

Purificación de fosfolipasa A₂ a partir de veneno de *Bothrops atrox*

Purification of phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* venom

B. Quevedo*, J. Ramírez-Ávila**, E. López***

RESUMEN

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) fue purificada a partir de veneno de serpiente de *Bothrops atrox* (*Sensu lato*) de Chiriguana (Colombia) por cromatografía de exclusión sobre Sephadex G-75, de donde se obtuvieron cinco fracciones, una de ellas con actividad fosfolipasa A₂. Después de pasarla por una columna de intercambio catiónico Mono S, donde se separaron ocho fracciones con actividad PLA₂, ésta se midió usando el método hemolítico. La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, mostró pesos moleculares entre 16.000 y 17.000 para las ocho fracciones, seis de las cuales presentaron una sola banda.

Palabras clave: fosfolipasa A₂, veneno *Bothrops*, purificación proteína.

SUMMARY

Phospholipase A₂ (PLA₂) from *Bothrops atrox* (*Sensu lato*) venom, from Chiriguana (Colombia) was purified using exclusion chromatography on Sephadex G-75, obtaining five fractions one of which showed phospholipase A₂ activity. After further purification on Mono S cationic exchange column, eight fractions with PLA₂ activity, measured using the hemolytic method, were obtained.

I. Q. M.Sc. Universidad Nacional de Colombia, Cra. 39 No. 23-77, Bogotá, D.C., Colombia.
 Biólogo. Subdirección Industrial, Instituto Nacional de Salud, Av. Eldorado Cra. 50, Bogotá, D.C., Colombia. Química, M.Sc. Facultad de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

SD, - Poliacrilamide gel electrophoresis of these eight fractions, found molecular weights between 16KDa and 17 KDa for all of them, while six fractions showed a single band.

Keywords: phospholipase A₂, *Bothrops* venom, protein purification.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo fue purificar la PLA₂ a partir de veneno de serpiente de *Bothrops atrox* de la región de Chiriguana, resultados que se compararán con los que se están llevando a cabo en el Instituto Nacional de Salud, con venenos de la misma familia pero de otras regiones del país. Esto, debido a que las PLA₂ de varios venenos presentan propiedades enzimáticas similares, pero no son idénticas inmunológicamente (Nairy Elliot, 1975).

En el mundo, el estudio de los venenos de serpientes es un área de investigación muy activa, debido a la imperiosa necesidad de mejorar la terapia del accidente ofídico y al creciente interés por desarrollar las posibles aplicaciones industriales de las enzimas presentes en los venenos.

Los venenos de serpientes son una fuente excelente de PLA₂. Sin embargo, muchos venenos contienen más de una forma de esta enzima. Muchas de estas formas tienen pesos moleculares similares, pero difieren en un pequeño número de aminoácidos y son detectadas por diferencias en puntos isoeléctricos sobre resinas de intercambio iónico.

La fosfolipasa A₂ ha sido purificada a partir de venenos de serpientes de las familias Hydrophiidae, Elapidae y Viperidae. El veneno del género *Bothrops* de la familia Viperidae ha sido fraccionado por diferentes autores (Lobo de Araújo *et al.*, 1994; Mancuso *et al.*, 1995; Maraganore *et al.*, 1984 y Daniele *et al.*, 1995), usando procedimientos que

incluyen de 2 a 4 etapas y obteniendo variación en el número de isoenzimas de fosfolipasa A₂, dependiendo del veneno. En cada caso se presenta un procedimiento específico, determinado por las condiciones de trabajo, las modificaciones en el orden de las etapas y el número de éstas.

Bothrops atrox es la especie representativa del género y, además, la más importante desde el punto de vista médico en Colombia, ya que ocasiona el 90% de la morbilidad por accidente ofídico (accidente bothrópico).

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) (EC.3.1.1.4) cataliza la hidrólisis específica de los enlaces éster en la posición del carbono 2 de 1,2-diacil-fosfoglicéridos (Slotboom *et al.*, 1982; Dennis, 1983). La PLA₂ requiere Ca⁺⁺ para la estabilización conformacional y para la catálisis. Estas enzimas desempeñan un papel importante en el metabolismo de lípidos y han sido ampliamente usadas para estudiar la estructura de lipoproteínas o membranas biológicas y como un modelo de interacciones proteína-lípido (Aggerbeck *et al.*, 1976).

