

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MIOTOXINA DEL VENO- NO DE LA SERPIENTE *Bothrops brazili* HOGE, 1953 (OPHIDIA: VIPERIDAE)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A MYOTOXIN FROM *Bothrops* *brazili* HOGE, 1953 SNAKE VENOM (OPHIDIA: VIPERIDAE)

Carmen Pantigoso¹, Enrique Escobar² y Armando Yarlequé¹

RESUMEN

Se ha purificado una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*, empleando un solo paso cromatográfico de intercambio iónico sobre CM-Sephadex C-50 con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7. La pureza de la proteína fue evaluada por PAGE con y sin SDS, inmunodifusión e inmunoelectroforesis. La proteína es de naturaleza básica y contiene 15,6% de Lys+Arg; además, no está glicosilada, carece de actividad enzimática, y por el método de Lowry se ha calculado que ella constituye el 25% de la proteína total del veneno.

Por PAGE-SDS y cromatografía de filtración, se ha determinado que la miotoxina tiene un peso molecular de 30 KDa, y está formada por 2 cadenas polipeptídicas de 15 KDa cada una.

La inoculación de la miotoxina en el músculo gastrocnemius de ratones albinos, produce una severa necrosis del tejido.

La miotoxina no tiene actividad hemolítica ni anticoagulante; sin embargo, sí produce edema, se ha calculado una DEM de 32,6 µg de proteína.

Palabras clave: miotoxina, *Bothrops brazili*, veneno de serpiente, mionecrosis

ABSTRACT

A myotoxin from the venom of the snake *Bothrops brazili* has been purified by ion-exchange chromatography on CM-Sephadex C-50 with 0,05 M ammonium acetate buffer pH 7. The homogeneity was evaluated by PAGE with and without SDS, immunodiffusion and immunoelectrophoresis. The myotoxin is a basic protein with 15,6% of Lys+Arg; it is not a glycoprotein, has not enzymatic activity, and corresponds to 25% of the whole venom protein.

The molecular weight of the myotoxin was determined by PAGE-SDS and gel filtration chromatography. The myotoxin has 30 KDa of molecular weight and two polypeptide chains of 15 KDa each.

Myotoxin produces a severe necrosis on the gastrocnemius muscle of white mice.

The myotoxin does not have hemolytic nor anticoagulant activity. However, produces edema with a DEM of 32,6 µg of protein.

Keywords: myotoxin, *Bothrops brazili*, snake venom, myonecrosis

INTRODUCCIÓN

La mayoría de serpientes venenosas del Perú pertenecen al género *Bothrops* (Familia Viperidae), y ellas son responsables de la ma-

yoría de accidentes ofídicos en nuestro país. Sus venenos se caracterizan por producir severo daño local incluyendo hemorragia y necrosis, y pueden ocasionar la muerte de la persona afectada, si ésta no es tratada adecuadamente.

Los venenos de estas serpientes contienen, principalmente, una gran variedad de protei-

¹ Lab. de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.

² Lab. de Bioquímica y Genética Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. d190014@unmsm.edu.pe

nas con actividad enzimática entre las que destacan una diversidad de enzimas proteolíticas, capaces de alterar la coagulación sanguínea y producir hemorragia. Igualmente las fosfolipasas son enzimas ampliamente distribuidas en estos venenos y ellas son responsables de la hidrólisis de fosfolípidos y de varios efectos biológicos como hemólisis, cardiotoxicidad, inhibición de la agregación de plaquetas, edema, etc. (Kini y Iwanaga, 1986a y 1986b).

En particular, la necrosis del tejido muscular (mionecrosis) es un efecto característico del envenenamiento botrópico, que puede conducir a la disfunción o amputación de la zona afectada. En este proceso participan proteínas básicas denominadas *miotoxinas*, las cuales constituyen una familia de proteínas, estructural y antigénicamente relacionadas a las fosfolipasas. En este sentido, las miotoxinas botrópicas pueden ser de dos tipos: unas con actividad de fosfolipasa y otras sin actividad enzimática (Gutiérrez y Lomonte, 1997).

La serpiente *Bothrops brazili* "jergón shushupe" (Familia Viperidae, Subfamilia Crotalinae) es una especie cuya distribución geográfica abarca los departamentos de Amazonas, Loreto, Madre de Dios y Ucayali (Carrillo e Icochea, 1995). Su longitud aproximada es de 1,8 metros y presenta un color pardo con dibujos triangulares más oscuros sobre el dorso. Su alimento principal son pequeños roedores y lagartijas (Carrillo, 1983).

Cabe mencionar que las proteínas estudiadas de venenos de serpientes del Perú se han tratado exclusivamente de proteínas con actividad enzimática (Yarlequé et al., 1989; Pantigoso et al., 1996). En particular algunas de las proteínas que se han aislado y caracterizado en el veneno de *B. brazili*, son las enzimas similar a trombina (Limán, 1996), fosfolipasa (Zeballos et al., 1999) y proteolítica (Azañero et al., 2000).

En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización de una proteína no enzimática con actividad miotóxica, lo que constituye el primer reporte de este tipo en nuestro medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Veneno. Se utilizó veneno de *Bothrops brazili*, de especímenes procedentes de la región del Alto Marañón, mantenidos en cautiverio en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El veneno extraído por presión manual de las glándulas venenosas fue liofilizado y conservado a -8°C .

2 Purificación de la miotoxina. 100 mg de veneno liofilizado de *B. brazili* fueron disueltos en 2 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 7,0 y los restos insolubles se eliminaron por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos. Se tomó 1,95 ml del sobrenadante y se aplicó a una columna de intercambio catiónico de CM-Sephadex C-50 (17 X 1,1 cm), utilizando como buffer de elución acetato de amonio 0,05 M pH 7,0. Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas agregando al buffer de corrida NaCl 0,3 M y 0,6 M. La corrida se realizó a temperatura ambiente, a un flujo de 8 ml/h y la proteína fue estimada por absorción de luz ultravioleta a 280 nm. El pico obtenido con NaCl 0,6M fue desalado por cromatografía de filtración empleando una columna de Sephadex G-25 (22 X 2,5 cm), luego de lo cual se evaluó la actividad miotóxica.

