

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE DOS MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA A EN VENENOS DE SERPIENTES COMPARATIVE EVALUATION OF TWO METHODS TO ASSAY PHOSPHOLIPASE A ACTIVITY FROM SNAKE VENOMS

Fanny Lazo, Edith Rodríguez y Armando Yarlequé¹

RESUMEN

Se ha evaluado la actividad de fosfolipasa A en seis venenos de serpientes comparando las ventajas de un método espectrofotométrico, previamente adaptado a nuestras condiciones de laboratorio, frente al método macroscópico de retardo en la coagulación de una emulsión lipoproteica. En ambos casos, la actividad de fosfolipasa A estuvo presente en los venenos de *Micrurus spixii*, *Crotalus durissus*, *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* y la actividad decreció en orden. En cambio, la actividad de la enzima en el veneno de *Micrurus surinamensis* sólo fue detectada por el método espectrofotométrico. Así mismo, los resultados basados en la cantidad de veneno utilizado para medir la actividad, mostraron una mayor sensibilidad con el método espectrofotométrico en comparación con el método macroscópico ya que se requirieron cantidades menores en el orden de 2 a 10 veces.

Palabras claves: Enzima, veneno, serpiente, fosfolipasa.

ABSTRACT

Phospholipase A activity was evaluated into six snake venoms. Spectrophotometrical method adapted for our lab conditions previously and delay lipoprotein coagulation macroscopical method were compared. In both cases the phospholipase activity was registered in the venom of *Micrurus spixii*, *Crotalus durissus*, *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* and *Bothrops atrox* in the same decrease order. However the enzymatic activity only was detected in the venom of *Micrurus surinamensis* with the spectrophotometrical method. In addition the results related to amount venom with each technique achieved the major sensitive of spectrophotometrical method than macroscopical technique because of 2 to 10 minor folds are required.

Key words: Enzyme, venom, snake, phospholipase.

INTRODUCCIÓN

La fosfolipasa A (E.C. 3.1.1.4) es una de las enzimas más interesantes presentes en los venenos animales debido a su variable comportamiento biológico. Existen dos formas de esta enzima: fosfolipasa A₁ y A₂ según se libere el ácido graso que esterifica la posición C₁ ó C₂ del glicerol, respectivamente; la más común, en el caso de venenos de serpientes y abejas, es la forma A₂. La fosfolipasa A tiene una estructura primaria muy homogénea (Renetseder *et al.* 1985) con un contenido de aminoácidos de 120 a 130 residuos y 7 puentes S-S lo que le confiere una gran termoestabilidad, habiéndose encontrado que el ion calcio, activador de la enzima se asocia a Asp 49

para conformar la estructura catalíticamente activa (Gutierrez & Lomonte, 1995). Sin embargo, la enzima muestra una variedad de acciones farmacológicas dependientes del veneno que la contiene y no de su acción enzimática. De esta manera, participa en la digestión de la presa (Tu, 1977) o induce alguna de las siguientes acciones patológicas: neurotoxicidad, acción cardiotoxica, miotoxicidad, hemólisis, efecto anticoagulante, hemorragia interna y actividad inductora de edema (Vishwanath *et al.* 1987; Rosenberg, 1990).

Como puede observarse, aparte de la actividad típica que posee esta enzima, los mecanismos de envenenamiento propios de cada veneno obedecen a causas adicionales. Así en 1938, Slotta & Frankel Conrat aislaron la crotoxina del veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* y posteriormente se demostró que se

¹Laboratorio de Biología Molecular-Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Tabla 1. Actividad de Fosfolipasa A con el método de coagulación de la yema de huevo.

SERPIENTE	μg DE MUESTRA		ACTIVIDAD ESPECÍFICA
	Veneno	Proteína	(UA/mg de proteína)
<i>Lachesis muta</i>	50	38,75	2,95
<i>Bothrops atrox</i>	50	34,65	2,43
<i>Bothrops brazili</i>	50	36,30	3,38
<i>Crotalus durissus</i>	50	38,45	3,50
<i>Micrurus spixii</i>	5	4,50	48,94
<i>Micrurus surinamensi</i>	50	45,00	---

trataba de un complejo en el cual uno de los componentes era la fosfolipasa A con acción neurotóxica; así también, se ha aislado una miotoxina del veneno de *Crotalus viridis viridis* (Ownby *et al.* 1997), una fosfolipasa con acción anticoagulante del veneno de *Vipera aspis* (Boffa *et al.* 1982) y una enzima de este tipo con acción edemática en ratón que posee además efecto citolítico sobre células del tumor ascítico de Ehrlich; la enzima fue obtenida del veneno de *Naja naja naja* (Rudramnaji & Gowda, 1998).