Las fosfolipasas A₂ pueden dividirse en dos grupos, con base en las diferencias en la distribución de los enlaces disulfuro y en ciertos segmentos en la secuencia de aminoácidos. Grupo I, enzimas a partir de veneno de serpiente de la familia Elapidae (Elapinae, Laticaudiinae, Oxyuraninae e Hydrophiinae) y páncreas de mamíferos. Grupo II, enzimas a partir de veneno de serpiente de la familia Viperidae (Viperinae y Crotalinae) y plaquetas de mamíferos (Fujii *et al.*, 1998).

En este artículo se presenta la purificación de PLA₂ a partir de veneno de *Bothrops atrox* proveniente de Chiriguana (Cesar).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Veneno crudo liofilizado colectado de varias serpientes de la especie *Bothrops atrox* de Chiriguana (Cesar, Colombia) almacenado en el Instituto Nacional de Salud de Santafé de Bogotá. Sephadex G-75 y G-25 de Pharmacia (Upsala, Sweden), ácido acético (96%) de Merck, suspensión de yema de huevo como sustrato, proteínas patrones de peso molecular (LMW) de Pharmacia, y los demás reactivos de Sigma.

Métodos

Actividad fosfolipasa A₂

La actividad de la PLA₂ fue determinada por el método de

valoración potenciométrica, usando emulsión de yema de huevo como sustrato a pH 8 y 25°C como lo describieron Martin-Moutot y Rochat (1979). Los ácidos grasos liberados fueron titulados con NaOH 5 mM. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que libera un milliequivalente de ácido graso por minuto.

El ensayo de hemólisis indirecta (Habermann y Hardt, 1972) con eritrocitos de cordero fue usado para identificar la PLA₂ durante el fraccionamiento del veneno.

Purificación de fosfolipasa A₂ a partir de veneno *Bothrops atrox*

• Cromatografía de exclusión

El veneno de *Bothrops atrox* (100 mg) fue disuelto en 1 ml de ácido acético 5%. El pequeño precipitado fue eliminado por centrifugación (30 min a 1800 g). El sobrenadante (extracto crudo) fue aplicado a una columna (2,6 x 71,5 cm) con Sephadex G-75, equilibrada con ácido acético 5%, y la elución se realizó a un flujo de 1 ml/min. La fracción con actividad PLA₂ fue colectada y reunida en una de 90 ml, eliminando algunas muestras para evitar contaminación con otros componentes de diferentes pesos moleculares (fracción 3).

El volumen de la fracción 3 se aplicó a una columna (1,6 x 14,5 cm) Sephadex G-25 equilibrada con ácido acético 10 mM pH 5. Para el cambio de solvente se hicieron inyecciones sucesivas de 5 ml. Éste fue el volumen de muestra máximo que se determinó experimentalmente, de tal manera que se hiciera efectivo el cambio de solvente, observando en el cromatograma la proteína eluída y la conductividad del ácido acético 5%.

• Intercambio catiónico

Una parte de la fracción 3 (equivalente a 8,5 mg de proteína) en ácido acético 10 mM pH 5 se aplicó a una columna MONO S (HR 5/5) de Pharmacia, equilibrada con el mismo solvente. La elución fue llevada a un flujo de 1 ml/min, con un gradiente continuo entre 0 a 1M de NaCl en ácido acético 10 mM pH 5. Las fracciones fueron dializadas contra agua destilada usando membrana 6.000 a 8.000, para retirar la sal.

Electroforesis en gel poliacrilamida

La electroforesis fue realizada en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) y en presencia de b-mercaptoetanol en geles de 0,75 mm de espesor (T 12,6% y C 2,6%) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). El gel fue teñido con nitrato de plata.

RESULTADOS

Purificación PLA₂ a partir de veneno de *Bothrops atrox*

La purificación de fosfolipasa A₂ abarcó de dos etapas: cromatografía de exclusión sobre Sephadex G-75 y cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono S.

En la primera etapa (figura 1), la fosfolipasa A₂ fue eluída en un solo pico (fracción 3). Esta fracción se separó en la columna MONO S (figura 2), de donde se obtuvieron 8 fracciones, todas con actividad PLA₂. La electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 3) en presencia de SDS, en condiciones reducidas y tinción con plata, muestra que todas las fracciones -excepto la III y la IV- tienen una sola banda. Los pesos moleculares de I, II, V y VI son = 17.000 y para VII y VIII, de = 16.000 y 15.800 respectivamente. Las fracciones III y IV muestran dos bandas, con pesos moleculares de = 17.000 y 29.000. La banda de 29.000 es un contaminante con baja concentración proveniente de la fracción 3 de Sephadex G-75.