3 Cuantificación de proteína. El contenido proteico del veneno crudo y de la proteína purificada se determinó por el método de Lowry (1951). Para ello, 20 μl de la muestra se completaron con agua destilada hasta 0,5 ml y luego se agregó 2 ml de solución alcalina (carbonato de sodio al 4%, sulfato de cobre al 2% y tartrato de sodio y potasio al 4% 100:1:1), y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Después de este tiempo se agregó 0,5

ml de RFC 1:6 y luego de 30 minutos de reposo a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 660 nm. Como proteína estándar se utilizó albúmina bovina 0,1 mg/ml.

Solamente durante el proceso de purificación de la miotoxina, el contenido proteico fue estimado midiendo la absorbancia de luz ultravioleta a 280 nm (Warburg y Christian, 1941).

4 Evaluación de la pureza. La pureza de la miotoxina fue determinada por electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) en condiciones nativas a pH 7,5 y también en condiciones denaturantes con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), (Laemmli, 1970). Adicionalmente, la pureza fue evaluada por inmunodifusión e inmunoelectroforesis en geles de agarosa al 1%. En la prueba de inmuno-electroforesis se utilizó suero antibotrópico polivalente del Instituto Nacional de Salud de Lima (Ouchterlony and Nilsson, 1978). En todos los casos las proteínas fueron teñidas con azul de coomassie.

5 Determinación del peso molecular. Se determinó por PAGE-SDS (Laemmli, 1970), empleando como proteínas estándares albúmina bovina (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa) y lisozima (14,3 KDa); cada proteína a una concentración de 2 mg/ml. El peso molecular también fue determinado por cromatografía de filtración en gel en una columna de Sephadex G-100 (18,9 x 2 cm), equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7,0, y utilizando como proteínas estándares albúmina bovina 2 mg/ml (66 KDa), anhidrasa carbónica 2 mg/ml (29 KDa) y citocromo c 1 mg/ml (12,4 KDa) (Andrews, 1964).

6 Composición de aminoácidos. Para determinar la composición de aminoácidos de la miotoxina, 3 mg de proteína se hidrolizaron al vacío a 150 °C durante 24 h, con 400 µl de HCl 6N conteniendo fenol 1% y sulfito de sodio 0,1%. Luego, la muestra se dejó enfriar y secar al vacío durante 1,5 h y se resuspendió con 50 µl de EDTA 250 partes por millón. A

continuación se volvió a secar al vacío y se resuspendió en 100 µl de buffer de acoplamiento (acetonitrilo: piridina: trietilamina: agua, 10:5:2:3). Luego de secar al vacío, una vez más, se agregó 100 µl de buffer de acoplamiento y 5 ml de fenilisotiocianato (PITC), y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, luego de un último secado al vacío, se resuspendió en 100 µl de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6 (solvente A). 10 µl de esta muestra fueron utilizados para el análisis de aminoácidos por HPLC, empleando una columna de fase reversa octadecilo (C18) de 25 cm de largo por 4 mm de diámetro interno. La separación se realizó a 52 °C, empleando inicialmente el solvente A, y luego acetato de amonio 0,1M pH 6 en acetonitrilo, metanol y agua (44:10:46) (solvente B), de acuerdo al siguiente protocolo de elución: 15 minutos con 100% de solvente A, 15 minutos con 85% de solvente A y 15% de solvente B, 4 minutos con 50% de solvente A y 50% de solvente B, 6 minutos con 100% de solvente B y finalmente 10 minutos con 100% de solvente A.

El resultado fue comparado con el perfil obtenido con 10 µl de una muestra estándar de 16 aminoácidos (25 µmol de cada aminoácido), tratados de manera similar (Heinrikson y Meredith, 1984).

7 Determinación de carbohidratos

7.1 Determinación de hexosas. En el veneno crudo y la miotoxina aislada, se determinó el contenido de hexosas de acuerdo al método de Winzler (1955). La mezcla de reacción contenía 0,3 ml de agua destilada, 0,2 ml de la muestra alcalinizada (veneno crudo 5 mg/ml o miotoxina 1 mg/ml, en NaOH 0,1N) y 2 ml del reactivo Orcinol 0,18% y ácido sulfúrico 19N. Esta mezcla fue incubada a 80 °C durante 15 minutos y después de enfriarla se midió la absorbancia a 540 nm. Los valores obtenidos fueron convertidos a mg de hexosa por comparación a un estándar que contiene una mezcla de manosa y galactosa 0,2 mg/ml, y finalmente se ex-

