



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE MEXICANA Bothrops asper

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
RICARDO ALEJANDRO MOLINAR RODE  
MÉXICO, D. F. 1979



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LAB. TESIS 1979  
ABO M. T. S. - 1979  
FECHA 23/9  
PREC. \_\_\_\_\_  
S. \_\_\_\_\_



PRESIDENTE	Prof. VICTORIA VALLES BOURGES
VOCAL	Prof. ENRIQUE CALDERON GARCIA
SECRETARIO	Prof. LOURIVAL D. POSSANI P.
1er. SUPLENTE	Prof. YOLANDA CABALLERO ARROYO
2da. SUPLENTE	Prof. DOLORES LASTRA AZPILICUETA

Sitio donde se desarrolló el tema:

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN FISILOGIA CELULAR E INSTITUTO DE BIOLOGIA  
U.N.A.M.

Sustentante:

RICARDO ALEJANDRO MOLINAR RODE

Asesor del tema:

DR. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY

Mi agradecimiento y afecto a

DR. LOURIVAL D. POSSANI, POR SU PACIENTE  
DIRECCION Y EL APOYO QUE ME HA BRINDADO

DR. ALEJANDRO ALAGON, POR SU VALIOSA  
AYUDA EN LA REALIZACION DE ESTA TESIS

MIS PADRES, HERMANOS Y AURORA CORREA,  
CON MI CARINÓ

# INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCION	
1. La Toxinología Actual .....	2
2. Venenos de Serpiente .....	3
II. GENERALIDADES SOBRE FOSFOLIPASAS	
1. Definición e Importancia .....	8
2. Propiedades Químicas .....	10
2.1 aislamiento y secuencia .....	10
2.2 isoenzimas .....	11
2.3 especificidad .....	13
2.4 actividad liso-fosfolipásica .....	13
2.5 mecanismo de acción .....	14
2.6 conformación .....	15
3. Efectos Biológicos .....	15
3.1 efectos sobre membrana celular .....	15
3.2 efectos sobre tejido nervioso .....	16
3.3 efectos sobre mitocondrias .....	18
3.4 efectos sobre músculo .....	19
4. Resumen .....	19
III. PARTE EXPERIMENTAL	
1. Materiales y Métodos .....	21
1.1 fuente del material .....	21
1.2 toxicidad .....	22
1.3 determinaciones enzimáticas .....	22
1.4 procedimientos cromatográficos .....	24
1.5 electroforesis .....	26

1.6	estrategia de purificación .....	28
1.7	especificidad .....	29
1.8	análisis de aminoácidos .....	30
1.9	secuencia NH <sub>2</sub> - terminal .....	31
2.	Resultados .....	32
2.1	caracterización del veneno soluble .....	32
2.2	fraccionamiento del veneno soluble .....	34
2.3	caracterización de las fosfolipasas purificadas ..	36
3.	Discusión .....	48
IV.	CONCLUSIONES .....	57
V.	BIBLIOGRAFIA .....	60

INTRODUCCION

## 1. LA TOXINOLOGIA ACTUAL\*

Hasta hace sólo unos cuantos años era el aspecto médico de los venenos animales la única motivación que existía para su estudio. Según datos recopilados por la Organización Mundial de la Salud (1956), cada año se producen 300,000 casos de mordeduras de serpiente en todo el mundo, excluyendo a Rusia, la parte central de China y Europa Oriental. Esto constituye en sí mismo un importante problema de salud pública y una razón suficiente para estudiar los venenos.

Los investigadores han ido descubriendo paulatinamente en los venenos cualidades muy interesantes, por ejemplo: a) constituyen una de las fuentes más ricas de enzimas que existen en la Naturaleza, b) tienen componentes específicos que atacan sustancias, reacciones o tejidos clave dentro del organismo, c) su composición es relativamente simple comparada con otros materiales de origen biológico y d) su estabilidad es muy alta cuando se les protege debidamente.

Por estas razones, la investigación en venenos animales se ha incrementado tan considerablemente en los últimos años. Para darse cuenta de ello basta considerar que cada año se publican más de 10,000 artículos sobre este tema en todo el mundo. Hoy en día la Toxinología va más allá del aspecto médico y tiene en los venenos una herramienta importante para el estudio de los procesos fisiológicos esenciales, una fuente potencial de nuevos agentes terapéuticos y un medio para establecer correlaciones filogenéticas con bases moleculares. En otras palabras, el estudio sobre ve-

\* Revisión hecha en base a los artículos publicados por Christy (1), Zeller (2) y Zlotkin (3)

nenos animales no está enfocado únicamente en el conocimiento de los componentes directamente involucrados en su acción letal, sino en muchos otros componentes con una amplia variedad de acciones biológicas.

## 2. VENENOS DE SERPIENTE\*

Los venenos de serpiente son mezclas muy complejas de diversos tipos de sustancias. Su función biológica probablemente consiste en inmovilizar e iniciar la digestión de la presa, lo cual resulta teleológicamente muy importante para un animal que, como la serpiente, las ingiere íntegramente.

Aunque casi todos los venenos de serpiente están formados en un 90% por proteínas, la proporción de cada sustancia y sus características especiales varían dentro de cada especie. Sin embargo, por lo general se observa que entre más cercana es la relación filogenética de las serpientes, mayor similitud existe entre las propiedades y composición de sus venenos.

Todos los venenos animales contienen usualmente más de un componente tóxico, los cuales tienden a actuar sinérgicamente en el curso de un envenenamiento; el efecto tóxico total es el resultado de la combinación de todas las acciones que ejercen individualmente cada uno de sus componentes. Sin embargo, la principal acción letal de los venenos de elápidos e hidrófi- dos se atribuye a las neurotoxinas, componentes básicos no enzimáticos; lo contrario se puede decir de los venenos de los crotálicos y vipéridos, cuya acción tóxica es fundamentalmente enzimática.

De las 3,500 especies de serpientes que existen aproximadamente en el

\*Revisión hecha en base a los artículos publicados por Minton (4), Rosenfeld (5) y por el U.S. Bureau of Medicine and Surgery (6).

mundo, solamente 200 son venenosas para el hombre. Estas serpientes se clasifican de acuerdo a sus características morfológicas en cinco familias, que son: Crotalidae, Viperidae, Elapidae, Hidropfiidae y Colubridae.

La familia Crotalidae comprende seis géneros: Crotalus, Sistrurus, Agkistrodon, Lachesis y Trimeresurus. A los dos primeros géneros corresponden las serpientes de cascabel, propias del continente americano. El género Bothrops está localizado únicamente en México, Centro y Sur América. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por tener fosas termosensoras entre los ojos y las cavidades nasales.

Los representantes de la familia Viperidae se encuentran ampliamente distribuidas en Africa, Asia y Europa, pero no existe ninguna especie en Australia ni en el continente americano. Los géneros más conocidos de esta familia son los siguientes: Vipera, Bitis, Causus, Cerastes y Equis.

La familia Elapidae incluye a las bien conocidas cobras, mambas y coralillos. Todas las serpientes venenosas de Australia y Nueva Guinea pertenecen a esta familia, pero existen solamente dos géneros de estas serpientes en Norte y Centro América, que son los llamados Micruroides y Micrurus; en América del Sur, existe además el género Leptomicrurus. Se piensa que estos han sido los únicos elápidos que emigraron hacia el Nuevo Mundo desde Asia a través del estrecho de Behring, hace millones de años. Entre los géneros que abundan en Australia y Nueva Guinea podemos mencionar a los siguientes: Acanthophis, Demansia, Denisonia, Notechis, Oxyuranus, Pseudechis y Toxicolamus. Otros géneros que son muy conocidos son: Naja, Dendroaspis, Haemachatus, Bungarus y Ophiophagus; este último género incluye a la Cobra Real, la serpiente más grande del mundo, pues llega a alcanzar los 3 m. de longitud.

La familia Hydrophiidae incluye a las serpientes marinas, las cuales viven en los mares tropicales y subtropicales del Océano Indico y Pacífico; sin embargo, no se encuentran en el Océano Atlántico ni en el Mar Mediterráneo. Solamente un género, el Pelamis, existe en las costas de Centro y Sur América.

La República Mexicana es particularmente rica en serpientes venenosas. Todas ellas se encuentran incluidas dentro de dos familias: la familia Elapidae, con dos géneros (Micruroides y Micrurus) y la familia Crotalidae, con cinco géneros y 60 especies aproximadamente.

A la familia Elapidae corresponden las serpientes de coral o coralillos. Estas serpientes se caracterizan por sus colores brillantes en anillos rojo, negro y amarillo. Mucha gente piensa que son inofensivas porque no tienen su cabeza ancha y las pupilas verticales en elipse; en realidad lo que hace que sean poco peligrosas es su costumbre de permanecer ocultas y su mandíbula tan pequeña, pues su veneno es uno de los más tóxicos que existen.

Las serpientes de la familia Crotalidae se distinguen fácilmente por su cabeza ancha, sus pupilas verticales y su cuerpo rugoso; además, tienen unas fosas termosensoras características debajo de sus ojos. Las serpientes de cascabel (género Crotalus) se encuentran ampliamente distribuidas en toda la República, llegan a medir hasta dos metros de largo y llevan almacenada una gran cantidad de veneno sumamente tóxico.

La mayor parte de las mordeduras de serpiente que ocurren en México, y en general en las zonas tropicales de nuestro continente, son producidas por serpientes que pertenecen al género Bothrops, que reciben el nombre común de "cabezas de lanza", por la forma tan peculiar que tienen. De todas ellas, la más peligrosa es la "nauyaca", que también se llama "barba ama-

rilla" o "cuatro narices", cuyo nombre científico es el de Bothrops asper. Esta serpiente de 1.5 - 2.5 m. de largo tiene una conducta impredecible, fácilmente se irrita y cuando ataca puede morder repetidamente, inoculando grandes cantidades de veneno. Su distribución es muy amplia, siendo común encontrarla en plantaciones de café y plátano, en zonas selváticas y boscosas poco transitadas y a lo largo de los ríos. En México, su presencia se extiende a todo lo largo de la costa del Golfo, desde el norte de Veracruz hasta la Península de Yucatán.

El veneno de las serpientes botrópicas es fundamentalmente enzimático, predominando en ellos una actividad fisiopatológica de tipo proteolítico y coagulante. Con excepción de la aminoácido oxidasa, todas las enzimas que contienen estos venenos son hidrolíticas. Entre ellas, la que por sí sola contribuye en mayor proporción a la toxicidad del veneno es la fosfolipasa  $A_2$ , por su potente actividad y por la amplia variedad de efectos biológicos que produce. Debido a que no se ha hecho ningún estudio bioquímico con el veneno de la serpiente Bothrops asper, decidimos llevar a cabo su caracterización bioquímica general, así como la purificación y caracterización de las enzimas con actividad de fosfolipasa tipo  $A_2$ .

GENERALIDADES  
SOBRE  
FOSFOLIPASAS

## 1. DEFINICION E IMPORTANCIA

Las fosfolipasas son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los glicero-fosfolípidos como sustrato para producir distintos derivados según su especificidad.

Las fosfolipasas tipo A (EC 3.1.1.4) catalizan la hidrólisis de un enlace éster en el sustrato, formando un liso-derivado y liberando una molécula de ácido graso (fig. 1). Estas enzimas tienen especificidad posicional: aquéllas que hidrolizan en la posición 1 se designan como fosfolipasas  $A_1$  y aquéllas que hidrolizan en la posición 2 se llaman  $A_2$ . La mayoría de las fosfolipasas de venenos de serpiente son de tipo  $A_2$ . Los liso-derivados que se producen por acción de estas enzimas son sustancias con propiedades detergentes y hemolíticas muy intensas (1,7,28,29).

Las fosfolipasas tipo B (EC 3.1.1.5) actúan sobre los liso-fosfolípidos, eliminando la molécula de ácido graso restante, ya sea que esté en la posición 1 ó en la posición 2. Estas enzimas se llaman también liso-fosfolipasas.

La fosfolipasa C (EC 3.1.4.3) rompe el enlace situado entre el ácido fosfórico y el glicerol, y la fosfolipasa D (EC 3.1.4.4) actúa entre el ácido fosfórico y el radical polar, liberando ácido fosfatídico.

\* Este capítulo está basado en la revisión general hecha por Tu (7) y en varios artículos específicos que se numeran a lo largo del texto.