De acuerdo con la figura 3A, la fracción 1 de Sephadex G-75 presenta bandas entre 16.000 y 54.000; la fracción 2, entre 14.000 y 30.000; la fracción 3, entre 14.000 y 17.000, y para las fracciones 4 y 5 no se detectaron bandas debido a que son compuestos de bajo peso molecular que se pierden en la diálisis.

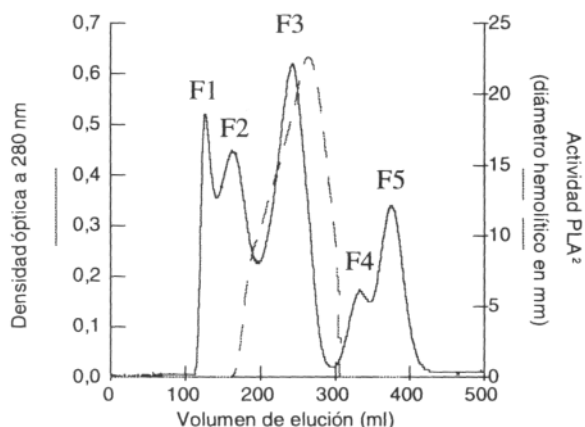


Figura 1. Cromatografía de exclusión del veneno *Bothrops atrox* sobre Sephadex G-75.

Fueron aplicados 100 mg de veneno *Bothrops atrox* a una columna Sephadex G-75 equilibrada con ácido acético 5%. La elución se realizó a 1 ml/min con el mismo solvente y se colectaron fracciones de 10 ml. La actividad de la PLA₂ fue medida por hemólisis indirecta usando como sustrato yema de huevo solubilizada en solución salina (0,85%).

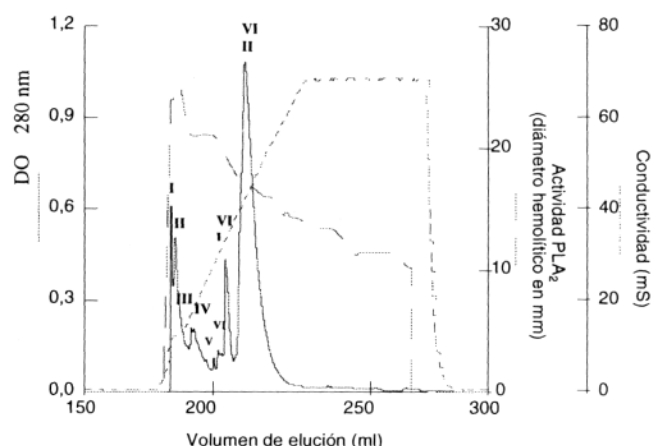


Figura 2. Cromatografía de intercambio catiónico Mono S de la fracción 3 de Sephadex G-75.

Fueron aplicados 8,5 mg de la fracción 3 de Sephadex G-75 a la columna Mono S equilibrada con ácido acético 10 mM pH 5. La elución fue realizada con un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl, se colectaron fracciones de 1 ml. La actividad de la PLA₂ fue medida por hemólisis indirecta usando como sustrato yema de huevo solubilizada en solución salina (0,85%).

Los resultados del proceso de purificación se muestran en la tabla 1.

Los estudios preliminares para optimizar este trabajo se encuentran reportados en la tesis realizada por B. Quevedo (1999).

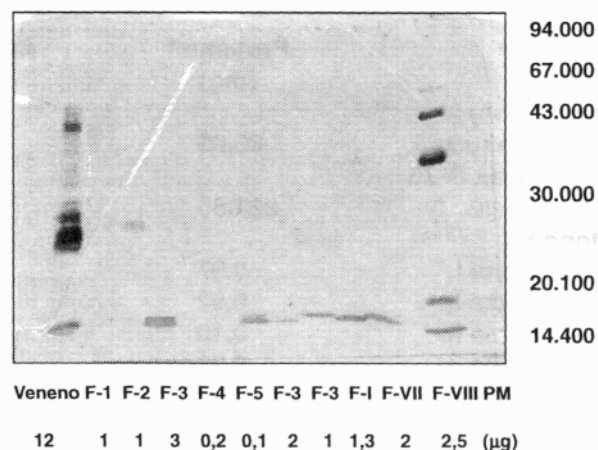


Figura 3A. Electroforesis de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de PLA₂ a partir de veneno de *Bothrops atrox*.