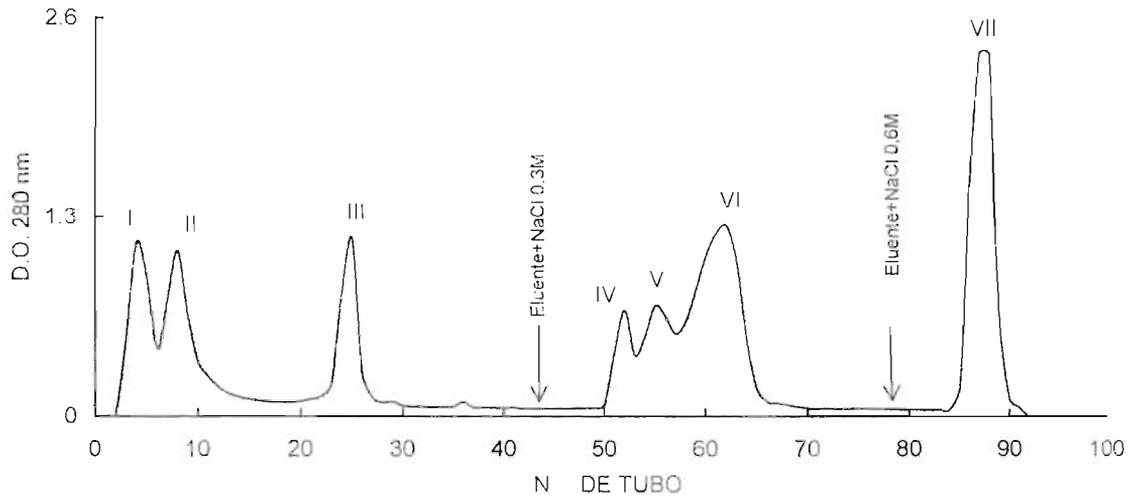


Figura 1. Purificación de la miotoxina de *B. brazili*. Al pasar el veneno de *B. brazili* por una columna de CM-Sephadex C-50 con buffer acetato de amonio 0,05M pH 7, se obtuvieron inicialmente tres picos de proteína (I, II, III). Cuando al eluente se incorporó NaCl 0,3 M, se registraron 3 picos más (IV, V, VI) y finalmente al usar NaCl 0,6M se obtuvo un último pico (VII) el cual mostró tener la actividad miotóxica.

presaron como porcentaje de hexosa respecto de la cantidad de proteína.

7.2 Determinación de hexosaminas. La determinación de hexosamina en el veneno crudo y la miotoxina aislada, se realizó por el

método de Winzler (1955). Inicialmente las muestras fueron sometidas a una hidrólisis ácida a 100 °C durante 4 horas (0,2 ml del veneno crudo 10 mg/ml o MTX 2 mg/ml, con 1,8 ml de HCL 3N), y luego se agregaron 2 ml de NaOH 3N. De esta mezcla, se tomaron

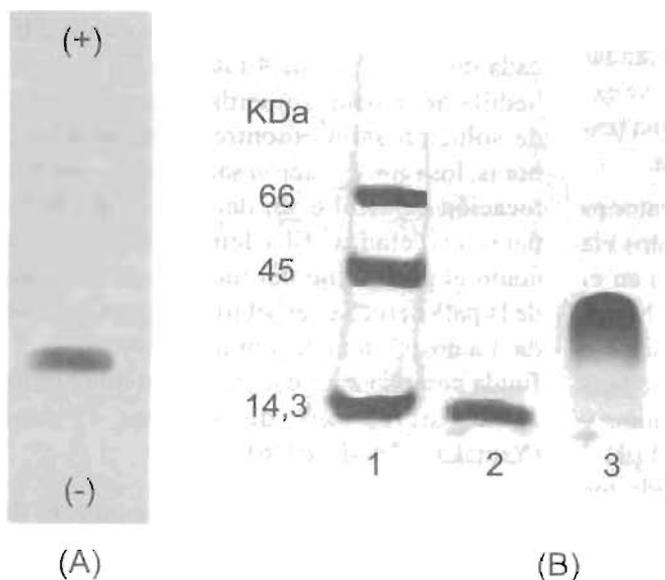


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Electroforesis de la miotoxina aislada, en condiciones nativas a pH 7,5 en donde se observa una sola banda proteica con movilidad hacia el cátodo. (B) Se puede ver la PAGE-SDS de la miotoxina aislada, siendo evidente la presencia de una sola banda proteica tanto en condiciones reductoras como no reductoras, pero con diferentes movilidades electroforéticas. En el carril (1) están las proteínas estándares: albúmina (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa) y lisozima (14,3 KDa); el carril (2) corresponde a la miotoxina reducida (15 KDa) y en el carril (3) se muestra la miotoxina no reducida (30 KDa).

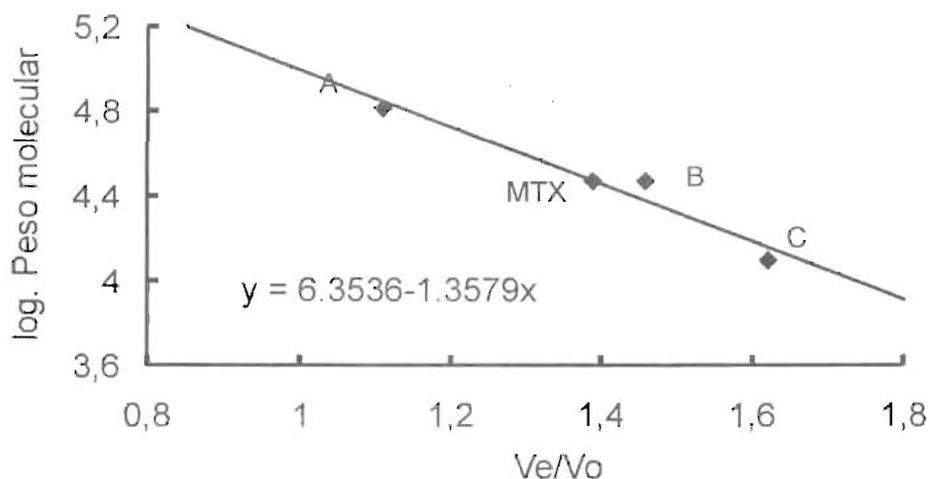


Figura 3. Cálculo del peso molecular de la miotoxina por cromatografía de filtración en Sephadex G-100. Se construyó una curva estándar de albúmina, 66 KDa (A), anhidrasa carbónica, 29 KDa (B) y citocromo c, 12,4 KDa (C), planteando el V_e/V_o versus el log. del peso molecular de cada proteína. El V_e/V_o de la miotoxina (MTX) permitió estimar un peso molecular de 29 KDa.