Uno de los problemas en torno a la medida de la actividad enzimática es que tratándose de una proteína lipolítica, el medio de reacción es hidrofóbico, lo que dificultó los estudios de aislamiento y caracterización. Es así que se usaron métodos como el de formación de hidroxamatos (Augustyn & Elliott, 1969), microtitulación de áci-

dos grasos liberados (Wells & Hanaham, 1969) y la técnica turbidimétrica con emulsiones de yema de huevo (Marinetti, 1964). De todas ellas, la de mayor empleo es la que mide el retardo en el tiempo de coagulación de una emulsión de yema de huevo sometida a calentamiento luego de la acción enzimática (Vidal & Stoppani, 1971). Para vencer estas dificultades se han desarrollado métodos más precisos como el radioactivo (Franson *et al.* 1974), así como varios métodos espectrofotométricos algunos de los cuales son sumamente complejos como el de Novak (1965).

Nuestro laboratorio ha estudiado varias fosfolipasas de venenos de serpientes peruanas para cuyo aislamiento se utilizó el método de retardo de coagulación de yema de huevo el cual, más allá de las dificultades visuales que ofrece, resultó un método plausible que permitió la purifi-

Tabla 2. Actividad de la enzima con la técnica Espectrofotométrica.

SERPIENTE	μg DE MUESTRA		ACTIVIDAD ESPECÍFICA
	Veneno	Proteína	(UA/mg de proteína)
<i>Lachesis muta</i>	12,5	9,68	20,60
<i>Bothrops atrox</i>	25,0	17,32	16,76
<i>Bothrops brazili</i>	12,5	9,07	24,38
<i>Crotalus durissus</i>	5,0	3,84	154,67
<i>Micrurus spixii</i>	1,25	1,12	272,66
<i>Micrurus surinamensis</i>	50,0	45,00	5,72

cación de fosfolipasa de *Bothrops pictus* conocida como “Jergón de costa” (Escobar *et al.* 1994), así como de *Lachesis muta* “Shushupe” y *Bothrops brazili* “Jergón shushupe” (Yarlequé *et al.* 1996). Empero, la principal dificultad siguió siendo para nosotros disponer de una técnica espectrofotométrica de fácil manejo y de alta sensibilidad.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue comparar la técnica descrita por De Oliveira & Palma (1998) adaptada a nuestras condiciones de laboratorio con respecto al método de Vidal & Stoppani (1971). Al considerar que hay algunas variaciones marcadas en el proceso de envenenamiento atribuible a la fosfolipasa A, hemos preferido efectuar esta comparación con venenos totales de serpientes peruanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el desarrollo de esta investigación se utilizó como material biológico muestras de veneno liofilizado de las serpientes *Lachesis muta*, *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Crotalus durissus* (Familia Viperidae), así como *Micrurus spixii* y *Micrurus surinamensis* (Familia Elapidae); procedentes de diversas regiones de la selva peruana y mantenidas en el Serpentario “Oswaldo Meneses” de la UNMSM. El veneno fue resuspendido en solución de NaCl 0,15M y centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos para eliminar restos insolubles. La cantidad de proteína fue calculada por el método de Lowry *et al.* (1951) usando como estándar de proteína, la albúmina sérica bovina.

La actividad enzimática fue medida usando el método citado de Vidal & Stoppani, para lo cual se preparó una emulsión de yema de huevo al 45% en buffer Tris HCl 10mM a pH 7,4 conteniendo cloruro de calcio 10 mM. 1,5 ml de la emulsión fue incubada por 10 minutos a 37°C con 0,2 ml de veneno a concentraciones variables y luego la mezcla fue calentada a 90°C. Se determinó el tiempo de coagulación en minutos, con la ayuda de una bagueta. La actividad específica se expresó como el tiempo de retardo en la coagulación por minuto (UA) y por miligramo de proteína.

