en TFA (0,1%) con 2 ul de la matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma), (disuelta en 60% acetonitrilo y 0.1% TFA v/v). La

matriz fue preparada para la calibración correspondiente del equipo, se preparó usando el kit Calmix 3. Las condiciones de trabajo fueron: voltaje de aceleración 25kV, láser fijo en 2890 J/cm<sup>2</sup>, retardo 300 ns y el análisis fue de forma lineal.

#### Determinación de la actividad biológica Determinación de los niveles de CK plasmáticos en ratones inoculados por vía intramuscular (miototoxicidad local) y intravenosa (miototoxicidad sistémica).

La actividad miotóxica fue evaluado a una concentración de 25ug/ml de la PLA<sub>2</sub> para cada experimento, enseguida fue inoculado a nivel intramuscular a si como intravenoso. Fueron evaluados los niveles de CK plasmáticos después de 2, 4, 6, 9 y 24 horas respectivamente. El kit utilizado fue CK – Nac (Creatine Kinase Bicon Diagnostick Germany). A 1ml del sustrato preparado se le adicióno 10 µl del plasma obtenido de la centrifugación del sangrado de la región caudal del ratón. Fueron incubados por 2 minutos y leídos a 430 nm, (Creatine Kinase Bicon Diagnostick Germany).

#### Determinación de la actividad inflamatoria (Edema de pata).

Se realizo utilizando una solución stock inicial de 400 mg/ml de PBS (20 µg/50µl). Después se hicieron diluciones, tomándose 500 µl de la primera y mezclándose con 500µl de PBS (10µg/50µl). Luego se toma 500 µl de esa preparación y se mezcla con otros 500 µl de PBS (5 µg/µl). Y finalmente se realizo la última dilución sobre el mismo procedimiento para alcanzar una concentración de 2,5 µg/50µl.

Se inocula, vía intraplantar 50 µg/50µl, grupos de cinco ratones de 18 a 20 g de peso, determinándose, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas después de la inyección, el porcentaje de edema producido, mediante comparación entre el aumento en mm de la pata inoculada con la toxina y el aumento de la pata inoculada con soluciones de PBS.

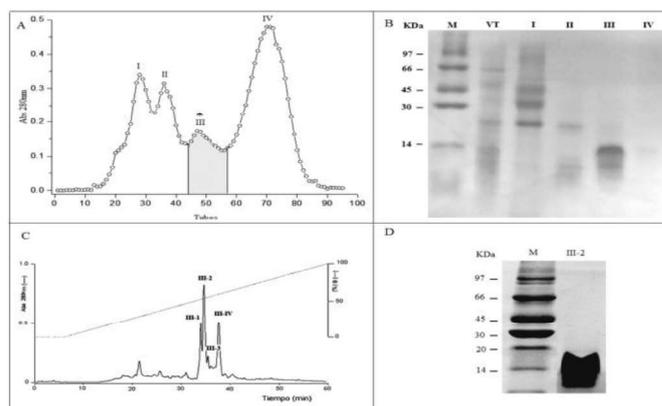
#### Análisis Estadístico

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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Resultados y Discusión

Las investigaciones acerca de la composición química de los venenos de las serpientes han demostrado que dichos fluidos biológicos son complejos fundamentalmente proteicos cuya acción le permite al ofidio, inmovilizar a su presa, causarle la muerte y producir la degradación de sus tejidos [8 y 4].



Figuras 1: A) Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 del veneno bruto de *Micrurus spixii*. B) Gel de SDS-PAGE con las muestras de la cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-75, veneno total (VT) y fracciones de *Micrurus spixii*, I, II, III y IV. Siendo M el marcador molecular. C) Cromatografía en sistema HPLC-fase reversa en una columna analítica C-18 µ-Bondapak (Waters) del pico III de Sephadex G-75. D) Gel de SDS-PAGE con las muestras da cromatografía en HPLC de fase reversa, marcador y III-2 fracción obtenida de la cromatografía en HPLC de fase reversa.

Un procedimiento idóneo para la caracterización de tales componentes, y por lo tanto para el estudio de su acción biológica, es el uso de la técnica cromatográfica en columna de filtración molecular y el uso de la cromatografía líquida de alta performance HPLC lo cual permite separar en base a la masa molecular o a la carga respectivamente, las proteínas contenidas en el veneno. Bajo este

El perfil cromatográfico del veneno de *Micrurus spixii* en Sephadex G-75, muestra cuatro fracciones principales, (I, II, III y IV), observando que la fracción III es la que presenta actividad fosfolipasica esta fracción fue repurificada via HPLC, mostrando la actividad fosfolipasica en la fracción III-2, a partir de esta fracción fueron realizadas las pruebas experimentales (Figura 1).