0,3 ml que se incubaron con 0,2 ml de agua y 0,5 ml de acetil acetona a 100 °C por 15 minutos. Luego, se agregó 2 ml de etanol 95% y 0,5 ml del reactivo de Erlich (0,4 g de p-dimetilaminobenzaldehído, 15 ml de metanol y 15 ml de H_2SO_4). Finalmente, después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 530 nm y los valores obtenidos fueron convertidos a mg de hexosamina por comparación con un estándar de glucosamina 0,5 mg/ml. Los valores se expresaron como porcentaje de hexosamina respecto de la cantidad de proteína usada.

8 Actividad miotóxica. Cuatro ratones albinos de 20 g de peso fueron inoculados vía i. m. con 0,1 ml de miotoxina (60 μ g) en el músculo gastrocnemius. Luego de 24 horas, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y una porción del músculo fue fijado en glutaraldehído al 3% durante 2 horas y luego tratado con buffer fosfato 0,1 M pH 7 durante 3 horas. Posteriormente, el tejido fue tratado con concentraciones crecientes de alcohol etílico al 30, 50, 70, 80, 90, 96 y 100%, y finalmente embebido en una resina Spurr para cortar secciones de 1 mm de espesor, que

fueron teñidas con azul de toluidina al 0,5%. Los daños morfológicos fueron observados y fotografiados a través de un microscopio de luz.

9 Actividad edemática. Fueron inyectadas diferentes cantidades de miotoxina (15, 30 y 45 μ g) disueltas en 50 μ l de solución salina en la almohadilla de la pata derecha de ratones de 20 g de peso, empleándose para cada dosis, grupos de 4 ratones. En la almohadilla de la pata izquierda se inyectó 50 μ l de solución salina (control). Después de 3 horas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a fin de cortar y pesar las patas inyectadas. El edema fue expresado como el porcentaje del incremento del peso de la pata derecha respecto de la pata izquierda. La dosis edemática mínima (DEM) es definida como la cantidad de toxina que produce un incremento de 30% en el peso (Yamakawa et al., 1976).

10 Actividad hemolítica. La mezcla de reacción contenía 0,8 ml de buffer isotónico, 0,1 ml de glóbulos rojos y 0,1 ml de miotoxina (100 mg) en buffer acetato de amonio 0,05 M

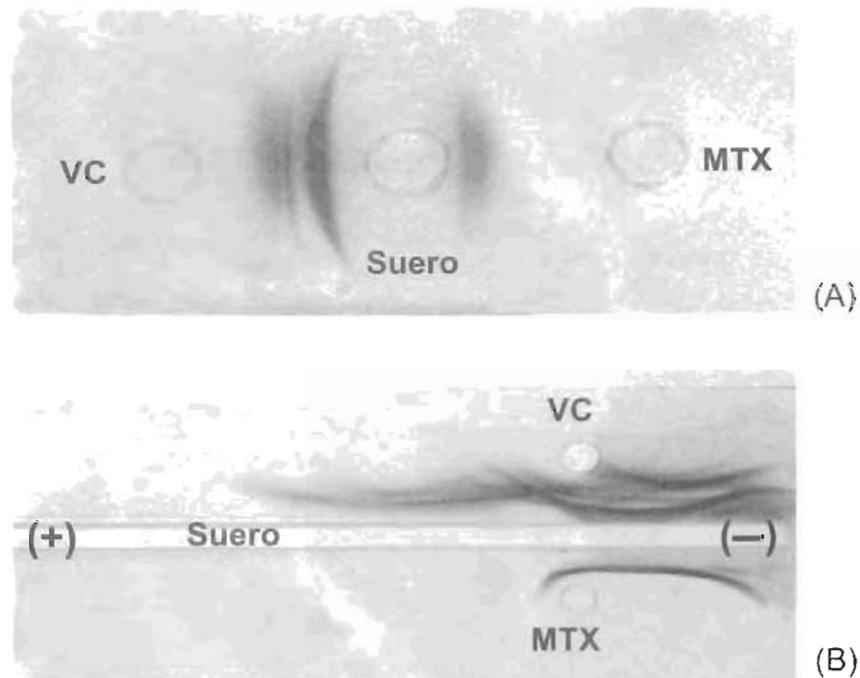


Figura 4. Inmunodifusión (A) e inmunolectroforesis (B) del veneno crudo (VC) y la miotoxina (MTX) de *B. brazili*. En ambos casos el veneno crudo formó varias bandas de proteína con el suero antitóxico, mientras que la MTX originó una sola banda de proteína.

pH 7,1. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 2 h y la reacción se detuvo con 2 ml de NaCl 0,9% frío a pH 7,3, que contenía EDTA 200 mM, luego de lo cual se centrifugó a 200 x g por 10 minutos. La hemólisis se determinó por la liberación de hemoglobina leída a 540 nm y fue expresada como porcentaje total de hemoglobina contenida en 0,1 ml de glóbulos rojos empacados y hemolizados con 2,9 ml de agua destilada (Condrea et al., 1964).

11 Actividad anticoagulante. Plasma humano citratado fue centrifugado a 4000 x g durante 20 minutos, a fin de obtener plasma pobre en plaquetas. Se incubó 200 µl de este plasma a 37 °C durante 10 minutos, con 0,1 ml de miotoxina (que contenía desde 2 hasta 30 µg de proteína). Enseguida se agregó 0,1 ml de CaCl₂ 25 mM, y se midió inmediatamente el tiempo de coagulación. La actividad anticoagulante fue determinada midiendo el retardo en el tiempo de coagulación del plasma, con respecto a un control sin miotoxina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Purificación de la miotoxina. Al pasar el veneno crudo de *B. brazili* por la columna de CM-Sephadex C-50, se obtuvieron tres picos de proteína que eluyeron directamente con el buffer de corrida. Posteriormente, al incorporar NaCl 0,3 M en el buffer de elución, se obtuvieron tres picos más y finalmente empleando NaCl 0,6 M se obtuvo un séptimo pico, el cual mostró tener actividad miotóxica (Fig. 1); es decir, en este sistema la miotoxina interactuó fuertemente con el gel y sólo fue posible separarla con 0,6 M de NaCl, siendo la última proteína del veneno en ser eluida. Esto nos indica que la miotoxina a pH 7,0 adquiere una fuerte carga positiva, la cual le permite interactuar con los grupos carboximetil del gel cargados negativamente. Este hecho implica que el pI de la miotoxina es mayor que 7,0 y por lo tanto se trata de una proteína básica.