En el caso de la técnica espectrofotométrica, evaluamos el procedimiento descrito por De Oliveira & Palma en la que se prepara una mezcla que contiene 15 μ moles de fosfatidilcolina, 5 μ moles de cloruro de calcio, 80 nmoles de rojo de fenol, 20 μ l de Triton X-100 y 7,5 μ moles de buffer Tris HCl a pH 7,9 en un volumen total de 2,5ml. Esta mezcla se preincubó a 37°C por 5 minutos y luego fue transferida a cubetas espectrofotométricas para inmediatamente adicionárseles 0,2 ml de veneno, midiéndose el cambio de absorbancia a 558nm en un intervalo de 5 a 8 minutos. La actividad específica fue calculada en μ moles de ácido graso liberado por minuto (UA) por miligramo de proteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del estudio mostraron que la actividad específica de los venenos calculada por la técnica de la yema de huevo estuvo en un rango variable. En el veneno de *M. spixii* se tuvo el valor más alto equivalente a 48,94 UA/mg de proteína mientras que en la ponzoña de *M. surinamensis* no se registró actividad enzimática (Tabla 1). En cuanto a los venenos viperidos, los valores fluctuaron entre 3,5 UA/mg para *C. durissus* a 2,43 UA/mg para *B. atrox*. Cuando se usó la técnica espectrofotométrica, se mantuvo el orden decreciente de actividad, nuevamente se encontró el mayor valor en el veneno de *M. spixii* equivalente a 276,66 UA/mg. Con este método sí pudimos detectar la actividad fosfolipásica en el veneno de *M. surinamensis* aunque con un valor bajo de 5,72 UA/mg (Tabla 2).

Otro hecho interesante fue que en el procedimiento espectrofotométrico, se usaron cantidades menores de veneno y por tanto de proteína para registrar la actividad con respecto a la técnica de la yema de huevo. Así tenemos que, en el caso de *M. spixii* se empleó 1,25 μ g del veneno mientras que en el otro método la mínima cantidad que tuvo que usarse fue de 5 μ g. Para el caso de *C. durissus* las diferencias fueron más notables ya que con el método de De Oliveira & Palma empleamos 5 μ g y con el de Vidal & Stoppani 50 μ g. (Tablas 1 y 2).

Como ya mencionamos, aun cuando el procedimiento de la yema de huevo permite el seguimiento de la actividad y posibilita el aislamiento de la enzima, se tienen marcadas desventajas en el uso de esta técnica puesto que demanda un trabajo laborioso para medir la actividad y que la misma pueda estar influenciada por la observación del operador; además el substrato es heterogéneo no sólo en el contenido de la lipoproteína sino en la presencia de otros esteroides que podrían afectar la actividad. En cuanto a la técnica espectrofotométrica descrita previamente y evaluada por nosotros, se trata de un método de uso práctico y de alta sensibilidad con respecto al anterior ya que como puede observarse las cantidades de veneno utilizadas son menores en una proporción de 2 a 5 con excepción del veneno de *M. surinamensis* y si relacionamos las actividades específicas en cada caso, tenemos un valor cercano a 7 con excepción del veneno de *C. durissus* con el que se encuentra una proporción de 44, lo cual podría explicarse si una potente actividad de lisolecitinasa estuviera presente y produjera el rápido descenso de la absorbancia a 558nm que detectamos en nuestros ensayos (Johnson *et al.* 1987; Ownby *et al.* 1997). Tal vez su principal dificultad está en la poca solubilidad del substrato fosfatidilcolina, situación que pudimos resolver con la adición de 20 µl de Triton X-100 y haciendo un seguimiento minuto a minuto del descenso de la absorbancia como resultado del cambio progresivo de decoloración del indicador rojo de fenol. Esto significa que en condiciones apropiadas de laboratorio la técnica mencionada puede ser utilizada no sólo para el aislamiento de fosfolipasa A sino para los estudios de cinética que pudieran complementar la información que se tiene sobre una proteína tan versátil como la descrita.