ANÁLISIS

De acuerdo con Heinrikson (1991), la fosfolipasa A₂, por su bajo peso molecular es separada de los demás contaminantes, por cromatografía de exclusión utilizando ácido acético 5% como eluyente. En este trabajo se comprobó esta afirmación para el veneno de *Bothrops atrox* de Chiriguana, ya que en la etapa de cromatografía sobre Sephadex G-75 se obtuvo una mezcla de isoenzimas de PLA₂, detectadas por el método hemolítico. La proteína correspondiente a la fracción 3 fue del 33% con respecto al veneno; con esto se reafirma que la PLA₂ es uno de los mayores componentes del veneno de serpientes.

El uso del ácido acético al 5% en la cromatografía de exclusión para PLA₂ permitió alcanzar resultados, en tanto que no se obtuvieron resultados al usar como solvente buffer fosfato de pH 7,2 para purificar PLA₂ a partir de veneno de *Bothrops insularis*, como lo muestran Cogo y colaboradores (1998), quienes obtuvieron isoenzimas PLA₂ con esterasa en esta etapa.

Por cromatografía de intercambio catiónico Mono S se separaron 8 fracciones de PLA₂, de las cuales 6 presentaron una banda por electroforesis.

Las fracciones encontradas poseen en su mayoría actividades específicas diferentes, pero las fracciones III y IV, que tienen un contaminante, presentan similar actividad específica y el mismo peso molecular, lo cual conlleva a afirmar que puede ser una sola isoenzima. La fracción VIII, con actividad específica muy baja, puede ser una isoenzima

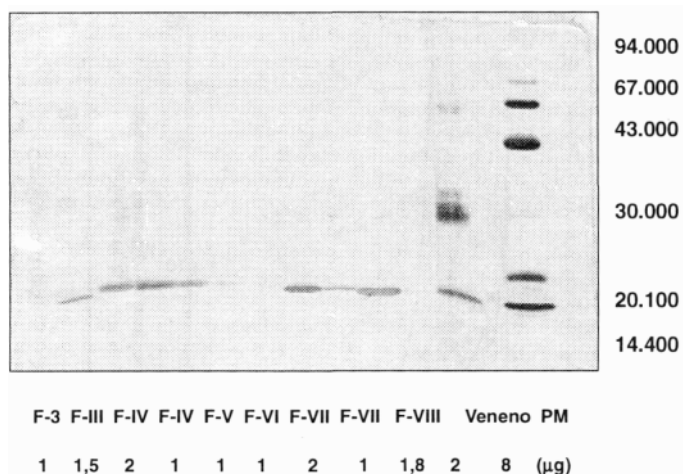


Figura 3B. Electroforesis de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de PLA₂ a partir de veneno de *Bothrops atrox*.

Gel poliacrilamida de las fracciones purificadas de PLA₂, en presencia de SDS (4%) y b-mercaptoetanol (2%). Teñido con nitrato de plata. Las proteínas estándares fueron fosforilasa B (94.000), albúmina (67.000), ovalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000), inhibidor de tripsina (20.100), alfa-lactalbúmina (14.400). 3A) Veneno de *Bothrops atrox* de Chiriguana; F-1 a F-5, fracciones separadas en cromatografía Sephadex G-75. F-I, F-II y F-VII, fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio catiónico Mono S.

3B) Fracción F-3 de la cromatografía sobre Sephadex G-75; Fracciones F-III a F-VIII de la cromatografía de intercambio catiónico Mono S y veneno de *Bothrops atrox* de Chiriguana.

Tabla 1. Resumen de la purificación de PLA₂ a partir de veneno de *Bothrops atrox*

Etapa	Proteína* (mg)	Actividad** (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor pureza
Veneno crudo	66,00	3,52	0,053	1,00
Sephadex G-75				
Fracción 3	21,85	6,12	0,280	5,28
Mono S				
Isoenzima I	0,07	0,12	1,714	32,34
Isoenzima II	0,92	1,04	1,130	21,32
Isoenzima III	0,10	0,10	1,000	18,87
Isoenzima IV	0,32	0,28	0,875	16,51
Isoenzima V	0,16	0,18	1,125	21,23
Isoenzima VI	0,11	0,14	1,273	24,02
Isoenzima VII	0,68	0,40	0,588	11,09
Isoenzima VIII	5,06	0,14	0,028	0,53

* La concentración de proteína fue estimada por el método de Lowry *et al.* (1951).

** La actividad de la PLA₂ fue medida por el método de valoración potenciométrica (Martin-Moutot y Rochat, 1979) usando como sustrato yema de huevo solubilizada en deoxicolato de sodio.

Una unidad de actividad enzimática de PLA₂ se define como la cantidad de enzima que libera un miliequivalente de ácido graso por minuto.

genuina, pero su baja actividad puede ser atribuible a una selección inadecuada de sustrato o de condiciones de trabajo.