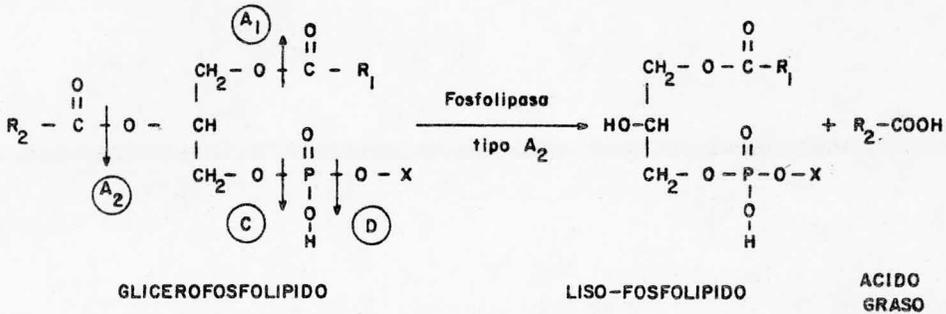


Fig. 1 Sitio de acción de los distintos tipos de fosfolipasas sobre los glicerofosfolípidos.

Los venenos de serpiente constituyen la fuente más rica de fosfolipasas Tipo A<sub>2</sub> hasta ahora conocida. Todos los venenos que se han estudiado contienen este tipo de enzimas, pero generalmente se encuentran en mayor proporción en los venenos de los crotálicos.

Gran parte del conocimiento actual sobre el mecanismo y sitio de acción de las fosfolipasas, así como su especificidad de sustrato, ha sido obtenido gracias al uso de fosfolipasas aisladas de venenos de serpiente (8, 9). También han sido muy útiles para analizar la estructura y función de los tejidos bioeléctricamente excitables y para estudiar la participación de los fosfolípidos en ellos (10, 11, 12, 13). El análisis comparativo de la estructura primaria de estas enzimas ha permitido corroborar las relaciones filogenéticas, establecidas con bases morfológicas, entre las familias Viperidae y Crotalidae (13).

## 2. PROPIEDADES QUIMICAS

### 2.1 Aislamiento y secuencia

Las fosfolipasas tipo  $A_2$  son las enzimas de venenos que mejor se han estudiado, tanto por sus propiedades químicas como por sus efectos biológicos. Todas ellas son, al igual que las neurotoxinas, sumamente estables a temperaturas elevadas.

Recientemente se han aislado en forma homogénea de una gran variedad de venenos de casi todas las familias de serpientes. Para ello se han utilizado principalmente los métodos de precipitación fraccionada y cromatografía por exclusión e intercambio iónico. La cromatografía por afinidad también se ha utilizado para este propósito con excelentes resultados: por este método Rock y col. (14) aislaron una fosfolipasa del veneno de Crotalus adamanteus utilizando análogos de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina como ligandos. La fosfolipasa  $A_2$  de Vipera ammodytes inmovilizada con sefarsa 4B activada con BrCN conserva su actividad enzimática y su toxicidad.

Joubert y Van der Walt (15) han demostrado que modificando el pH y la fuerza iónica del medio, las fosfolipasas  $A_2$  tienden a dimerizar fácilmente. Para los venenos de elápidos, vipéridos y crotálicos, el peso molecular de las fosfolipasas varía entre 9,000 y 15,000 para el monómero, y entre 18,000 y 30,000 para el dímero.

La composición de aminoácidos de las fosfolipasas  $A_2$  de venenos revela un alto contenido de cistinas, y debido a que no contienen grupos sulfhidrilos libres, puede concluirse que gran parte de la estabilidad de estas enzimas está dada por el gran número de puentes disulfuro presentes.

Hasta este momento se ha reportado la secuencia completa de aminoáci-

dos para las fosfolipasas  $A_2$  de páncreas porcino (16) y equino (17), del veneno de abeja (18, 19) y del veneno de varias serpientes, incluyendo algunas especies de cobras (20, 21, 22), la vibora tigre australiana Notechis Scutatatus scutatatus (23), la serpiente Bitis gabonica (24), la mocasín acuática japonesa Agkistrodon halys blomhoffii (25) y la serpiente Crotalus adamanteus (12) del sur de los Estados Unidos. Todas ellas, excepto la de abeja y la de la mocasín japonesa, tienen grandes homologías en sus secuencias, sobre todo en lo que respecta a la posición de los puentes disulfuro, a la porción amino terminal y a ciertas regiones que probablemente sean importantes para su actividad enzimática. La semejanza en las secuencias es mayor en los venenos de una misma familia que entre los venenos de distintas familias, lo cual comprueba el hecho de que entre más cercana es la relación filogenética de dos especies, mayor es la similitud que existe entre la estructura química y las propiedades de sus venenos.

## 2.2 Isoenzimas

Existen en la literatura numerosos reportes sobre la presencia de varios componentes con actividad de fosfolipasa en un mismo veneno. Siete fosfolipasas con pesos moleculares entre 15,000 y 23,800 se encontraron en el veneno de Vipera russelli. Se encontraron seis componentes con actividad de fosfolipasa en el veneno de Naja naja, todos ellos con puntos isoeléctricos ácidos y pesos moleculares que van desde 8,500 a 22,000; debido a esto se cuestiona si son realmente isoenzimas en el sentido tradicional. En el veneno de Vipera berus se detectaron tres fosfolipasas distintas, dos de las cuales son inmunológicamente idénticas y otra que es totalmente diferente. Del complejo denominado "crotoxina", proveniente del veneno de Crotalus durissus terrificus se aislaron tres fosfolipasas  $A_2$  con puntos

isoelectrónicos de 9.7, 9.7 y 4.8; el hecho de que proteínas con puntos isoelectrónicos tan distintos tengan la misma actividad sugiere que los grupos hidrofílicos de la molécula no son esenciales para su acción catalítica. Del veneno de Bothrops neuwiedii se aislaron dos fosfolipasas con un peso molecular aproximado de 9,500; a una fuerza iónica y pH adecuados, estas enzimas dimerizan fácilmente.

La existencia de estas formas múltiples de enzima en un mismo veneno puede explicarse de varias maneras:

- a) Las fosfolipasas  $A_2$  tienen isoenzimas en el sentido tradicional.
- b) Las distintas formas de fosfolipasa  $A_2$  observadas son formas poliméricas de la misma enzima.
- c) Algunas formas son artefactos obtenidos durante el proceso de purificación. Por ejemplo, los grupos amido de la asparagina y la glutamina pueden ser hidrolizados hacia ácido aspártico y glutámico, respectivamente.
- d) La enzima original sufre degradación proteolítica y las formas múltiples de esta enzima serían productos de esta degradación.
- e) Algunas formas son productos intermediarios producidos durante la síntesis de la enzima verdadera.

La segunda explicación resulta muy factible, ya que las fosfolipasas  $A_2$  de venenos tienden a dimerizar bajo ciertas condiciones de pH y fuerza iónica. Existen también evidencias que apoyan la cuarta posibilidad, pues se ha visto que la actividad de esta enzima aumenta cuando se le somete a tratamiento con tripsina o HC1; esto sugiere que la eliminación de alguna porción de la enzima no destruye su actividad biológica; sin embargo, esta posibilidad no se aplica tanto a los venenos de elápidos, los cuales no tienen ninguna actividad endopeptidásica. Para aclarar el último punto se tendrá que disponer de la secuencia de aminoácidos para todas las formas múltiples de fosfolipasa en un mismo veneno; serán también útiles los estudios que se hagan sobre la biosíntesis de esta enzima.

### 2.3 Especificidad

Sin tener en cuenta la procedencia de los venenos, todas las fosfolipasas  $A_2$  purificadas liberan predominantemente ácidos grasos poliélicos (poli-insaturados). Ya que los sustratos para esta enzima contienen en su gran mayoría ácidos grasos insaturados en la posición 1 y ácidos grasos insaturados en la posición 2, se concluye que el sitio de hidrólisis se encuentra en esta última posición (26).

La especificidad de las fosfolipasas está dirigida hacia la posición que ocupan los ácidos grasos en el glicerofosfolípido y no tanto hacia el tipo de ácidos grasos que contiene. Esta "especificidad de posición" de las fosfolipasas se ha confirmado mediante el uso de sustratos sintéticos con ácidos grasos conocidos en las posiciones 1 y 2. Sin embargo, se sabe que el tipo de ácidos grasos en estas posiciones ejerce una considerable influencia sobre la velocidad de hidrólisis en la posición 2.

Se ha visto que los plasmalógenos pueden servir como inhibidores competitivos de la enzima. Al igual que la lipasa lipoprotéica, las fosfolipasas  $A_2$  pueden liberar ácidos grasos a partir de complejos fosfolípido-proteína. Se sabe además, que la velocidad de hidrólisis de estos complejos es de 10 a 20 veces mayor que la hidrólisis de fosfolípidos libres.

### 2.4 Actividad liso-fosfolipásica de las fosfolipasas $A_2$

En algunos casos se ha visto que fosfolipasas  $A_2$  de venenos de serpiente ejercen actividad de liso-fosfolipasas (fosfolipasas tipo B). Esto pudiera ser cierto para todas las fosfolipasas tipo  $A_2$ , pero hasta el momento pocos investigadores han estudiado la actividad de estas enzimas a pHs superiores a 9.5, donde esta actividad resulta más evidente. Existe a este respecto un trabajo muy claro hecho en 1973 con la enzima obtenida del veneno de Vipera palestinae (27).

## 2.5 Mecanismo de acción

Para que las fosfolipasas  $A_2$  de venenos de serpiente lleven a cabo su función catalítica requieren que el sustrato se encuentre preferentemente en forma micelar, y no en forma de monómeros o bicapas. Además, es indispensable la presencia de iones calcio.

La forma en que la enzima se une a los iones calcio y al sustrato se postula de acuerdo al siguiente esquema:

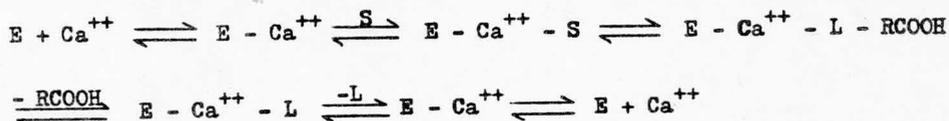


Fig. 2 Mecanismos de acción enzimática. (E) Enzima, (S) Sustrato, (L) Liso-derivado, (RCOOH) Acido Graso.

Los estudios realizados indican que antes de que el sustrato se una a la enzima, el calcio se une a la parte polar del glicerofosfolípido, induciendo un cambio conformacional y una carga parcial positiva que favorece un ataque nucleofílico. Después de formarse el complejo (E -  $Ca^{++}$  - S) se libera el ácido graso y posteriormente el liso-derivado. Finalmente se separa el calcio de la enzima.

## 2.6 Conformación

Por estudios de dicroísmo circular se sabe que la mayoría de las fosfolipasas  $A_2$  poseen un alto grado de estructura helicoidal hacia la derecha. Las porciones no helicoidales de la molécula poseen una estructura al azar. También se han realizado análisis por difracción de rayos X con moléculas cristalizadas de esta enzima.

## 3. EFECTOS BIOLÓGICOS

Las fosfolipasas son quizá los contribuyentes más importantes a la toxicidad de los venenos, por la amplia variedad de efectos biológicos que ocasionan. Gran parte de su efecto tóxico se atribuye a la acción detergente de los liso-derivados que producen, aunque también causan daño directamente a través de la hidrólisis de fosfolípidos integrantes de estructuras celulares.

### 3.1 Efectos sobre membranas celulares

La fosfolipasa  $A_2$  purificada del veneno de Naja naja aumenta la permeabilidad de los hepatocitos de rata. Esto se determina midiendo la liberación de enzimas intracelulares, como la transaminasa glutámico-pirúvica. En un principio la liberación es muy lenta, pero una vez que se ha hidrolizado más de un 25-35% de la fosfatidiletanolamina presente, la liberación se incrementa rápidamente. La morfología celular permanece inalterada en sus rasgos generales hasta que la hidrólisis del fosfolípido es superior al 60%.