Existen trabajos de purificación con el veneno total del genero *Micrurus*. Tu, (1977) purificó el veneno total de *Micrurus nigrocinctus* a través de dos paso de purificación utilizando Sephadex G-100 y DEAE-Sephadex A-50.

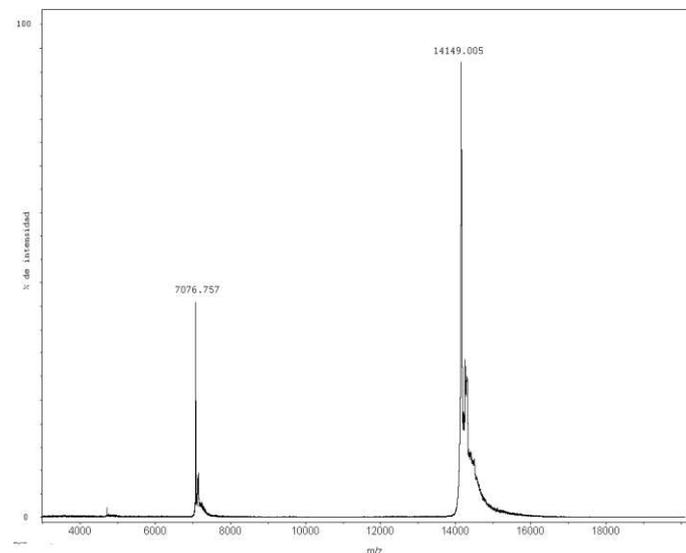


Figura 2. Espectro de masa molecular de la fracción III-2 procedente del veneno de *Micrurus spixii*

Remusgo (2002) por dos pasos de purificación con DEAE- Sephadex A-50 y Sephadex G-100 trabajando con el veneno total de *Micrurus nigrocinctus*. Estos trabajos muestran que su proceso de purificación solo usan métodos cromatograficos convencionales nosotros mostramos en el presente trabajo que la combinación da cromatografía de exclusión molecular sephadex G-75 y HPLC-FR muestra ser altamente selectiva, alta capacidad de resolución y de alto grado de homogeneidad molecular, permitiendo comprender mejor la actividad biológica de la PLA<sub>2</sub> del veneno de *Micrurus spixii*.

La masa molecular de la PLA<sub>2</sub> del veneno de *Micrurus spixii* es aproximadamente de 14 000 Da (Figura 1-D) que fue confirmada por la Espectrometría de Masa con una masa molecular de 14149.005 Da (Figura 2) técnica que muestra con un alto grado de exactitud la masa real del objeto de estudio. La mayoría de las PLA<sub>2</sub>S encontrados en los venenos de elápidos examinados en SDS-PAGE están alrededor de 7 ± 16 kDa, estos pesos moleculares fueron reconocido en *M. lemniscatus*, *M frontalis* *M. surinamensis*, *M. hemprichii* [10], mostrando así la característica de las PLA<sub>2</sub> aislada

de *Micrurus spixii* guarda relación con las demas fosfolipasas presentes en el genero *Micrurus*.

**Caracterización Biológica de la PLA<sub>2</sub>**

Las PLA<sub>2</sub> presentes en los venenos de serpientes exhiben una amplia variedad de efectos farmacológicos. En el estudio de la relación estructura-función, es importante analizar sus efectos farmacológicos in vivo, en vez de in vitro. Los estudios in vitro las veces evidencian efectos no especificos debido a la actividad enzimática inherente, llevando a conclusiones erróneas. Solo en algunos casos los efectos farmacológicos pueden ser analizados en sistemas in vitro como, por ejemplo, en cultivos de células [12]

La fosfolipasa A<sub>2</sub>, son enzima comúnmente encontrada en los venenos de cobras. Después de la actividad enzimática,

Nuestros resultados muestran una baja actividad miotóxica sistémica y local (Figura 3 y 4).

Esto debido a que la mayoría de serpientes elapidicas muestran actividad citotóxica a nivel neuronal. Prieto da silva *et al.*, (2001) [10], la PLA<sub>2</sub>, es el componente activo de mayor actividad al nivel présináptica, característica encontrada encontrada en venenos de muchas cobras elapidicas

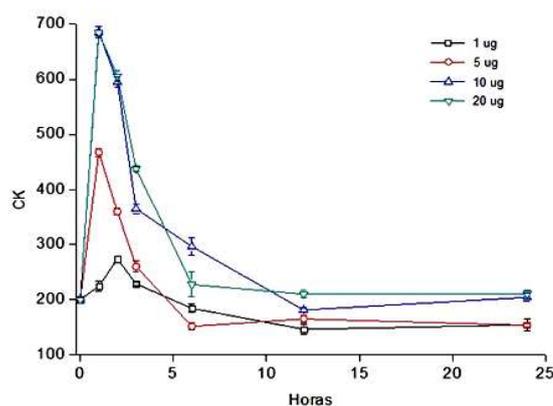


Figura 3: Representación gráfica de las variaciones de los niveles plasmáticos de CK provocados por la administración intramuscular de la PLA<sub>2</sub> de *Micrurus spixii* en ratones de 20 g de peso en promedio. Las concentraciones administradas de la PLA<sub>2</sub> fueron de 1, 5, 10, 20 µg/µl, n (3).