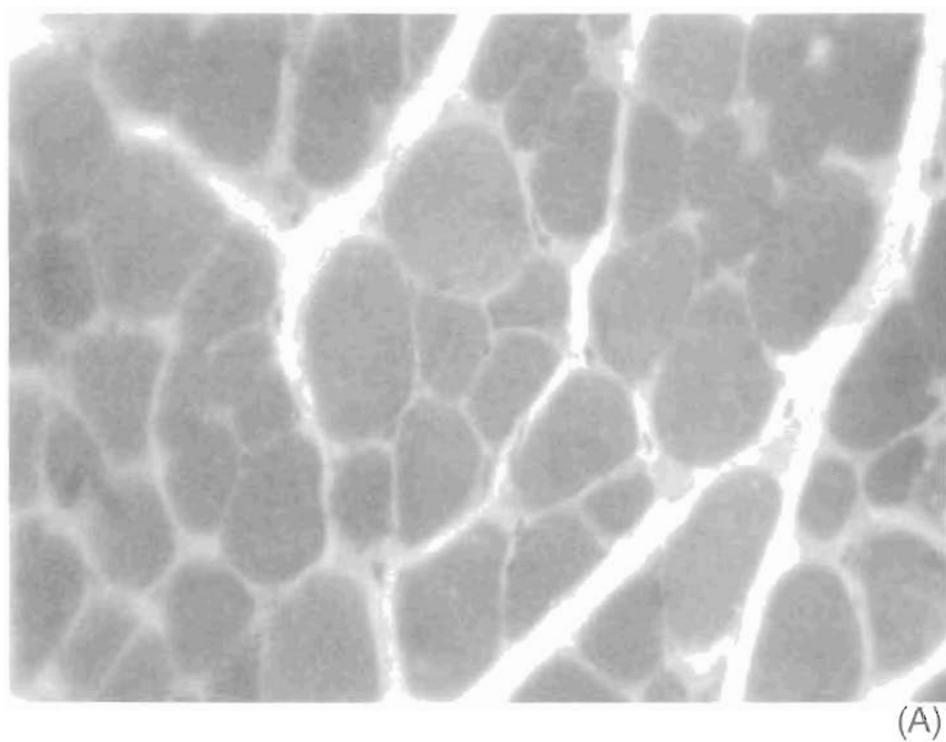


Figura 5. Actividad miotóxica. (A) Observación al microscopio de luz de un corte transversal de músculo gastrocnemius de ratones albinos no tratados con miotoxina en donde se observan intactas las fibras musculares. (B) Necrosis producida por la miotoxina.

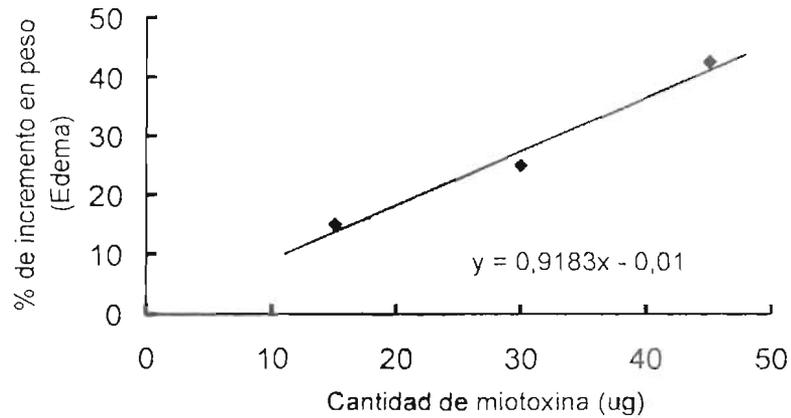


Figura 6. Dosis edemática mínima. El edema producido por la miotoxina fue dependiente de la dosis; se encontró una DEM de 32,6 µg.

La naturaleza básica de esta proteína es una característica común a todas las miotoxinas aisladas de venenos de serpientes del género *Bothrops*, lo cual es aprovechado para separar esta clase de proteínas mediante cromatografía de intercambio catiónico a pH 7,0. Así, por ejemplo, podemos mencionar las miotoxinas aisladas de los venenos de *B. asper* y *B. nummifer* (Gutiérrez et al., 1984; Gutiérrez et al., 1986; Lomonte et al., 1990). Asimismo, Soares et al. (1998) emplean un solo paso cromatográfico para purificar la miotoxina de *B. moojeni*, y Toyama et al. (1995) hacen lo mismo con la miotoxina de *B. pirajai*, pero mediante HPLC.

Por el método de Lowry et al. (1951) se determinó que la miotoxina aislada representa el 25% de la proteína total del veneno, lo cual denota la importancia que debe tener como componente del veneno, durante el proceso de envenenamiento y en la digestión de la presa. En el caso de las miotoxinas I y II del veneno de *B. moojeni*, ellas constituyen el 12% de la proteína total del veneno (Soares et al., 1998), mientras que la bothropstoxina de *B. jararacussu* representa el 15% (Homsibrandeburgo et al., 1988).