En los venenos de las serpientes de los géneros Elapidae, Viperidae y Crotalidae se han encontrado agentes capaces de lisar los eritrocitos (1, 7, 28, 29). Estos agentes pueden ser de acción directa o indirecta. Los factores hemolíticos directos son capaces por sí mismos de ocasionar la hemólisis en una suspensión isotónica de eritrocitos lavados; los factores hemolíticos indirectos requieren además la presencia de un activador, p. ej., fosfatidi-

letanolamina. La capacidad que tienen las fosfolipasas para lisar los eritrocitos es generalmente un efecto indirecto, que se produce después de que han hidrolizado una cierta cantidad de fosfolípidos estructurales o que están presentes en el medio. Los liso-derivados resultantes, debido a sus propiedades detergentes, son los verdaderos agentes hemolíticos. Ciertos componentes básicos, como la gramicidina S, los poli- $\alpha$ -aminoácidos básicos sintéticos (ej. poli (Lis Leu)) y el factor lítico directo (30), pueden facilitar la acción de las fosfolipasas  $A_2$  sobre los glóbulos rojos. Dichos componentes básicos se unen a las membranas celulares por atracción electrostática y exponen los fosfolípidos a la acción enzimática de las fosfolipasas. Aún en presencia del factor lítico directo, el EDTA inhibe la hemólisis producida por la fosfolipasa  $A_2$ , pues captura los iones calcio necesarios para su actividad catalítica.

No sólo los glóbulos rojos son susceptibles a ser rotos por acción de las fosfolipasas  $A_2$  de los venenos, sino también los leucocitos, las plaquetas y las células cebadas. La desintegración de estas células trae como consecuencia la liberación de histamina y otras sustancias que son farmacológicamente importantes en el fenómeno de choque algunas veces asociado con las mordeduras de serpiente.

### 3.2 Efectos sobre tejido nervioso

Se ha visto que las fosfolipasas  $A_2$  de venenos de serpiente aumentan la permeabilidad de la membrana del axón y bloquean su conducción eléctrica.

Los venenos de Haemachatus haemachatus y de Agkistrodon piscivorous piscivorous, y una fracción con actividad de fosfolipasa  $A_2$  obtenida por calentamiento del mismo veneno, son capaces de bloquear la actividad eléctrica y facilitar la penetración de curare y acetilcolina en los axones del cangrejo. El bloqueo eléctrico y el aumento en la permeabilidad celular se atribuyen a los liso-derivados producidos por la acción de la fosfolipasa

A<sub>2</sub> sobre los fosfolípidos de los axones, pues se ha visto que la liso-fosfatidilcolina por sí misma es capaz de producir los mismos efectos. La fosfolipasa tipo C ocasiona la hidrólisis de una gran parte de los fosfolípidos del axón sin producir efectos bloqueadores; a diferencia de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, estas enzimas producen diacilglicéridos y residuos fosforilados, ninguno de los cuales posee propiedades detergentes.

Las vesículas sinápticas de la corteza cerebral de rata, y las vesículas colinérgicas aisladas del órgano eléctrico de Torpedo nobiliana se han utilizado como sustratos para las fosfolipasas A<sub>2</sub> purificadas del veneno de Naja naja siamensis. Aparentemente los liso-fosfolípidos formados debilitan y rompen las vesículas sinápticas, liberando la acetilcolina unida a ellas.

Estudios hechos con fosfolipasa A<sub>2</sub> marcada con iodo radioactivo indican que la enzima no atraviesa significativamente la barrera hematoencefálica, concentrándose preferentemente en el hígado.

### 3.2.1. Efectos neurotóxicos

La  $\beta$ -bungarotoxina, una proteína neurotóxica aislada del veneno de Bungarus multicinctus (31), ocasiona un bloqueo neuromuscular al inhibir la liberación de acetilcolina. Existen evidencias que indican que todos los efectos farmacológicos que tiene se deben a la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> que se encuentra asociada a esta toxina. De aquí surge la pregunta de por qué muchas otras fosfolipasas no tienen efectos neurotóxicos; posiblemente la respuesta radique en la especificidad que tiene la enzima por los sustratos, pues se ha visto que la  $\beta$ -bungarotoxina libera más rápidamente ácidos grasos a partir de membranas neuronales que las fosfolipasas no neurotóxicas. La  $\beta$ -bungarotoxina se puede convertir en una fosfolipasa sin actividad neurotóxica tratándola con anhídrido etoxifórmico en presencia de iones calcio. Esto puede indicar la presencia de dos sitios activos en la toxi-

na, uno para la actividad enzimática y otro para la actividad neurotóxica, el primero de los cuales resultaría protegido por los iones calcio presentes (31, 32).

Otras dos neurotoxinas de serpiente con actividad de fosfolipasa  $A_2$  son la notexina y la crotoxina. La notexina, aislada de la serpiente tigre australiana Notechis scutatus scutatus, tiene una gran homología con la fosfolipasa de páncreas porcino y con la fosfolipasa de Naja naja melanoleuca. La crotoxina, del veneno de Crotalus terrificus, es un complejo de dos proteínas unidas no covalentemente: una fosfolipasa  $A_2$  y una proteína ácida; esta última carece en sí misma de actividad neurotóxica y fosfolipásica, pero potencia la neurotoxicidad e inhibe fuertemente la actividad enzimática (33).

Existen también homólogos de fosfolipasa  $A_2$  sin actividad ni neurotóxica, como el homólogo Notechis II-1, aislado del veneno de Notechis scutatus scutatus (33).

### 3.3. Efectos sobre mitocondrias

En 1959 Petruska y col. (34) trataron por calentamiento los venenos de Agkistrodon piscivorous y de Naja naja para utilizarlos como agentes lipolíticos en el estudio del papel que tienen los fosfolípidos en la estructura de las mitocondrias y en la fosforilación oxidativa. A partir de entonces los estudios en este campo se han ampliado considerablemente.

Los efectos que tienen las fosfolipasas  $A_2$  sobre las partículas submitocondriales los podemos resumir en la siguiente forma:

- a) Pérdida de la integridad de la estructura mitocondrial
- b) Inhibición de la cadena transportadora de electrones
- c) Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa
- d) Solubilización de enzimas mitocondriales unidas a membrana

### 3.4 Efectos en músculo

Se ha observado que la fosfolipasa  $A_2$  purificada a partir del veneno de Laticuda semifasciata ocasiona una leve mionecrosis en músculo esquelético de ratón.

### 4. RESUMEN

Las fosfolipasas  $A_2$  se han encontrado en todos los venenos de serpiente hasta ahora estudiados. Su peso molecular varía entre 9,000 y 15,000 para el monómero, y tienden a dimerizar fácilmente. Su pH óptimo es alrededor de 8.0 y requieren necesariamente de iones calcio para ejercer su actividad catalítica. Su punto isoeléctrico varía entre 4.5 y 9.5; en algunos venenos se han encontrado hasta siete enzimas con actividad de fosfolipasa, por lo que se discute si son realmente isoenzimas en el sentido tradicional. Posee de 6 a 7 puentes disulfuro que confieren a la molécula gran estabilidad. Existe una gran homología en las secuencias de aminoácidos para todas las fosfolipasas de venenos de serpiente, de páncreas porcino y páncreas equino, pero con la fosfolipasa de abeja no existe una homología tan grande.

Estas enzimas atacan el enlace éster situado en la posición 2 de la molécula del glicerofosfolípido, y la velocidad de reacción depende del tipo de ácidos grasos situados en las posiciones 1 y 2. Las fosfolipasas de venenos de serpiente degradan al sustrato preferentemente cuando está en forma micelar y no cuando está en forma de monómeros o bicapas. Algunas de ellas tienen actividad de fosfolipasa tipo B, otras tienen actividad neurotóxica.

Las fosfolipasas  $A_2$  tienen una gran variedad de efectos biológicos, que se manifiestan principalmente sobre la membrana celular, el tejido nervioso, las mitocondrias y en menor grado también sobre el tejido muscular. Todos sus efectos se explican por la degradación de los fosfolípidos estructurales y por la acción detergente de los liso-derivados que se producen.

PARTE EXPERIMENTAL

En esta tesis se describe la caracterización bioquímica general del veneno de la serpiente mexicana Bothrops asper Garman, así como la purificación y algunas propiedades químicas de tres fosfolipasas aisladas del mismo veneno.

## 1. MATERIALES Y METODOS

### 1.1 Fuente del material

El veneno de la serpiente Bothrops asper se obtuvo a partir de ejemplares adultos capturados en San Juan Evangelista (Veracruz, México). Estas serpientes se mantuvieron en el serpentario del Instituto Nacional de Higiene, S. S. A., lugar donde se colectó el veneno\* y se centrifugó inmediatamente a baja velocidad. El sobrenadante liofilizado se guardó en refrigeración a  $-20^{\circ}$  C. hasta el momento de ser utilizado.

El Sephadex G-75 se obtuvo de Pharmacia Fine Chemicals, la dietilaminoetilcelulosa DE-32 de Whatman Biochemical y el Bio Gel P-2 de los laboratorios Bio Rad. Las proteínas patrón para la calibración de la columna de Sephadex G-75 se obtuvieron de Mann Research Laboratories. El ácido hialurónico es de Nutritional Biochemical Co., la albúmina bovina para la cuantificación de hialuronidasa es de los Laboratorios Calbiochem, los ésteres sintéticos N-benzoil-L-arginin-etil éster (BAEE) y N-benzoil-L-tirosin-etil

\*Agradezco al profesor Jordi Juliá su generosa donación del veneno de Bothrops asper

éster (BTEE) son de Sigma Chemical Co., el bis-p-nitrofenilfosfato y el p-nitrofenilfosfato son de Aldrich Chemical Co. Todos los demás reactivos utilizados son de grado analítico.

### 1.2 Toxicidad

La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) del veneno soluble se obtuvo graficando el porcentaje de ratones muertos contra el logaritmo de la dosis aplicada. Las muertes se registraron 20 horas después de inyectar a ratones albinos (cepa local), por vía intraperitoneal, con diferentes dosis de veneno disuelto en 0.1-0.3 ml de solución salina isotónica. Se aplicaron 12 dosis distintas y se utilizaron lotes de 10 ratones para cada dosis.

La toxicidad de varias fracciones protéicas obtenidas durante la separación del veneno se observó en ratones albinos de 18-20 g de peso inyectados intraperitonealmente con cantidades variables de proteína disuelta en solución salina o en amortiguador de acetato de amonio pH 4.7, 20 mM.

### 1.3 Determinaciones enzimáticas

La actividad de fosfolipasa se determinó por dos métodos distintos. Para detectar la presencia de la enzima y hacer ensayos semi-cuantitativos se midió el aclaramiento de una suspensión de yema de huevo en gel de agarosa (35). Para determinaciones cuantitativas se utilizó el método titulométrico de Shiloah y col. (27). Con este método, la actividad enzimática se determina midiendo la velocidad de adición de NaOH 0.05 N necesaria para mantener a pH 8.0 la mezcla de reacción. Esta mezcla está formada por 3.0 ml

de sustrato (yema de huevo al 10% (p/v) en 0.15 M de NaCl) y una cierta cantidad de enzima que permita obtener una relación lineal entre el volumen de NaOH aplicado y el tiempo de adición. La mezcla de reacción se agita vigorosamente con un agitador magnético y se mantiene bajo una atmósfera de nitrógeno a 25°C. Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de proteína necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de ácido por minuto bajo las condiciones anteriores.

La actividad de hialuronidasa se determinó turbidimétricamente a 25°C. según el método de Tolksdorf y col. (36). Una unidad de actividad enzimática se define como aquella cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1  $\mu$ g de ácido hialurónico por minuto a 25°C. en 200  $\mu$ l de una solución de 200  $\mu$ g/ml de ácido hialurónico en un amortiguador a pH 5.3

La actividad esterásica se midió espectrofotométricamente utilizando ésteres sintéticos de arginina (BAEE) y tirosina (BTEE) como sustratos. Los ensayos se llevaron a cabo a 25°C. añadiendo la solución de enzima a una celda de cuarzo conteniendo 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 1mM de BAEE ó 0.5 mM de BTEE en 40 mM de amortiguador TRIS-HCl pH 7.8 en un volumen total de 1.5 ml. Se mide la absorbencia a 255 nm a intervalos de 30 segundos durante un período de 3-5 minutos. Una unidad de actividad enzimática se define como aquella cantidad de proteína necesaria para hidrolizar 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones mencionadas.