Australianas. En *Micrurus nigrocinctus* se observa que los cambios en la creatina quinasa (CK) el contenido de los músculos esqueléticos in vitro el veneno induce a un aumento gradual y dependiente de la dosis en la tasa de CK puesta en libertad, [6]. Se ha observado también que el veneno de *M. nigrocinctus* induce miotoxicidad pronunciada, estimula la liberación de CK in vitro, estos resultados sugieren que los daños en la células del musculo son independientes del efecto hemorrágico

Gutiérrez *et al.*, (2003) [11], las PLA<sub>2</sub> son los componentes miotóxicos más importantes, ya que inducen a eventos de degeneración muscular. Las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas se ligan a los aceptores de la membrana plasmática. Al ligarse las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, estas producen una destrucción de la membrana a través de mecanismos catalíticos o mecanismos independientes de actividad de PLA<sub>2</sub>, no en tanto, provocan una entrada de Ca<sup>2+</sup> bastante pronunciada y que a su vez, producen una serie de eventos degenerativos asociados con una hipercontracción.

En la determinación de la actividad inflamatoria (Edema de pata), se observa un efecto inflamatorio más agudo a las 2 primeras horas del tratamiento, siendo la concentración de 5 µg/µl la que presento el mayor porcentaje de edema (Figura 5).

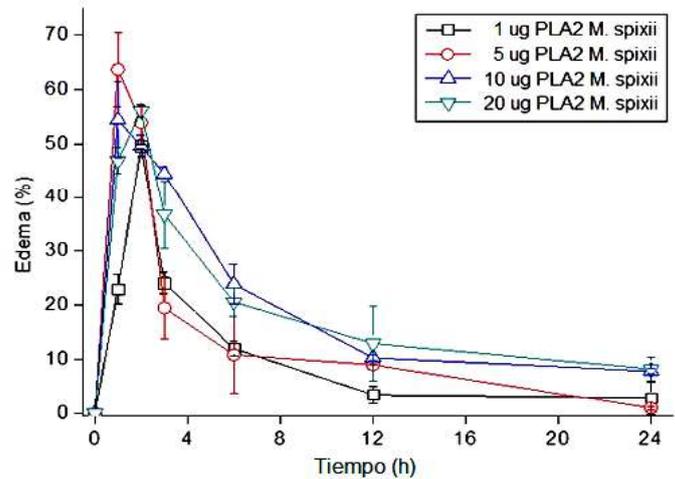


Figura 5: Representación gráfica de la actividad formadora de edema de la PLA<sub>2</sub> inoculado en la región intraplantar de ratón de 20 g de peso. El aumento del volumen de inflamación causada en la pata del animal a lo largo del tiempo, hasta 24 horas, es comparado con el control y expresado en porcentaje de edema inducido. Las dosis aplicadas fueron de 1, 5, 10 e 20 µg respectivamente (n=5).

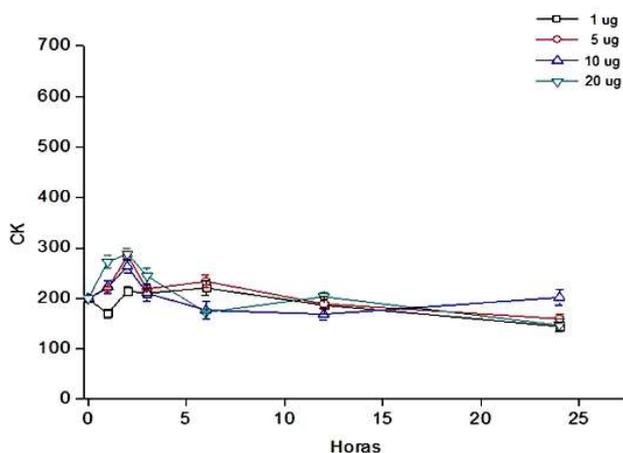


Figura 4: Representación gráfica de la actividad miotóxica sistémica de la PLA<sub>2</sub>. Se muestra la relación curso-tiempo de los niveles de creatina quinasa (CK) incrementados a lo largo del tiempo después de administrar las concentraciones de la enzima (1, 5, 10 y 20 µg).