LITERATURA CITADA

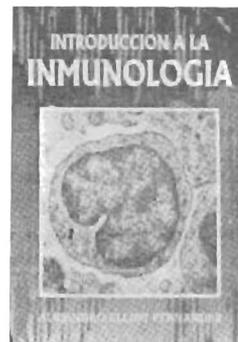
- Agustyn, J.A. y W.B. Elliott. 1969. A modified hydroxamate assay of phospholipase activity. *Anal. Biochem.* **31**:246-250.
- Araujo, A. L. y Radvanyi, F. 1987. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* **25**(11): 1181-1188.
- Boffa, M. C.; Dachary, J.; Verheij, H.M.; Rothen, C.; Dupourco, J.; Verger, R. & G.H. De Haas. 1982. Do we know Why some phospholipases A₂ are anticoagulant? *Toxicon* **20**(1): 305.
- De Oliveira, M.R. y M.S. Palma. 1998. Polybitoxins: A group of phospholipase A₂ from the venom of the neotropical social wasp paulistina (*Polybia paulista*) *Toxicon* **36**(1): 189-199.
- Escobar, E.; Cardenas, J. y A. Yarlequé. 1994. Caracterización parcial de una fosfolipasa A del veneno de *Bothrops pictus*. Libro Resúmenes IV Reunión Científica ICBAR. UNMSM. pp 56.
- Franson, R.; Patriarca, P. y P. Elsbach. 1974. Phospholipid metabolism by phagocytic cells. Phospholipases A₂ associated with rabbit polymorphonuclear leukocyte granules. *J. Lipid Res.* **15**: 385-394.
- Gutiérrez, J.M. y B. Lomonte. 1995. Review article. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* **33**:1405-1424.
- Johnson, E.K.; Kardung, K.V. y C.L. Ownby. 1987. Observations on white and yellow venoms from an individual southern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*) *Toxicon* **25**(11): 1168-1180.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A. L. y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biológicas. Chem.* **193**, 265-275.
- Marinetti, G.V. 1964. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta* **98**: 554-565.
- Novak, M. 1965. Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acid. *J. Lipid Res.* **6**: 431-433.
- Ownby, C.; Colberg, T.R. y S.P. White. 1997. Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A₂ myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) *Toxicon* **35**(1): 111-124.
- Renetseder, R.; Brunie, S.; Dijkstra, B. W.; Drenth, J. y P.B. Singler. 1985. A comparison of the crystal structures of phospholipases A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biológicas. Chem.* **260**: 11627-11636.
- Rosenberg, P. 1990. Phospholipase, In: *Handbook of Toxinology* (Shier, W.T. and Mebs, D. Eds): 67-277. Marcel Dekker, New York.
- Rudrammaji, L. M. S. y T.V. Gowda. 1998. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A₂ from Indian Cobra (*Naja naja naja*) venom. *Toxicon* **36**(6): 921-932.
- Slota, C.H. y H.L. Fraenkel-Conrat. 1938. Estudios químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* **12**: 505-513.
- Tu, A.T. 1977. In: A. T. Tu (De) *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, Phospholipase A₂ pp 27-46.
- Vidal, J.C. y A.O.M. Stoppani. 1971. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **145**: 543-555.

- Vishwanath, B.S.; Kini, R.M. y T.V. Gowda. 1987. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon* **25**(5): 501-515.
- Wells, M.A. y D.J. HANAHAM. 1969. Studies on phospholipases isolation and characterization of two enzymes from *Crotalus adamanteus* venom. *Biochemistry* **8**(1): 414-424.
- Yarlequé, A.; Lazo, F.; Pantigoso, C.; Rodríguez, E.; Mejía, J.; Carcasi, R.; Zeballos, J. y J. JUAPE. 1996. Estructura y función de fosfolipasas de venenos de animales. Libro Resúmenes V Reunión Científica ICBAR.UNMSM, pp 120.

INTRODUCCIÓN A LA INMUNOLOGÍA

*Alejandro Elliot Fernández
Lima, 1998, 286 páginas.*

El autor, especialista en inmunología y parasitología médica, presenta este libro a manera de texto fundamental y conciso, con la intención de develar los sistemas de esa com-



pleja maquinaria que es nuestro organismo. Muestra numerosas estrategias que ha logrado desarrollar nuestro sistema inmune, luchando por mantener nuestra integridad en medio de millones de otros seres vivos.