La actividad de fosfodiesterasa se determinó por el método de Russel (37) utilizando bis-p-nitrofenilfosfato como sustrato. La fosfatasa alcalina se

cuantificó de acuerdo a la técnica descrita en el Worthington Enzyme Manual (Edición 1977, pág. 138), mientras que la fosfatasa ácida se determinó con la misma técnica utilizando amortiguador acetato de amonio pH 4.7, 20 mM, en lugar de amortiguador TRIS-HCl pH 8.0, 1 mM; en ambos casos se utilizó p-nitrofenilfosfato como sustrato.

#### 1.4 Procedimientos cromatográficos

El Sephadex G-75 y la DEAE-celulosa se prepararon de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes.

El Sephadex G-75 se montó en una columna de (0.9 x 200)cm y se equilibró durante 24 horas con amortiguador de acetato de amonio pH 4.7, 20 mM. Para determinar el volumen de exclusión se utilizó Azul de dextrana y para calibrar la columna se utilizaron los marcadores indicados en la Fig. 3, disueltos en 1.5 ml del mismo amortiguador. En ella se puede observar que el volumen de exclusión fue de 48.8 ml y que los volúmenes de elución de los marcadores aplicados fueron: ovoalbúmina = 63.0 ml, citocromo c = 80.5 ml y cloruro de sodio = 123.6 ml.

El veneno de B. asper (200 mg por peso seco) se solubilizó a 4°C. mezclándolo con 1.5 ml del amortiguador de acetato de amonio pH 4.7 y se centrifugó a 27,000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante, llamado "veneno soluble" (213.8 mg por absorbencia a 280 nm), se aplicó a la columna de Sephadex G-75 previamente calibrada.

Los pasos de purificación que involucran cromatografía de intercambio

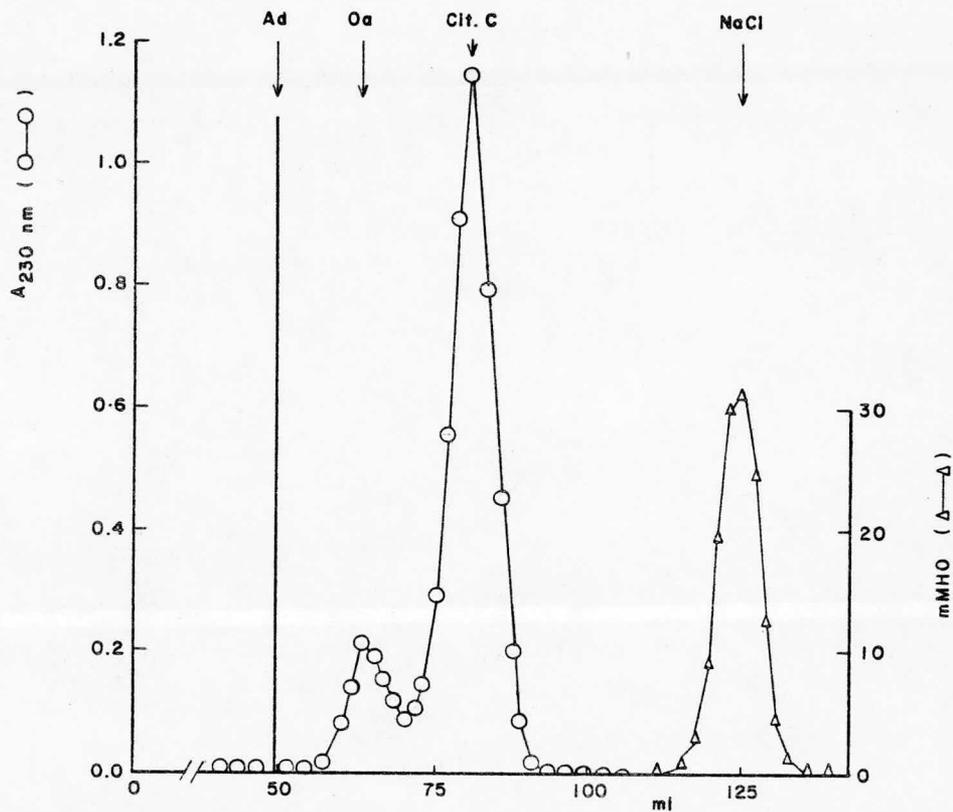


FIGURA 3 Calibración de la columna de Sephadex G-75. Los marcadores utilizados fueron Oa.: ovoalbúmina (PM=45,000), Cit. C.: citoqromo c equino (PM=12,400) y NaCl: cloruro de sodio (PM=58.44). La determinación del volumen de exclusión con Ad.: Azul de dextrana (PM 200,000) se realizó separadamente bajo las mismas condiciones. El cloruro de sodio se determinó conductimétricamente. Dimensiones de la columna: (0.9 x 200)cm. Condiciones: amortiguador acetato de amonio pH 4.7, 20mM, flujo ajustado a 17 ml/hr y fracciones de 30 gotas/tubo (1.9 ml).

iónico se llevaron a cabo con dos columnas de DEAE-celulosa, una de (0.9 x 30) cm y la otra de (0.65 x 42) cm. Las condiciones experimentales para cada una de las columnas cromatográficas están descritas en los pies de las figuras 7, 8 y 9 (ver Resultados).

Todas las columnas se operaron a temperatura ambiente y la concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente asumiendo que 1 unidad de absorbencia a 280 nm equivale a una concentración de proteína de 1 mg/ml, utilizando para ello una celda de cuarzo con 1 cm de trayectoria óptica.

La diálisis para eliminar el exceso de sales después de los pasos cromatográficos en DEAE-celulosa se llevó a cabo en contra del amortiguador apropiado utilizando membranas "Spectrapor Type 3" (aprox. 3,500 Mr cutoff; Spectrum Medical Ind.).

### 1.5 Electroforesis

La electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida (Bio Rad Laboratories) se desarrolló utilizando el método de Jovin y col. (38). La separación se llevó a cabo en geles de (5 x 50)mm con el 7.5% de acrilamida. La cantidad de proteína que se aplicó fue de 20-100 ug disueltos en un volumen final de 200 ul de solución amortiguada con TRIS-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.9 y en presencia de glicerina al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente contra un amortiguador de TRIS-glicina pH 8.3, a una intensidad de corriente de 2.5 mA/tubo hasta que el colorante marcador (Azul de bromofe-

nal) llegó al final del gel. Las proteínas se tiñeron con Azul brillante de Coomassie G-250 (Serva Laboratories) y finalmente los geles se lavaron con ácido acético al 10%.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS) se desarrolló de acuerdo al método de Swank (39). La separación se efectuó en geles cilíndricos de poliacrilamida de (7x90)mm con una composición final del 12% de acrilamida y el 0.2% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo en contra de un amortiguador de TRIS- $H_3PO_4$  pH 6.8, y se aplicó una intensidad de corriente de 6 mA/tubo durante el tiempo necesario para que el colorante marcador (Azul de bromofenol) llegara al final del gel. Como proteínas patrón se utilizaron fragmentos pepsínicos de albúmina bovina (PM del fragmento  $P_{29}$  = 29,000 y PM del fragmento  $P_{31}$  = 35,000), ribonucleasa (PM= 13,500) y melitina (PM= 2,800).

En algunos experimentos la actividad de fosfolipasa se midió directamente en los geles. Para ello éstos se cortaron longitudinalmente en dos partes; una de ellas se tiñó y la otra se cortó en rebanadas de 1.5 mm de espesor para posteriormente determinar en cada una de ellas la actividad de fosfolipasa por el método titulométrico.

La separación de las fosfolipasas F.2 y F.3, descrita en Resultados, se efectuó por electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida de acuerdo a la técnica de Jovin y col. (38). Las condiciones son las mismas que para la electroforesis analítica, excepto que se aplicaron 200 ug de proteína en cada uno de los geles. De los doce geles utilizados, uno fue te-

ñido para determinar la posición relativa de las fosfolipasas y en base a esto se cortaron los demás geles. Las porciones correspondientes a la misma fosfolipasa fueron mezcladas, cortadas en pequeños fragmentos y homogenizadas con 0.5 M de NaCl en amortiguador de acetato de amonio pH 4.7, 10 mM. La mezcla se centrifugó a 27,000 xg durante 20 minutos. El sobrenadante se dializó exhaustivamente contra agua destilada y se concentró por liofilización. Para eliminar cualquier residuo de poliacrilamida que pudiera interferir con el análisis de aminoácidos, las fosfolipasas F.2 y F.3 se cromatografiaron separadamente en una columna de Bio Gel P-2 de (0.9 x 40) cm previamente calibrada con albúmina sérica bovina (1.43 mg/ml). Las fosfolipasas se eluyeron con agua bidestilada a un flujo de 22 ml/hr y se colectaron en fracciones de 0.9 ml/tubo. Finalmente se conservaron liofilizadas.

#### 1.6 Estrategia de purificación

La estrategia de purificación que seguimos hasta obtener las fosfolipasas del veneno de B. asper en forma homogénea se puede ver resumidamente en el diagrama de la Fig. 4. Los datos experimentales de cada uno de los pasos de purificación se describen en la sección de Resultados.

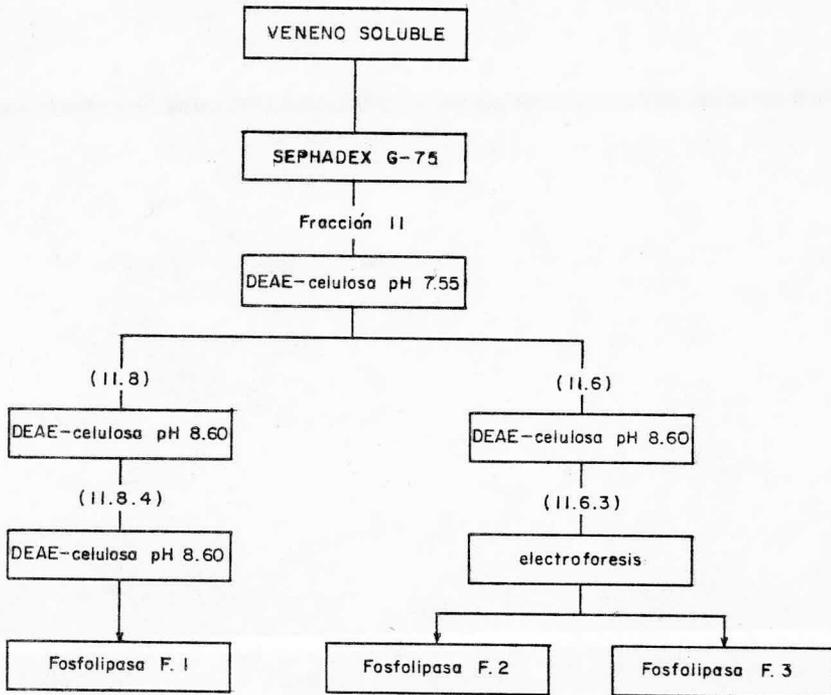


Fig. 4 Estrategia seguida en la purificación de tres fosfolipasas del veneno de B. asper. Los números (II.8), (II.8.4), (II.6) y (II.6.3) representan distintas fracciones cromatográficas (ver detalles en el texto).

#### 1. 7 Especificidad de las fosfolipasas\*

Los fosfolípidos que se utilizaron como sustrato se obtuvieron a partir

\*La determinación de la especificidad de las fosfolipasas se llevó a cabo en el Departamento de Biofísica Molecular y Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad de Yale, New Haven, Connecticut, con la colaboración del Dr. John E. Cronan.

de la cepa FT-17 de Escherichia coli (40). Para cada experimento se utilizaron 50 mg de fosfolípidos disueltos en 2 ml de éter, los cuales se añadieron a 1 ml de una solución 20 mM de amortiguador TRIS-HCl, pH 7.5, conteniendo 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  más una muestra de veneno crudo o fosfolipasa purificada. Esta solución se agitó en vortex a 22°C. por 3 horas. El éter se evaporó bajo una atmósfera de nitrógeno y los fosfolípidos se extrajeron por el método de Bling y Dryer, descrito en el trabajo de Christie (41). La fase de cloroformo se evaporó bajo nitrógeno y se analizó por cromatografía de capa fina en una placa de sílica gel tipo G (Analtech); el sistema de solventes utilizado fue éter de petróleo - éter - ácido acético (70:30:20) durante 20 minutos, y cloroformo - metanol - ácido acético (50:40:10) durante 10 minutos. Los liso-fosfolípidos identificados en la placa se transesterificaron con 0.5 N de metóxido de sodio en metanol y se analizaron por cromatografía de gases (42).