Estudios donde el uso de diferentes venenos ofídicos demuestra que el inicio del edema y el tiempo son necesarios para que este alcance índices máximos [13]. Este hecho podría ser explicado por variaciones en la composición y origen de los venenos, bien como por diferencias en las especies de animales empleados. Araujo *et al.*, (2000) describieron que el veneno de *Bothrops lanceolatus* cuando inoculado en la región subplantar de ratones producían respuestas edematizante máximas solamente 2 horas después de la inyección, desapareciendo 24 horas.

Fue observado en el veneno de *Micrurus spixii* estos efectos cuando inoculado a PLA<sub>2</sub> en la región subplantar en patas de ratones, se observó un comportamiento de tipo dosis- tiempo dependientes.

Fosfolipasas A<sub>2</sub> purificadas a partir de veneno de serpientes pueden ser largamente utilizadas como modelos biológicos para comprensión de mecanismos de injuria de tejido así como de toda la cascada inflamatoria y inmunológica.

## Conclusiones

Se aisló una PLA<sub>2</sub> miotóxica a través de una combinación de cromatografía líquida convencional (Sephadex G-75) y de una cromatografía de alta eficiencia (HPLC de fase reversa), procedentes de veneno de *Micrurus spixii*. La miotoxina aislada es una molécula compacta, estable frente a las variaciones de temperatura, calcio dependiente frente a iones divalentes. La espectrometría de masa reveló una proteína de naturaleza monomérica de 14149.005 Da de la PLA<sub>2</sub> miotoxina de *M. spixii*. El efecto miotóxico local de la PLA<sub>2</sub> después de 1 hora fue de  $685.344 \pm 10.43$  U/L de CK, el efecto miotóxico sistémico de la PLA<sub>2</sub> fue de  $284.519 \pm 8.307$  U/L de CK y el efecto inflamatorio de la PLA<sub>2</sub> fue de  $63.705 \pm 6.839$  a una concentración de 5 ug.

## Agradecimientos

*Acknowledgements* – The authors thank Paulo A. Baldasso for technical assistance. This work was supported by CAPES.

## Referencias

- [1] Carrillo de Espinoza, N; J. Icochéa. 1995. Lista Taxonómica Preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. N°.49:1-27.
- [2] Campbell, J. A. and Lamar, W. W. (1989) The Venomous Reptiles of Latin America.
- [3] Pesantes, O. 2000. Prevención y Tratamiento de Accidentes por Serpientes Venenosas. Oficina de Relaciones Públicas SEDAPAL. Lima-Perú.
- [4] Yarlequé, L. 2000. Las serpientes peruanas y sus venenos. Fondo Editorial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú.
- [5] Roze, J.A and Bernal-Carlo, A. (1987) Las serpientes corales venenosas del género *Leptomicrurus* (Serpentes, Elapidae) de Suramérica con descripción de una nueva subespecie. Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino 5:573-608
- [6] Goularte, F. C. Cruz-Hofling, M. A., Cogo, J. C. Gutierrez, J. M. and Rodrigues-Simioni L. (1994) The ability of specific antivenom and low temperatura to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon* 5(33) pp. 679-689.
- [7] Laemmli, U. K., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger, E., *J. Mol. Biol.*, **49**, 99 (1970).
- [8] Tu, A. T. (1991). Chemistry of rattlesnake venoms. in rattlesnake venoms, their actions and treatment. New York, Marcel Dekker
- [9] Tu, A. T. (1977). Overview of snake venom chemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 391: 37 – 62.
- [10] Prieto da Silva, A. R.; Yamagushi, I. K.; Morais, J. F.; Higashi, H. G.; Raw, L.; Ho, P. L.; Oliveira, J. S. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venom. *Toxicon*. 2001°. 39(7):949-53
- [11] Gutiérrez, J.M. and Ownby, C.L., 2003, "Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity", *Toxicon*, Vol. 42, pp 915-931
- [12] Lomonte, B.; Angulo, y.; Calderón, I. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 2003, 42: 885–901.
- [13] SELISTRE, H.S., et al Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca Ilhoa) snake venom. *Toxicon*, v.28, n.3, p.261-273, 1990
- [14] Araújo, A.H., Fontenele, A.M.M., Mota, A. P. M.; Dantas, F.F.; Verruma-BERNADI, M.R. Análise sensorial de água de coco in natura em comparação à pasteurizada. In: Congresso Brasileiro De Ciência E Tecnologia De Alimentos, 17. Fortaleza, 2000. Anais. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. V.1, p. 3.44.

E-mail: zecavalerianozapana@yahoo.com.br