2 Evaluación de la pureza y peso molecular. La miotoxina aislada mostró tanto por PAGE en condiciones nativas, PAGE-SDS, inmunodifusión e inmunoelectroforesis,

una sola banda de proteína, todo lo cual confirmó la idoneidad del método de purificación.

Particularmente la electroforesis en condiciones nativas a pH 7,5 mostró la migración catódica de la miotoxina, debido a su naturaleza básica.

Asimismo, la PAGE-SDS demostró que la proteína aislada corresponde a una única banda homogénea pero con diferentes movilidades electroforéticas, según las condiciones sean reductoras o no reductoras. El peso molecular estimado en condiciones reductoras fue de 15 KDa, mientras que en condiciones no reductoras, el peso fue de 30 KDa (Fig. 2); adicionalmente, la banda obtenida en condiciones no reductoras fue algo difusa. Estos resultados permiten deducir que la miotoxina aislada es una proteína constituida por dos cadenas polipeptídicas de 15 KDa cada una, y el hecho de que en condiciones no reductoras la banda proteica sea difusa indicaría que las cadenas polipeptídicas contienen varios enlaces disulfuro intracadena, lo que dificulta que las cadenas se desplieguen totalmente y queden homogéneamente cubiertas con SDS. Por otro lado, al calcular el peso molecular en condiciones nativas por cromatografía de filtración, se obtuvo un valor de 29 KDa (Fig. 3), lo cual guarda correlación con el valor calculado por PAGE-SDS en condiciones no reductoras, confirmando que la proteína tiene 2 cadenas polipeptídicas.

Tabla 1. Composición de aminoácidos de la miotoxina de *Bothrops brazili*

| Aminoácido | (%) |
|---------------|------|
| Asx (Asp+Asn) | 6,1 |
| Glx (Glu+Gln) | 4,8 |
| Ser | 8,3 |
| Gly | 13,2 |
| His | 1,7 |
| Arg | 6,6 |
| Thr | 5,1 |
| Ala | 9,2 |
| Pro | 8,5 |
| Tyr | 9,7 |
| Val | 5,5 |
| Met | 2,2 |
| Ile | 2,0 |
| Leu | 7,4 |
| Phe | 0,2 |
| Lys | 9,0 |

Otras miotoxinas aisladas también tienen la particularidad de ser proteínas dimericas con pesos moleculares alrededor de 30 KDa; así tenemos que la miotoxina aislada de *B. nummifer* y la miotoxina II de *B. asper* son proteínas constituidas por dos cadenas polipeptídicas de 16 kDa cada una (Gutiérrez et al., 1986 y Lomonte y Gutiérrez, 1989). En el caso de la miotoxina aislada de *B. insularis*, ésta también es un dímero pero cada una de las cadenas tiene un peso de 15 KDa (Selistre et al., 1990).

Sin embargo, otras miotoxinas son monoméricas, tal es el caso de las miotoxinas I y III del veneno de *B. asper*, las cuales son de 14 y 16 KDa, respectivamente (Gutiérrez et al., 1984; Kaiser et al., 1990) mientras que las miotoxinas I y II de *B. moojeni* son de 15 KDa cada una (Lomonte et al., 1990)

Las pruebas de inmunodifusión e

inmunolectroforesis mostraron que la miotoxina formó una banda homogénea de proteína al ser enfrentada con suero antibotrópico polivalente, mientras que el veneno crudo formó varias bandas o arcos de precipitación (Fig. 4). Cabe destacar que la banda obtenida en la inmunolectroforesis a pH 8,3 aparece desplazada hacia el cátodo, lo cual significa que incluso a este pH la miotoxina está cargada positivamente, confirmando su carácter básico.

3 Composición de aminoácidos. Del análisis de aminoácidos, se encontró que la miotoxina contiene un mayor porcentaje de aminoácidos básicos (9% de Lys y 6,6% de Arg) con respecto al porcentaje de aminoácidos ácidos (6,1% de Asp y 4,8% de Glu) (Tabla 1). Es decir, la miotoxina posee 15,6% de Lys+Arg, lo que en comparación al 10,9% de Asp+Glu, confirma su naturaleza básica. Esta diferencia entre aminoácidos básicos y ácidos debe ser incluso mayor, si se tiene en cuenta que el porcentaje de Asp+Glu incluye además el contenido de Asn y Gln, los cuales durante la hidrólisis de la proteína se convierten en Asp y Glu, respectivamente. Además, debemos señalar que el porcentaje de Lys+Arg encontrado es similar a los hallados en otras miotoxinas, tal como se muestra en la tabla 2.

A la fecha, se ha encontrado que todas las miotoxinas aisladas de venenos del género *Bothrops* son proteínas básicas, que estructuralmente están relacionadas a las fosfolipasas. En realidad, el análisis de la estructura primaria de estas miotoxinas ha mostrado que este grupo puede subdividirse en dos subclases: las fosfolipasas D-49, las cuales poseen un resto de ácido aspártico en la posición 49 y tienen actividad de fosfolipasa, y las fosfolipasas K-49, las cuales tienen un residuo de lisina en la posición 49 y carecen de actividad enzimática (Ownby et al., 1999). La presencia de ácido aspártico en la posición 49

Tabla 2. Comparación de algunas propiedades de la miotoxina de *B. brazili* con otras miotoxinas botrópicas: miotoxina I, II y III de *B. asper* (MTX I, II y III), miotoxina de *B. insularis*, miotoxina de *B. jararacusu* (BthTX-I), miotoxina I y II de *B. moojeni* (MTX I y II) y miotoxina de *B. nummifer*.