#### 1.8 Análisis de aminoácidos

Se prepararon muestras por duplicado de las fosfolipasas purificadas. Estas muestras se sometieron a una hidrólisis ácida con 6.0 N de HCl y 0.5% de fenol para proteger los residuos de tirosina. El análisis de aminoácidos se efectuó con muestras hidrolizadas a 110°C. por 20, 48, 72 y 120 horas con el objeto de medir la liberación progresiva de los aminoácidos de hidrólisis lenta (valina, leucina e isoleucina) y la destrucción de los aminoácidos sensibles (serina y treonina). El contenido de cisteína se determi-

nó como ácido cistéico de acuerdo al método de Moore (43) y el triptofano se determinó después de una hidrólisis alcalina de la muestra con 4.2 N de NaOH, según el método de Hugli y Moore (44), modificado para un volumen de 100 ul. El análisis de los hidrolizados (45) se efectuó en un analizador automático Durrum D-500, modificado para alta sensibilidad.

#### 1.9 Secuencia NH<sub>2</sub> - terminal +

Para este análisis se utilizaron 23.8 nmoles de fosfolipasa F.1 y 29.2 nmoles de fosfolipasa F.2. Las muestras se disolvieron en ácido trifluoroacético anhidro y se aplicaron separadamente en el secuenciador automático Beckman 890 C. La degradación de Edman automática, la conversión y la extracción de las fracciones eluidas después de cada ciclo se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Possani y col. (45). Los derivados feniltiohidantoína se identificaron por cromatografía de gases y por análisis de aminoácidos, esto último a partir de los derivados hidrolizados con ácido iohídrico (46). La arginina y la histidina se confirmaron posteriormente utilizando fenantrenquinona (47) y reactivo de Pauly (48), respectivamente.

<sup>†</sup>El análisis de aminoácidos y la determinación de la secuencia amino terminal se llevaron a cabo en la Sección de Biología Celular de la Facultad de Medicina, Universidad de Yale, New Haven, Connecticut, con la colaboración del Dr. Paul L. Fletcher, Jr.

## 2. RESULTADOS

### 2.1 Caracterización del veneno soluble

El veneno soluble de la serpiente Bothrops asper presentó una dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de 4.3 ug/g de ratón.

En este veneno se determinaron varias actividades enzimáticas. Los valores de las determinaciones correspondientes aparecen en la Tabla 1. Bajo las condiciones experimentales no se detectó ninguna actividad de fosfatasa ácida o alcalina.

Tabla 1 Actividades enzimáticas cuantificadas en el "veneno soluble" de Bothrops asper

---

Fosfolipasa	6,300 $\pm$ 550 <sup>a</sup>	(4) <sup>b</sup>
Hialuronidasa	3,900 $\pm$ 490	(3)
BAEE Esterasa	63 $\pm$ 0.20	(4)
BTEE Esterasa	8 $\pm$ 0.20	(4)
Fosfodiesterasa	0.46 $\pm$ 0.04	(3)

---

<sup>a</sup> Las unidades de actividad enzimática se definen en Materiales y Métodos, y están normalizadas para 100 mg de proteína  $\pm$  desviación estándar

<sup>b</sup> Las cifras entre paréntesis representan el número de determinaciones independientes.

La electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8.3 de 100 ug de veneno soluble reveló la presencia de 15 bandas de proteína (ver Fig. 5).

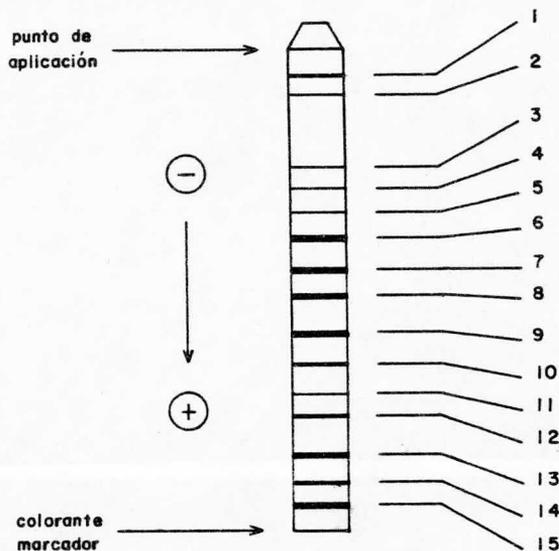


FIGURA 5 Electroforesis del veneno soluble de Bothrops asper. 100 ug de veneno se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% bajo las siguientes condiciones: amortiguador TRIS-glicina pH 8.3, 2.5 mA/tubo, migración hacia el ánodo y tinción con Azul brillante de Coomasie. El veneno se resolvió en 15 bandas de proteína: seis intensas (6, 7, 8, 9, 13 y 15); cuatro moderadas (1, 10, 12 y 14) y cinco débiles (2, 3, 4, 5 y 11).

## 2.2 Fraccionamiento del veneno soluble

El veneno soluble se separó en siete fracciones de distinto peso molecular al ser aplicado a una columna de Sephadex G-75 (Fig. 6).

Los ensayos cualitativos de toxicidad mostraron que las fracciones I a IV son letales aplicando 0.3-0.4 mg de proteína a uno o dos ratones albinos de 20 g de peso; la fracción V resultó ser tóxica pero no letal, y las fracciones VI y VII no fueron tóxicas a estas dosis.

Cuatro de las actividades enzimáticas ensayadas en el veneno soluble se localizaron en las fracciones I a V y su distribución se muestra en la Tabla 2. La hialuronidasa y la fosfolipasa están concentradas principalmente en los picos 2 y 3, respectivamente; la actividad de BAEE-Esterasa se encuentra a todo lo largo de los cuatro primeros picos, con dos máximos de actividad enzimática y la actividad de BTEE-Esterasa se presenta en los picos 1 y 3.

Tabla 2 Distribución de las actividades enzimáticas en las fracciones provenientes de la cromatografía en Sephadex G-75<sup>a</sup>.

Fracciones	I	II	III	IV
Fosfolipasa	7.36	87.94	3.22	1.48
Hialuronidasa	0.00	0.00	95.76	4.24
BAEE Esterasa	22.56	40.06	33.78	3.60
BTEE Esterasa	66.92	8.85	24.23	0.00

<sup>a</sup> Los valores representan el porcentaje respecto al total de la actividad enzimática presente en cada una de las fracciones.

La fracción II, con el 17.5% de las unidades de absorbencia a 280 nm y con el 88.0% de la actividad total de fosfolipasa, se aplicó a una columna de DEAE-celulosa equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio, pH 7.55, 15 mM. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de concentración creciente de KCl (Fig. 7). Se obtuvieron dos fracciones con actividad de fosfolipasa, la fracción (II.6) y la fracción (II.8); la primera mostraba dos actividades de fosfolipasa ligeramente diferenciadas. Los tubos correspondientes a cada fracción se mezclaron y se dializaron contra el amortiguador inicial utilizado en el siguiente paso de purificación.

La fracción (II.8) se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio a pH 8.60 y se eluyó con un gradiente lineal de KCl (Fig. 8-A). La fracción (II.8.4) resultante de este paso se recromatografió bajo las mismas condiciones (Fig. 8-B), obteniéndose un componente principal, homogéneo bajo distintos criterios (ver más adelante), al cual se identificó como Fosfolipasa F.1.

En la Tabla 3 se encuentra resumido el procedimiento y los rendimientos obtenidos en cada paso durante la purificación de esta enzima.

La fracción (II.6) se aplicó a una columna de DEAE-celulosa equilibrada con amortiguador de fosfatos a pH 8.6 y se eluyó con un gradiente salino lineal (Fig. 9). El componente mayor (II.6.3) que se obtuvo en este paso mostró dos bandas de proteína después de analizarla por electroforesis de disco (ver Fig. 10). Las dos bandas tuvieron actividad de fosfolipasa cuando ésta se determinó directamente en los gels (ver la sección de Materiales

y Métodos). A la enzima con mayor movilidad se le llamó Fosfolipasa F.2 y a la de menor movilidad Fosfolipasa F.3.

Debido a que estas dos enzimas no se separaban completamente por filtración en Sephadex G-75 ni por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, se decidió separarlas por electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida, de acuerdo al procedimiento que se describe en Materiales y Métodos, ya que por esta técnica se obtenía muy buena resolución. Los geles preparativos utilizados permitieron obtener un 59% de la actividad enzimática aplicada. Las fosfolipasas aisladas mostraron una sólo banda de proteína cuando se les analizó separadamente por electroforesis de disco (Fig. 10).

La Tabla 4 muestra un resumen de la purificación de las fosfolipasas F.2. y F.3, así como los rendimientos obtenidos.

### 2.3 Caracterización de las fosfolipasas

Las fosfolipasas purificadas se numeraron de acuerdo a su movilidad electroforética (Fig. 10): la fosfolipasa con mayor movilidad se llamó fosfolipasa F.1, la de movilidad intermedia fosfolipasa F.2 y la de menor movilidad fosfolipasa F.3 .

La pureza de las tres fosfolipasas se determinó por electroforesis de disco en geles de poliacrilamida, tanto en presencia como en ausencia de dodecil sulfato de sodio; en ambos casos se obtuvo una sólo banda para cada una de las enzimas. Además, la fosfolipasa F.1 mostró una actividad específica constante a lo largo de todo el pico de elución durante el último

paso de purificación (ver Fig. 8).

El peso molecular calculado con los geles en presencia de SDS fue aproximadamente de 10,000 para las fosfolipasas F.1 y F.2, y de 27,500 para la fosfolipasa F. 3 .

De acuerdo a los resultados de la Tabla 5, las tres fosfolipasas que se purificaron son del tipo  $A_2$ . Los fosfolípidos de E. coli, cepa FT-17, tienen más del 95% de los ácidos grasos insaturados ( $C_{16:1}$ ) en la posición 2, lo cual los convierte en un material muy adecuado para la determinación de la especificidad tipo  $A_2$  de las fosfolipasas. Al analizar la composición de ácidos grasos presentes en los lisofosfolípidos se pudo observar que solamente contenían cantidades mínimas de ácido palmitóico, resultado que concuerda con una especificidad de tipo  $A_2$ .

La composición de aminoácidos de las tres fosfolipasas del veneno de B. asper aparece en la Tabla 6.

La secuencia amino-terminal para las fosfolipasas F.1 y F.2 se determinó utilizando 25-30 nmoles de proteína. Hasta este momento se han identificado los primeros 22 residuos de aminoácidos por degradación de Edman automática.

Para la fosfolipasa F.1. se obtuvo la siguiente secuencia:

$H_2N$  - Asx - Leu - Trp - Glx - Fen - Gli - Glx - Met - X - Ser - X - Val - X -  
X - Lis - Asx - Val - Val - Fen - ...

Para la fosfolipasa F.2 la secuencia que se obtuvo fue la siguiente:

H<sub>2</sub>N - Asx - Leu - Trp - Glx - Fen - Gli - Glx - Met - Met - Ser - Asx - Val -

Met - Arg - Lis - Asx - Val - Val - Fen - Lis - Tir - Leu - ...