La multiplicidad de isoenzimas parece ser una característica general de las fosfolipasas A₂ a partir de veneno de serpientes y puede estar relacionada con el alto contenido de esta enzima en el veneno. El número de isoenzimas reportado para la especie *Bothrops atrox*, varía de acuerdo con la localidad y el proceso de purificación. Por ejemplo, Lobo de Araújo y colaboradores (1994) reportaron 5 isoenzimas fosfolipasa A₂ a partir de veneno de *Bothrops lanceolatus*, con actividad específica idéntica, pesos moleculares similares (14.500-15.500), pero con diferentes puntos isoeléctricos. El proceso de purificación constó de cuatro etapas: exclusión, intercambio aniónico, exclusión e intercambio aniónico. Maraganore y colaboradores (1984), al purificar PLA₂ a partir de *Bothrops atrox*, obtuvieron 4

isoenzimas, usando cromatografía de exclusión e intercambio catiónico. Esto puede darse por variaciones de especie a especie o por diferencias en las condiciones de operación.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Salud (INS) y a Colciencias por financiar esta investigación. Al doctor Juan Manuel Rengifo por su valiosa ayuda. A las estudiantes de Biología Luz Ángela Moreno y Adriana Bermúdez, por su colaboración en el trabajo de laboratorio. Al ingeniero Marcelo Riveros Rojas, por su gran apoyo. A los ingenieros Luis Caicedo y Paulo César Narváez Rincón, por sus aportes científicos. Al bacteriólogo Carlos Mario Agudelo, por su apoyo. Al personal del Grupo de sueros y DPT del INS, por las horas de trabajo y los equipos que gustosamente aportaron.

REFERENCIAS

- Aggerbeck, L. R., Kezdy, F. J. and Scanu, A. M. 1976. Enzymatic probes of lipoprotein structure; hydrolysis of human serum low density lipoprotein-2 by phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 251:3823-3830.
- Cogo, J. C., Prado-Franceschi, J., Giglio, J. R., Cerrado, A. R., Cruz-Hofling, J. L., Donato, J. L., Leite, G. B. and Rodrigues-Simioni, L. 1998. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicol.* 36 (10):1323-1332.
- Daniele, J., Bianco, I. and Fidelio, G. 1995. Kinetic and Pharmacologic Characterization of Phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* Venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 318:65-70.
- Dennis, E. A. 1983. Phospholipases. The enzymes. Boyer, R. D. Academic Press. Orlando. 307-353.
- Fujii, S., Ikeda, K. and Hayashi, K. 1998. Catalytic and Toxicity Mechanisms of Secretory Phospholipases A₂. *J. Toxicol. Toxin Reviews.* 17 (3):279-313.
- Habermann, E. and Hardt, K. L. 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* 50:163-173.
- Heinrikson, R. L. 1991. Dissection and sequence analysis of phospholipase A₂. *Meth. Enzymol.* 197:201-214.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227. Aug. 680-685.
- Lobo de Araújo, A., Radvanyi, F. and Bon, C. 1994. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (*Fer de Lance*) venom: molecular and enzymatic properties. *Toxicol.* 32 (9):1069-1081.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis-Farr, A. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mancuso, L. C., Correa, M. M., Vieira, C. A., Cunha, O. A., Lachat, J. J., Selistre de Araújo, H. S., Ownby, C. A. and Giglio, J. R. 1995. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and Characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicol.* 33 (5):615-626.
- Maraganore, J. M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezoy, F. J. and Heinkrikson, R. L. 1984. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. *J. Biol. Chem.* 259 (22): 13839-13843.
- Martin-Moutot, N. and Roachat, H. 1979. Isolation and Characterization of a toxic phospholipase A₂ in the spitting cobra (*Naja naja mossambica mossambica*) venom. *Toxicol.* 17:127-136.
- Nair, B., Nair, C. and Elliott, W. 1975. Action of antisera against homologous and heterologous snake venom phospholipases A₂. *Toxicol.* 13:453-456.
- Quevedo, B. 1999. Purificación y determinación de algunas características de la enzima fosfolipasa en el veneno de *Bothrops atrox*, proveniente de Chiriguaná, Cesar. Tesis para optar al título de Magister en Ingeniería Química. Instituto Nacional de Salud-Universidad Nacional de Colombia. 56-70.
- Slotboom, A. J., Verheij, H. M. and De Hass, G. H. 1982. On the mechanism of phospholipases A₂. Phospholipids. Elsevier Biomedical. New York. 359-434.