| Propiedad | Especie | | | | | | | | |
|----------------|-------------------|----------|-----------------|----------|---------------------|----------------------|----------|----------|--------|
| | <i>B. brazili</i> | | <i>B. asper</i> | | <i>B. insularis</i> | <i>B. jararacusu</i> | | | |
| | MTX-I | MTX II | MTX-I | MTX-III | BthTX-I | MTX-I | | | |
| Peso molecular | 15000 | 14000 | 16000 | 16000 | 15000 | 13000 | 15000 | 15000 | 16000 |
| Forma nativa | Dímero | Monómero | Dímero | Monómero | Dímero | Monómero | Monómero | Monómero | Dímero |
| % Lys+Arg | 15,6 | 17,5 | 19,8 | 17,2 | 13,1 | 19,8 | 18,5 | 19,3 | 16,4 |
| Fosfolipasa | - | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Anticoagulante | - | + | - | + | - | No determinado | - | - | - |
| *Referencias | Este trabajo | 1 y 2 | 3 y 4 | 5 | 6 | 7 y 8 | 9 | 9 | 2 y 10 |

(*) 1. Gutiérrez et al. (1984), 2. Gutiérrez et al. (1986), 3. Francis et al. (1991), 4. Lomonte and Gutiérrez (1989), 5. Kaiser et al. (1990), 6. Selistre et al. (1990), 7. Cintra et al. (1993), 8. Honsi-Brandeburgo et al. (1988), 9. Lomonte et al. (1990), 10. Gutiérrez et al. (1989).

es crucial para fijar Ca^{++} , el cual es esencial para la actividad catalítica; por ello las fosfolipasas K-49 carecen de actividad enzimática. Algunos estudios evolutivos sugieren que las fosfolipasas K-49 surgieron de la duplicación de un gen ancestral de fosfolipasa, lo cual es sumamente intrigante, ya que aparentemente la evolución preservó una mutación crucial para la actividad catalítica en las fosfolipasas D-49.

4 Determinación del contenido de carbohidratos. Los análisis de hexosas y de hexosaminas de acuerdo al método de Winzler (1955) dieron resultados negativos con la miotoxina. Sin embargo, en el veneno crudo se halló 0,65% de hexosa y 1,33% de hexosamina. Esto demuestra que la miotoxina aislada no es una glicoproteína, lo que es coincidente con lo descrito en una amplia variedad de miotoxinas botrópicas. No obstante, los valores de 0,65% de hexosa y 1,33% de hexosamina, encontrados en el veneno crudo, serían producto de azúcares ligados a otras proteínas del veneno y azúcares libres.

5 Actividad miotóxica. El análisis histológico del músculo gastrocnemius de ratón tratado con miotoxina evidenció una severa necrosis del tejido, observándose no sólo una desorganización de las fibras musculares, sino además una gran infiltración de glóbulos blancos en el tejido (Fig. 5). Considerando que esta proteína carece de actividad de fosfolipasa, nuestros resultados corroboran lo señalado por algunos autores en el sentido de que la acción miotóxica no depende de la hidrólisis de fosfolípidos (Gutiérrez, 1984; Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutiérrez *et al.*, 1989). Asimismo se trataría de una miotoxina del grupo de las fosfolipasas K-49.

Sin embargo, un aspecto particularmente importante y que está en pleno estudio, es la manera como esta proteína ejercería su acción destructiva sobre el tejido muscular, toda vez que es una proteína sin actividad enzimática.

6 Actividad edemática. La miotoxina de *B. brazili* fue capaz de inducir edema en la

almohadilla plantar de ratones albinos. Los incrementos en peso obtenidos con 15, 30 y 45 mg, fueron de 15,1, 24,8 y 42,6% respectivamente, determinándose una DEM de 32,6 μg de proteína (Fig. 6).

La actividad formadora de edema se define como el incremento en la permeabilidad microvascular que conduce a una extravasación de fluido y su acumulación en los espacios intersticiales de los tejidos. Sin embargo, muy pocos estudios se han realizado para determinar la naturaleza exacta del mecanismo del edema causado por miotoxinas, aunque en algunos casos se ha determinado la DEM. Así, por ejemplo, Lomonte y Gutiérrez (1989) han reportado que la miotoxina II de *B. asper*, tiene una DEM de 38 mg, la cual es similar a la encontrada en este trabajo para la miotoxina de *B. brazili* (32,6 mg). Un aspecto reconocido en la inflamación es la participación de fosfolipasas A_2 , las cuales incluso han sido aisladas de fluidos inflamatorios. Esta acción edemática de las fosfolipasas fue correlacionada con su capacidad para hidrolizar fosfolípidos (Lloret and Moreno, 1993). Sin embargo, la miotoxina de *B. brazili*, al igual que otras miotoxinas botrópicas, no tiene actividad enzimática, lo cual sugiere que su efecto edemático tampoco depende de la hidrólisis directa de fosfolípidos y que algún mecanismo alternativo estaría involucrado, por ejemplo, la acción directa de la miotoxina sobre células endoteliales.

7 Actividad hemolítica y anticoagulante. La miotoxina aislada no mostró tener actividad hemolítica directa sobre glóbulos rojos humanos, ni fue capaz de retardar el tiempo de coagulación del plasma humano recalcificado, lo cual guarda relación y es coherente con el hecho de que esta miotoxina carece de actividad de fosfolipasa. En particular, todas las miotoxinas que ejercen un retardo en la coagulación del plasma citratado y recalcificado muestran tener actividad de fosfolipasa, y se supone que es la capacidad

de hidrolizar ciertos fosfolípidos, que participan en el proceso de coagulación sanguínea, lo que les confiere un efecto anticoagulante; tal es el caso de las miotoxinas aisladas de *B. atrox* y de *B. asper* (MTX I y III), todas las cuales tienen actividad de fosfolipasa y son a la vez anticoagulantes. En cambio la miotoxina estudiada en este trabajo es similar a las miotoxinas de *B. nummifer*, *B. asper* (MTX II) y *B. moojeni* (MTX II), en el sentido de que todas carecen de actividad de fosfolipasa y también de actividad anticoagulante (Prado-Franceschi et al., 1998).