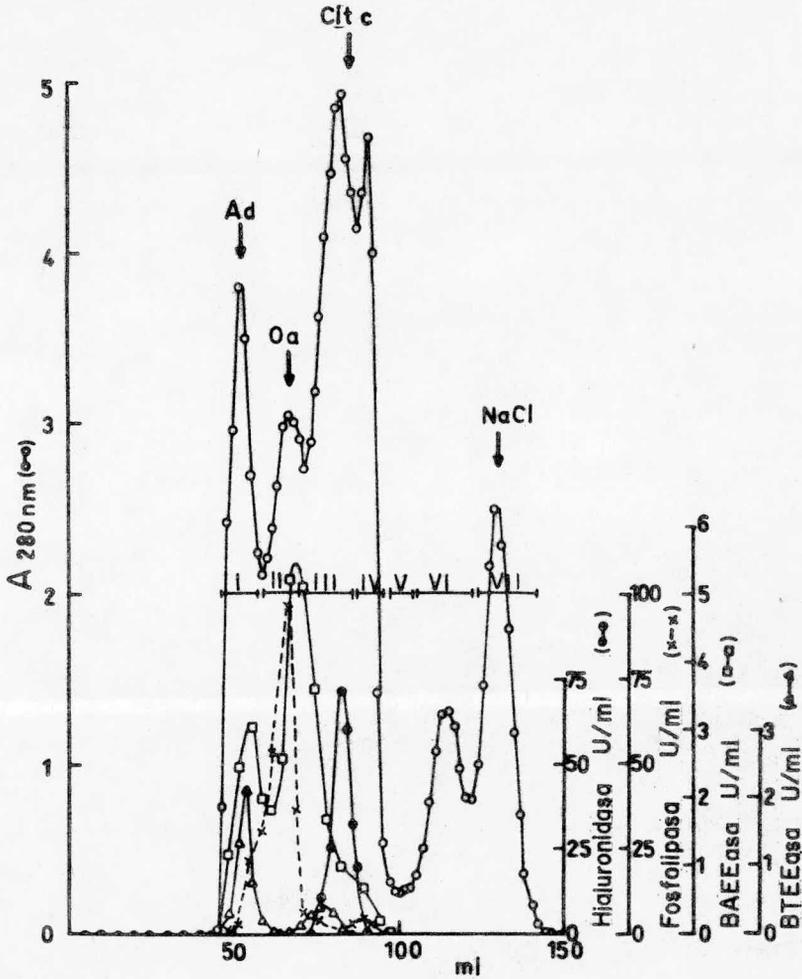


FIGURA 6 Fraccionamiento del veneno soluble de *B. asper* por cromatografía de exclusión molecular. En una columna de Sephadex G-75 de (0.9 x 200) cm se aplicaron 213.8 mg de veneno soluble preparado según se describe en Materiales y Métodos. La columna se eluyó con amortiguador de acetato de amonio pH 4.7, 20 mM, a una velocidad de flujo de 18 ml/hr. Se colectaron fracciones de 1.9 ml/tubo, las cuales se mezclaron de acuerdo a su absorbencia y a su actividad enzimática según se indica por las barras horizontales. El veneno soluble quedó dividido en siete fracciones, que se representan en la figura con números romanos. Se localizaron las actividades enzimáticas de Hialuronidasa (HAasa), Fosfolipasa, N-benzoil-L-arginín-etil esterasa (BAEEasa) y N-benzoil-L-tirosín-etil esterasa (BTEEasa); las unidades de actividad enzimática están definidas en Materiales y Métodos.

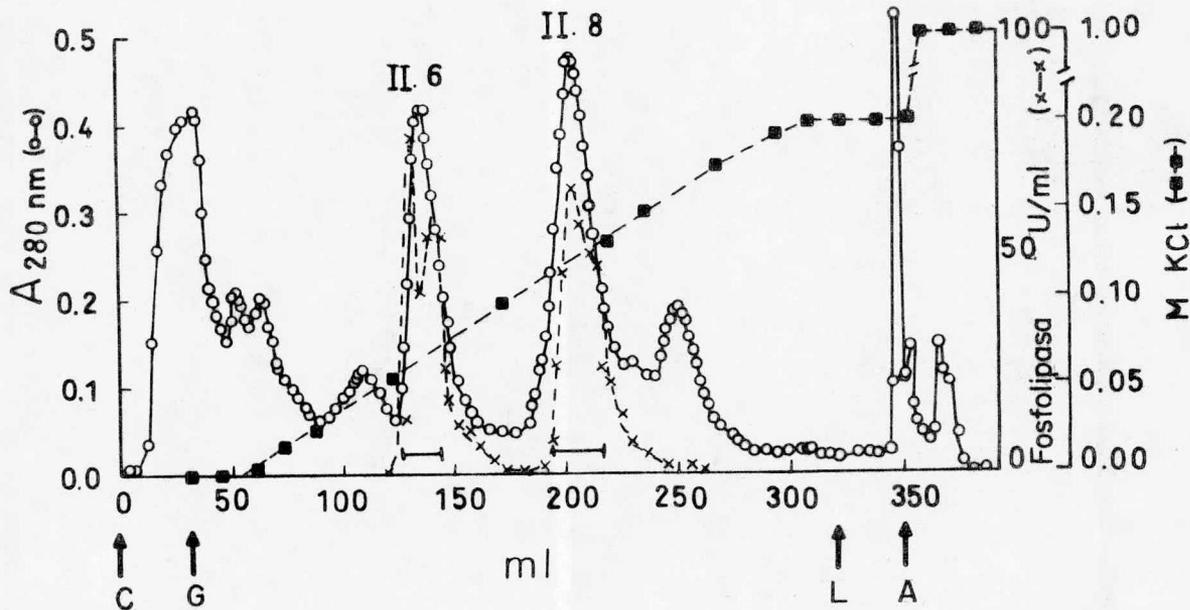


FIGURA 7 Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción II.

La fracción II proveniente del primer paso de purificación se ajustó a un pH de 7.55 con KOH 1.0 M. La muestra (36 ml), conteniendo 45.3 mg. de proteína, se aplicó a una columna de DEAE-celulosa de (0.9 x 30)cm. La columna se eluyó con un gradiente salino lineal formado por 150 ml de amortiguador de fosfato de potasio pH 7.55, 15 mM y por 150 ml del mismo amortiguador con 0.2 M de KCl. La velocidad de flujo fue de 40 ml/hr y se colectaron fracciones de 2 ml/tubo. Las fracciones con actividad de fosfolipasa se mezclaron según se indica por las barras horizontales. La concentración de KCl se determinó conductimétricamente. Los símbolos significan: C- cargado de la muestra, G-inicio del gradiente, L- lavado con amortiguador a la concentración salina inicial y A - lavado con el mismo amortiguador a una alta concentración.

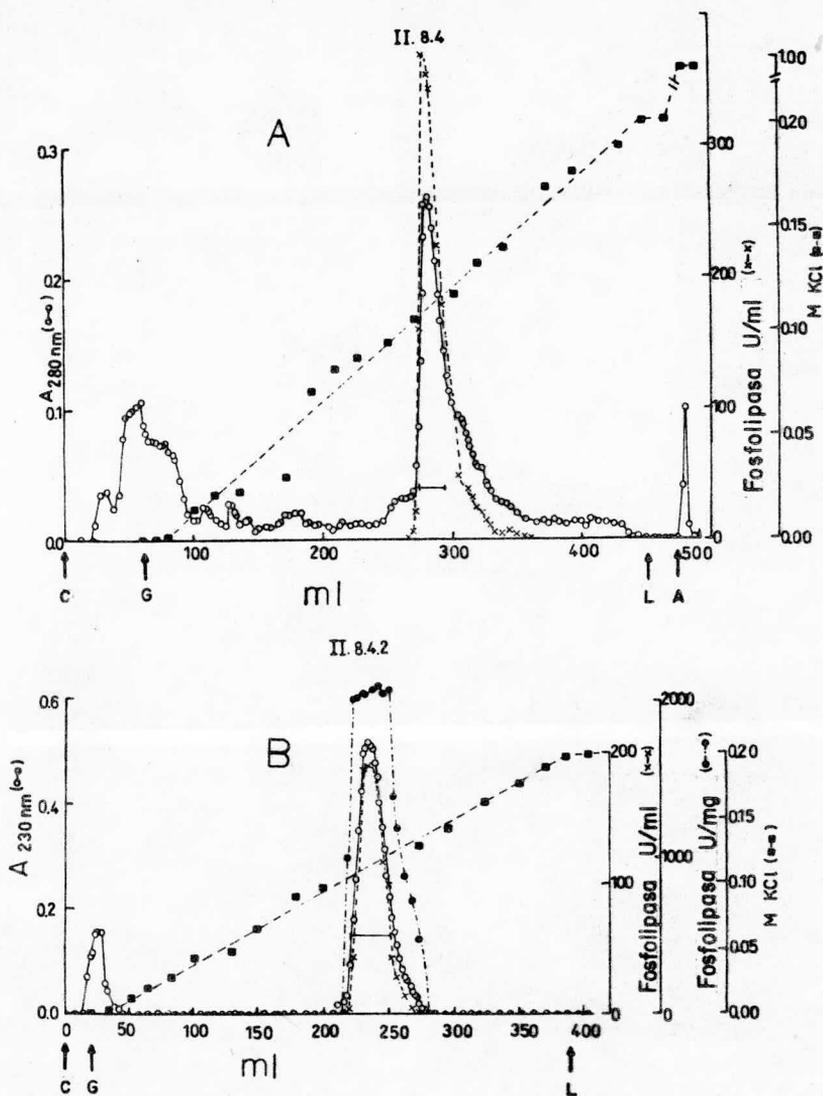


FIGURA 8 Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción (II.8). Purificación de la fosfolipasa F.1. Fig. 8-A: la fracción II.8 (ver fig. 7), conteniendo 16.8 mg de proteína, se dializó y se aplicó a una columna de DEAE-celulosa de (0.65x42)cm. La columna se eluyó con un gradiente lineal hecho con 200 ml de amortiguador de fosfato de potasio pH 8.6, 15 mM y con 200 ml del mismo amortiguador conteniendo 0.2 M de KCl. La velocidad de flujo fue de 30 ml/hr y las fracciones de 2 ml/tubo. De acuerdo a la absorbencia a 280 nm y a la actividad de fosfolipasa, la fracción (II.8.4) se formó según está indicado por la barra horizontal. Fig. 8-B: la fracción (II.8.4) se dializó y se rechromatografid bajo las mismas condiciones, dando el componente (II.8.4.2), llamado posteriormente Fosfolipasa F.1. El significado de los símbolos es el mismo que aparece en la figura 7.

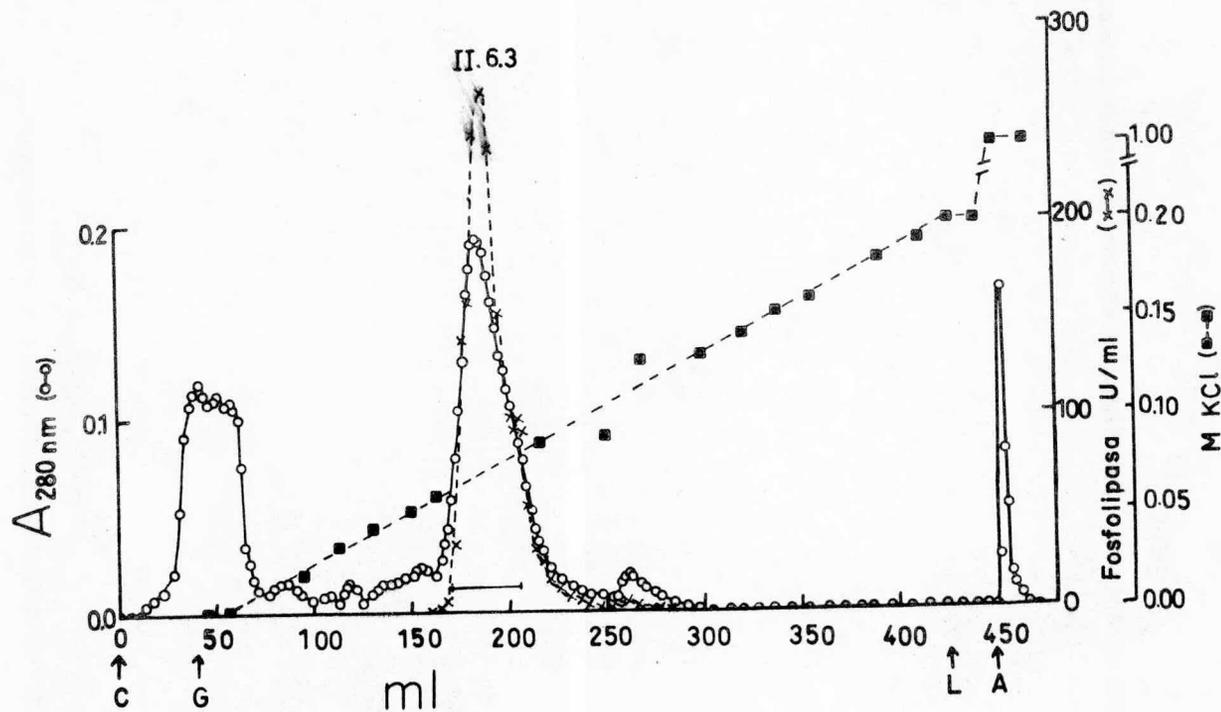


FIGURA 9 Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción (II.6). La fracción (II.6) proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa a pH 7.55 (ver la Fig. 7), con un total de 11.15 mg de proteína, se dializó y se aplicó a una columna de DEAE-celulosa de (0.65 x 42)cm. La columna se eluyó con un gradiente lineal formado por 200 ml de amortiguador de fosfato de potasio pH 8.6, 15 mM, y por 200 ml del mismo amortiguador con 0.2 M de KCl. El flujo fue de 30 ml/hr y las fracciones de 2 ml/tubo se colectaron y mezclaron según se indica por la barra horizontal, de acuerdo a su absorbancia a 280 nm y a su actividad enzimática. Los símbolos tienen el mismo significado que en la figura 7.

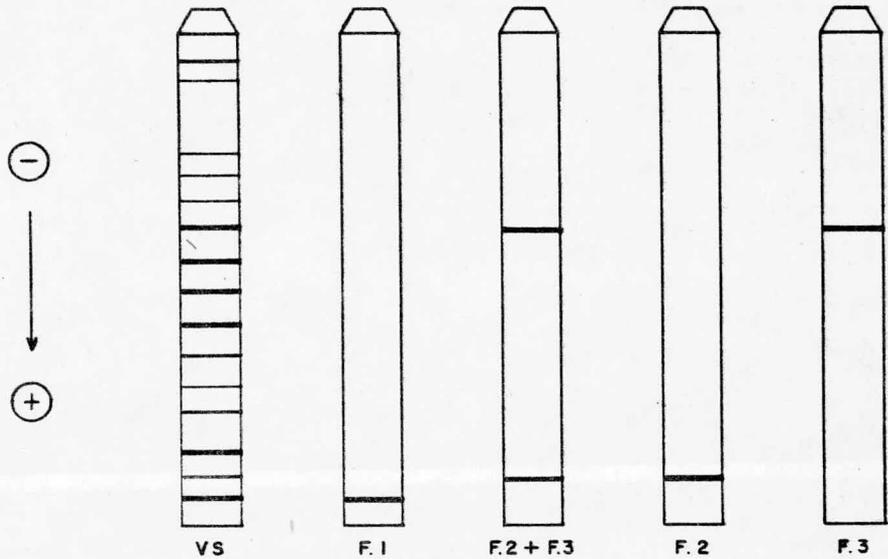


FIGURA 10 Geles de poliacrilamida de diferentes pasos de purificación de las fosfolipasas del veneno de B. asper. VS es el veneno soluble (100 ug), F.1 es la fosfolipasa 1 en estado homogéneo (13 ug), F.2 + F.3 es la fracción II.6.3 proveniente de DEAE-celulosa, con dos bandas que corresponden a las fosfolipasas 2 y 3 (35 ug), F.2 es la fosfolipasa 2 (9 ug) y F.3 es la fosfolipasa 3 (8 ug) después de la electroforesis preparativa y en donde se muestra su homogeneidad. Las condiciones de la electroforesis son las mismas que para la figura 5.

Tabla 3.- Resumen de la Purificación de la Fosfolipasa F.1 del Veneno de Bothrops asper

Fracción	Procedencia de la fracción	Proteína (mg <sup>a</sup> )	Actividad Total (unidades <sup>b</sup> )	Actividad Específica (Unidades/mg)	Recuperación	Relación con la actividad específica del veneno crudo
Veneno crudo	Veneno liofilizado	100.00	6,300	63	100.00	1.00
II	Sephadex G-75	17.48	5,541	317	87.94	5.03
II,8	DEAE-celulosa (pH 7.55)	3.12	1,750	561	27.78	8.90
II,8.4	DEAE-celulosa (pH 8.60)	0.81	1,038	1,281	16.48	20.33
II,8.4.2	DEAE-celulosa (pH 8.60)	0.44	903	2,052	14.33	32.57

<sup>a</sup> Tomando una unidad de A<sub>280</sub> como 1 mg de proteína

<sup>b</sup> Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que libera 1 umol de ácido graso en un minuto, bajo las condiciones experimentales descritas en Materiales y Métodos.

Tabla 4.- Resumen de la Purificación de las Fosfolipasas F.2 y F.3 del Veneno de Bothrops asper

Fracción	Procedencia de la fracción	Proteína (mg <sup>a</sup> )	Actividad Total (unidades <sup>b</sup> )	Actividad Específica (unidades/mg)	Recuperación	Relación con la actividad específica del veneno crudo
Veneno crudo	Veneno liofilizado	100.00	6,300	63	100.00	1.00
II	Sephadex G-75	17.48	5,541	317	87.94	5.03
II.6	DEAE-celulosa (pH 7.50)	2.40	1,730	721	27.46	11.44
II.6.3	DEAE-celulosa (pH 8.60)	1.12	1,176	1,050	18.67	16.67
II.6.3 (F.2)	Electroforesis en gel	0.46	529	1,149	8.40	18.24
II.6.3 (F.3)	Electroforesis en gel	0.15	112	748	1.78	11.87

<sup>a</sup> Tomando una unidad de  $A_{280}$  como 1 mg de proteína

<sup>b</sup> Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graso en un minuto, bajo las condiciones experimentales descritas en Materiales y Métodos.

Tabla 5 Composición de ácidos grasos<sup>(a)</sup> de los fosfolípidos de Escherichia coli FT-17 y de los liso-derivados producidos por acción de las fosfolipasas.

Acido+ Graso	Fosfolípido (sustrato)	Liso-fosfolípidos				
		<u>Crot. adam.</u> <sup>b</sup>	F.1 <sup>c</sup>	F.2 <sup>c</sup>	F.3 <sup>c</sup>	<u>N.n.Koutia</u> <sup>d</sup>
C <sub>14:0</sub>	3.0	1.4	2.2	2.2	1.5	1.0
C <sub>16:0</sub>	40.1	86.3	86.4	86.8	85.8	83.7
C <sub>16:1</sub>	37.4	tr	tr	tr	tr	tr
C <sub>18:0</sub>	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C <sub>18.1</sub>	18.0	12.3	11.3	11.0	12.7	14.5

<sup>a</sup> Porcentaje en peso del metil éster del ácido graso.

<sup>b</sup> Veneno de Crotalus adamanteus usado como control (5 mg).

<sup>c</sup> Fosfolipasas F.1, F.2 y F.3 del veneno de Bothrops asper, ensayadas con 2.8, 5.6 y 8.0 ug respectivamente

<sup>d</sup> Veneno de la cobra Naja naja koutia usado como control (5 mg).

<sup>+</sup> La primera cifra indica el número de átomos de carbono y la segunda indica el grado de insaturación

(tr) significa cantidades mínimas (menos del 0.05%).

Tabla 6 Composición de aminoácidos de las tres fosfolipasas purificadas del veneno de B. asper.

Aminoácido	F. 1		F. 2		F.3	
	nmol	No. entero más cercano	nmol	No. entero más cercano	nmol.	No. entero más cercano
Acido aspártico	12,90	13	13,91	14	32,19	32
Treonina	4,75	5	4,68	5	12,78	13
Serina	5,00	5	3,93	4	22,34	22
Acido glutámico	9,26	9	9,26	9	30,19	30
Prolina	4,21	4	3,45	3	15,76	16
Glicina	9,88	10	9,29	9	24,73	25
Alanina	3,81	4	3,98	4	14,98	15
Cisteína	8,69	9	9,14	9	16,32	16
Valina	6,29	6	6,24	6	16,42	17
Metionina	2,31	2	2,55	3	2,98	3
Isoleucina	3,09	3	2,93	3	13,60	14
Leucina	2,02	2	1,84	2	14,64	15
Tirosina	6,80	7	7,60	8	6,98	7
Fenilalanina	3,56	4	3,75	4	6,31	6
Histidina	0,99	1	0,65	1	5,71	6
Lisina	6,88	7	7,28	7	14,31	14
Arginina	3,06	3	3,09	3	7,84	8
Triptofano	3,14	3	2,10	2	6,79	7
TOTAL		97		96		266
Peso molecular calculado	10978 ±	11	10969 ±	11	29042 ±	31

La composición de aminoácidos se calculó en base a que el número de Asp, Glu, Ala y Leu es respectivamente 13, 9, 4 y 2 para F.1; de 14, 9, 4 y 2 para F.2 y de 32, 30, 15 y 15 para F.3.

### 3. DISCUSION

El veneno de Bothrops asper, al igual que el de la mayoría de los crocótálicos, contiene un gran número de enzimas hidrolíticas, pero no tiene cantidades detectables de neurotoxinas semejantes a las presentes en los venenos de los elápidos (7). La toxicidad de los venenos de esta última familia es por lo menos un orden de magnitud mayor que la DL<sub>50</sub> calculada por nosotros para el veneno de B. asper. Durante la purificación de su veneno, cada fracción obtenida era menos tóxica que el veneno total, lo cual indica la presencia de efectos sinérgicos (ver la fig. 6 y su toxicidad en Resultados). Todo lo contrario sucede durante la purificación de las neurotoxinas de los venenos de elápidos, donde las toxinas puras del tipo son mucho más potentes que el veneno total (49).

La presencia de tres fosfolipasas, varios tipos de estererasas y por lo menos un tipo de hialuronidasa (ver fig. 6 y Tabla 2) no explica todas las bandas de proteína encontradas por electroforesis en geles de poliacrilamida en el veneno soluble (ver fig. 5). En otros venenos de serpientes del mismo género (29) se han encontrado enzimas como la L-aminoácido oxidasa, varias proteasas, 5' nucleotidasas, DNAasas, RNAasas, ATPasas, pirofosfatasas y algunas otras enzimas que probablemente también contiene el veneno de B. asper. La búsqueda de un factor lítico directo en el veneno fue negativa, pero se encontró un factor lítico indirecto posiblemente asociado

con la actividad de fosfolipasa tipo A<sub>2</sub>: cuando el veneno se incubaba previamente con fosfatidilcolina (Sigma Type V-E) por 10 minutos, y se pone posteriormente en contacto con eritrocitos humanos, se observa un marcado efecto hemolítico (50).

Durante todo el proceso de purificación no se detectó ningún inhibidor de fosfolipasas como el reportado por Vidal y Stoppani (51) para el veneno de varias serpientes botrópicas de Sudamérica. Los datos presentados en las tablas 3 y 4 referentes a la recuperación de la actividad enzimática no indican la presencia de este tipo de inhibidores. Tampoco encontramos en este veneno ningún período de latencia al medir la actividad de fosfolipasa por el método titulométrico; sin embargo, con el veneno de Bothrops jararaca (donación del Instituto Butantan, de Sao Paulo, Brasil) pudimos confirmar los resultados de Vidal y Stoppani a este respecto. (Datos no reportados en esta tesis).

Los resultados que mostramos aquí sobre la caracterización general de veneno de B. asper indican que éste es una mezcla de diferentes componentes en los cuales las enzimas proteolíticas parecen predominar. Con el objeto de evitar al máximo la degradación de las fosfolipasas presentes, el fraccionamiento inicial del veneno en Sephadex G-75 se hizo a pH ácido, rango en el cual las proteasas de estos venenos parecen tener escasa actividad (51).

Para la fosfolipasa F.1 se recuperó un 14.33% de actividad enzimática

total con respecto al veneno soluble y se obtuvo un incremento aparente en la actividad específica de 32.6 veces (ver tabla 3). El rendimiento final obtenido para las fosfolipasas F.2 y F.3 con relación a la actividad enzimática total fue de 8.4% y del 1.8%, respectivamente; el incremento aparente en la actividad específica fue así mismo de 18.2 y de 11.9 veces, respectivamente (ver tabla 4). Los rendimientos son relativamente bajos si se los compara con los que se obtuvieron para la fosfolipasa F.1. Esto es debido en parte a que algunas cantidades de enzima se dejaron en los tubos laterales al hacer la selección de las fracciones para los pasos posteriores (ver los cortes indicados por las barras horizontales en las figs. 6, 7, 8 y 9). El rendimiento obtenido en la electroforesis de disco con fines preparativos para la fracción (II.6.3) fue solamente de 54.5%, lo que significa que en el último paso el rendimiento se redujo casi a la mitad. El hecho de que el material inicial, o sea el veneno soluble, sea una mezcla de varias fosfolipasas de las cuales no sabemos su contribución a la actividad fosfolipásica total, dificulta el cálculo del incremento en la actividad específica al final del proceso para cada enzima en particular. Actualmente estamos en busca de un método más simple que proporcione mayores rendimientos, como podría ser una cromatografía de afinidad. Gran parte del éxito que se obtuvo fue debido a la alta estabilidad de estas enzimas.