Agradecimientos

Esta investigación contó con el apoyo económico del CSI (Proyecto 001001141). Los autores agradecen de manera especial a los Biólogos Elizabeth Neyra y Miguel Neira por su valioso apoyo en el procesamiento histológico y determinación del contenido de aminoácidos, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, P. 1964. The gel filtration behavior of proteins to their molecular weights over a wide range. *Biochemical Journal* **96**:595-606.
- Azañero, M.; E. Escobar y A. Yarlequé, A. 2000. Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estudio de su actividad sobre fibrinógeno. *Rev. Peru. Biol.* **7(1)**: 55-66.
- Carrillo, N. 1983. Contribución al conocimiento de las serpientes venenosas del Perú de las familias Viperidae, Elapidae e Hydrophidae. *Publ. Mus. Hist. Nat. UNMSM. Serie A, N.º 30*, 55 pp.
- Carrillo, N. y J. Icochea. 1995. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Folleto de divulgación: *Publ. Mus. Hist. Nat. UNMSM.* **49** : 1-27.
- Cintra, A.; S. Marangoni; B. Oliveira and J. Giglio. (1993). Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.* **12**, 57-64.
- Condrea, E.; A. De Vries and J. Mager. 1964. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venoms. *Biochem. Biophys. Acta* **84** : 60.
- Francis, B.; J. Gutiérrez; B. Lomonte and I. Kaiser. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch Biochem. Biophys.* **284**: 352-359.
- Gutiérrez, J.; F. Chaves; J. Gene; B. Lomonte; Z. Camacho and K. Schosinsky. (1989). Myonecrosis induced by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* **27**, 735-745.
- Gutiérrez, J. and B. Lomonte. 1997. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function, and Mechanism.* (Ed. R. Manjunatha Kini). John Wiley and Sons. 321-352.
- Gutiérrez, J.; B. Lomonte and L. Cerdas. 1986. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* **24(9)**: 885-894.
- Gutiérrez, J.; C. Ownby and G. Odell. 1984. Isolation of a Myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial Characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*, **22(1)**: 115-128.
- Heinrikson, R. and S. Meredith. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry* **136**: 65-74.
- Homsí-brandeburgo, M.; L. Queiroz; H. Santo-Neto; L. Rodrigues-Simioni and J. Giglio. 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* **26**: 615-627.
- Kaiser, I.; J. Gutiérrez; D. Plummer; S. Aird and G. Odell. 1990. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**: 319-325.
- Kini, R. and S. Iwanaga. 1986a. Structure-function relationships of phospholipases. I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* **24**: 527-541.
- Kini, R. and S. Iwanaga. 1986b. Structure-function relationships of phospholipases. II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* **24**: 895-905.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Liman, J. 1996. Purificación y caracterización parcial de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops brazili* ("jergón shushupe"). Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. UNMSM. 31 pp.
- Lomonte, B. and J. Gutiérrez. 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* **27**: 725-733.

- Lomonte, B.; J. Gutiérrez; M. Furtado; R. Otero; J.-P. Rosso; O. Vargas; E. Carmona and M. Rovira. 1990. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28**(10): 1137-1146.
- Lowry, O.; N. Rosebrough; A. Farr and R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lloret, S. and J. Moreno. 1993. Edema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venom. *Toxicon* **31**(8): 949-956.
- Ouchterlony, O. and L. Nilsson. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1, Immunochimistry. p. 19 (Weir, D.M., De). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Owby, C.; H. Selistre De Araujo; S. White and J. Fletcher. 1999. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon* **37**: 411-445.
- Pantigoso, C.; E. Escobar; O. Málaga y A. Yarlequé. 1996. Aislamiento y algunas propiedades de la Atoxina, una proteinasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "jergón". *Acta Científica Venezolana*. **47**: 67-73.
- Prado-Franceschi, J.; S. Hyslop; J. Cogo; A. Andrade; M. Assakura; A. Richl; M. Cruz-Höfling and L. Rodrigues-Simioni. 1998. Characterization of a myotoxin from the Duvenoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryus olfersii* (green snake): Effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* **36**(10): 1407-1421.
- Selistre, H.; L. Queiroz; O. Cuña; G. De Souza and J. Giglio. 1990. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* **28**: 261-273.
- Soares, A.; B. Rodrigues; M. Homsí-Brandeburgo; M. Toyama; F. Lombardi; R. Arni and J. Giglio. 1998. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon* **36**(3): 503-514.
- Toyama, M.; L. Mancuso; J. Giglio; J. Novello; B. Oliveira and S. Marangoni. 1995. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **37**: 1047-1055.
- Warburg, O. and Christian. 1941. Isolierung und Kristallisation der Gärungsferments enolase. *Biochem. Z.* **310**: 384-421.
- Winzler, R. 1955. Determinations of serum glycoproteins. In: *Methods of Biochemical Analysis*. Lundbard, R., Fenton, J. and Mann, K. (eds). pp. 279-311.
- Yamakawa, M.; M. Nosaki and Z. Hokama. 1976. Fractionation of sakishima-habu (*Trimererusus elegans*) venom, and lethal, hemorrhagic and edemaforming activities of the fractions. In: *Animal, Plant, and Microbial toxins*, Vol. 1. Biochemistry, eds., A., Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai. Plenum Press, New York.
- Yarlequé, A.; S. Campos; E. Escobar; F. Lazo; N. Sánchez; S. Hyslop; N. Marsh; P. Butterworth and R. Price. 1989. Isolation and characterization of a fibrinogen clotting enzyme from the snake *Lachesis muta muta* (peruvian bushmaster). *Toxicon* **27**(11): 1189-1197.
- Zeballos, J.; E. Escobar y A. Yarlequé. 1999. Aislamiento y algunas propiedades de una fosfolipasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*. Vol. LXV (1) : 10-20.