La caracterización de las tres fosfolipasas, según se describe en Resultados, muestra que son homogéneas bajo distintos criterios. La actividad específica de la fosfolipasa F.1 a lo largo de todo el pico de elución duran-

te el último paso de purificación (Fig. 8-B) fue constante. La electroforesis de disco de los tres componentes purificados reveló solamente una banda de proteína (Fig. 10) y se demostró que la actividad de fosfolipasa estaba asociada a ellas. La recuperación de un porcentaje mayor al 95% del residuo amino-terminal y la obtención de una sola secuencia es consistente con la presencia de solamente un componente protéico para las fosfolipasas F.1 y F.2 sometidas al estudio de la determinación de su secuencia.

Se ha reportado la existencia de un equilibrio dinámico entre las formas monoméricas y dimericas de estas enzimas, que se desplaza en un sentido o en otro dependiendo de factores como la fuerza iónica y el pH del medio (20). En nuestro caso la única indicación que tenemos en este sentido es el volumen de elución obtenido en el Sephadex G-75, ya que las tres fosfolipasas se eluyen entre la ovoalbúmina (PM = 45,000) y el citocromo c (PM = 12,400). Esto sería de esperarse para la fosfolipasa F.3, pero no para las fosfolipasas F.1 y F.2. De acuerdo a la composición de aminoácidos de la tabla 6, la fosfolipasa F.3 no es una forma polimérica de F.1 o de F.2.

Las tres fosfolipasas del veneno de B. asper tienen un mayor contenido de ácido glutámico y aspártico en relación a los aminoácidos básicos, lo cual explica su comportamiento aniónico en las columnas de DEAE-celulosa y en la electroforesis de disco. Las fosfolipasas F.1 y F.2 tienen una composición de aminoácidos muy similar, pero la fosfolipasa F.3 tiene un conte-

nido mucho mayor de residuos hidrofóbicos (Ile y Leu) en términos proporcionales; todo lo contrario sucede con los residuos aromáticos (Fen y Tir), que están proporcionalmente en menor cantidad en esta última enzima. Algunos investigadores han realizado estudios con el objeto de localizar y determinar los residuos implicados en la actividad catalítica. Volwerk y col. (52) reportaron la inactivación de la fosfolipasa de páncreas porcino por reacción del residuo His-47 con bromuro de bromofenacilo; un resultado similar obtuvo Eaker (53) para la notexina del elápidio Notechis scutatus scutatus. Respecto a esto es muy interesante notar que las fosfolipasas F.1 y F.2 descritas en esta tesis contienen solamente un residuo de histidina por molécula, que probablemente sea indispensable para su actividad enzimática. Las tres fosfolipasas que se purificaron contienen de dos a tres residuos de metionina por molécula y las fosfolipasas F.1 y F.2 contienen solamente tres residuos de arginina. Estos datos serán muy útiles para diseñar una estrategia en la determinación de la secuencia completa de estas enzimas.

La cantidad total de aminoácidos en F.1 y F.2 es menor que la observada en las fosfolipasas A<sub>2</sub> purificadas a partir del páncreas porcino (16) y de otros venenos de serpiente (7,54). De acuerdo a la revisión hecha por Tu (7), más de 40 fosfolipasas diferentes han sido purificadas a partir de los venenos de 22 distintas especies de serpientes de las cuatro familias principales. La fosfolipasa A<sub>2</sub> de Bitis gabonica (24) tiene 118 residuos de aminoácidos con 12 cisteínas; la fosfolipasa DE-II del elápidio Naja melano-

leuca (21-23) tiene 119 aminoácidos y 14 cisteínas, mientras que la fosfolipasa A<sub>2</sub> de Crotalus adamanteus (12) tiene 122 residuos con 14 cisteínas.

Ninguna de estas enzimas tiene una composición de aminoácidos muy semejante a la que tienen las tres fosfolipasas de Bothrops asper, excepto la fosfolipasa P.4 del veneno de Vipera berus, con 91 aminoácidos y 10 cisteínas, y la fosfolipasa P.2 del mismo veneno, con 259 residuos y 17 cisteínas (55). Un estudio más amplio hecho con fosfolipasas cortas pero con la misma actividad biológica, proporcionará datos que serán de mucha importancia en el establecimiento de la relación que existe entre la estructura y la función de estas enzimas.

Se determinó una porción de la estructura primaria de las fosfolipasas F.1 y F.2 a partir del extremo amino-terminal. La cantidad de fosfolipasas F.3 no fue suficiente para iniciar la determinación de su estructura primaria. La secuencia de aminoácidos hasta el residuo 22 parece ser la misma en las dos fosfolipasas, aunque existen algunos residuos (simbolizados como X) que no se han confirmado. Si comparamos estas secuencias (Fig. 11) con las que se han obtenido del páncreas de algunos mamíferos y de los venenos de otras serpientes, podremos notar que la región amino terminal es una porción con una gran homología, sobre todo en sus 10 primeros residuos. Conforme aumenta la cercanía filogenética de las especies, la homología se hace cada vez mayor. Los residuos 4-5 (Glx - Fen) son invariantes y el residuo Ile-9 es también invariante en todas las secuencias reportadas previamente.

	5					10					15					20				
<i>Páncreas porcino</i>	Ala	Leu	Trp	Gln	Fen	Arg	Ser	Met	Ile	Lis	Cis	Ala	Ile	Pro	Gli	Ser	His	Pro	Leu	Met
<i>Páncreas equino</i>	Ala	Val	Trp	Gln	Fen	Arg	Ser	Met	Ile	Gln	Cis	Tre	Ile	Pro	Asn	Ser	Lis	Pro	Tir	Leu
<i>N. melanoleuca</i> DE-II	Asn	Leu	Tir	Gln	Fen	Lis	Asn	Met	Ile	Gln	Cis	Tre	Val	Pro	Asn	Arg	Ser	Trp	Trp	His
<i>N. melanoleuca</i> DE-III	Asn	Leu	Tir	Gln	Fen	Lis	Asn	Met	Ile	His	Cis	Tre	Val	Pro	Asn	Arg	Ser	Trp	Trp	His
<i>Bitis gabonica</i>	Asp	Leu	Tre	Gln	Fen	Gli	Asn	Met	Ile	Asn	Lis	Met	Gli	Gln	Ser	Val	Fen	Asp	Tir	Ile
<i>Bothrops asper</i> F. 1*	Asx	Leu	Trp	Glx	Fen	Gli	Glx	Met	X	Ser	X	Val	X	X	Lis	Asx	Val	Val	Fen	
<i>Bothrops asper</i> F. 2*	Asx	Leu	Trp	Glx	Fen	Gli	Glx	Met	Met	Ser	Asx	Val	Met	Arg	Lis	Asx	Val	Val	Fen	Lis
<i>Crotalus adamanteus</i>	Ser	Leu	Val	Gln	Fen	Glu	Tre	Leu	Ile	Met	Lis	Val	Ala		Lis	Arg	Ser	Gli	Leu	Leu
<i>A. halys blomhoffii</i>	Ser	Leu	Met	Gln	Fen	Glu	Tre	Leu	Ile	Met	Lis	Ile	Ala		Gli	Arg	Ser	Gli	Ile	

FIGURA 11 Comparación de las secuencias en la región amino-terminal de las fosfolipasas  $A_2$  de páncreas porcino y equino, y de los venenos de *Naja melanoleuca* (DE-II y DE-III), de *Bitis gabonica*, de *Crotalus adamanteus* y de *Agkistrodon halys blomhoffii* (Tomadas de Tu (7) y Henrikson (12)). Las secuencias de las fosfolipasas F.1 y F.2 de *Bothrops asper*\* se intercalaron buscando una mayor homología con las secuencias vecinas. Los residuos invariantes en más de una especie se encerraron dentro de cuadros y los residuos comunes sólo dentro de una misma especie se encerraron con línea discontinua. Se introdujeron algunos espacios en las secuencias buscando alinear los residuos bajo la máxima homología posible.

Los análisis comparativos de las secuencias de aminoácidos proporcionan las bases sobre las cuales se especula acerca de la posición de los puentes disulfuro, el sitio activo y los residuos implicados en la función catalítica de las enzimas. Muchas de las ideas que surgen de estos estudios se confirman posteriormente por métodos químicos o análisis cristalográficos. Nosotros esperamos obtener muy pronto mayores datos que nos permitan realizar un análisis estructural más detallado acerca de estas enzimas.

CONCLUSIONES

El veneno soluble de la serpiente mexicana Bothrops asper Garman (San Juan Evangelista, Veracruz) mostró tener 15 bandas de proteína cuando se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8.3. En el mismo veneno se detectaron y cuantificaron las actividades enzimáticas de fosfolipasa, hialuronidasa, N-benzoil-L-arginin-etil esterasa, N-benzoil-L-tirosin-etil esterasa y de fosfodiesterasa; sin embargo, no se detectó ninguna actividad de fosfatasa ácida o alcalina.

La cromatografía del veneno es Sephadex G-75 permitió obtener siete fracciones protéicas, las cuales fueron menos tóxicas que el veneno total (DL<sub>50</sub>=4.3 ug/g de ratón).

La fracción con el mayor porcentaje de actividad de fosfolipasa (fracción II) se separó posteriormente en una columna de DEAE-celulosa a pH 7.55. Las dos fracciones fosfolipasa-positivas que se obtuvieron (II.6 y II.8) se purificaron separadamente en una columna de DEAE-celulosa a pH 8.60. La fracción (II.8.4) se recromatografio en la misma columna y se obtuvo la fosfolipasa F.1 en forma homogénea. La fracción (II.6.3) se separó por electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida a pH 8.3, obteniéndose otras dos proteínas puras, denominadas fosfolipasas F.2 y F.3.

La identificación de los liso-derivados producidos a partir de fosfolípidos de Escherichia coli FT-17 permitió establecer que las tres fosfolipasas purificadas son del tipo A<sub>2</sub>.

El análisis de aminoácidos mostró que la fosfolipasa F.1 está formada por 97 residuos con 9 cisteínas (PM = 10,978 ± 11), que la fosfolipasa F.2 tiene 96 residuos con 9 cisteínas (PM = 10,959 ± 11) y que la fosfolipasa F.3 contiene 266 residuos con 16 cisteínas (PM = 29,042 ± 31).

La secuencia amino-terminal determinada por degradación de Edman automática para la fosfolipasa F. 1 es:

H<sub>2</sub>N-Asx - Leu - Trp - Glx - Fen - Gli - Glx - Met - X - Ser - X - Val -  
X - X - Lis - Asx - Val - Val - Fen - ...

Para la fosfolipasa F.2 la secuencia es:

H<sub>2</sub> N - Asx - Leu - Trp - Glx - Fen - Gli - Glx - Met - Met - Ser - Asx -  
Val - Met - Arg - Lis - Asx - Val - Val - Fen - Lis - Tir - Leu - ...

BIBLIOGRAFIA

1. Christy, N.P., Amer. J. Med., 42, 107 (1967).
2. Zeller, A.E., Mem. Inst. Butantan, 33(2), 349 (1966).
3. Zlotkin. E., Experientia, 29, 1454 (1973).
4. Minton, S.A., Jr., "Venom Diseases", (Thomas, C.C., Publisher), Illinois, (1974)
5. Rosenfeld, G., en: "Animal Venoms and their Venoms" (Bücherl, W., Buckey, E.E., y Deulofen, V., Eds.), Academic Press, New York (1968). Vol. 2, Cap. 34.
6. U.S. Bureau of Medicine and Surgery, "Poisonous Snakes of the World" a manual for use by U.S. Amphibious Forces, (revised edition), U.S. Governments Printing Office, Washington, D.C. (1968). Pp. 49-50.
7. Tu, A.T., "Venoms: Chemistry and Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York (1977).
8. Deems, R.A., Eaton, B.R. y Dennis, E.A., J. Biol. Chem., 250, 9013 (1975).
9. Haas, G.H. de y Van Deenen, L.L.M., Biochim. Biophys Acta, 70, 469 (1963)
10. Bevers, E.M., et al, Biochemistry, 16, 1290 (1977).
11. Deems, R.A. y Dennis, E.A., J. Biol. Chem., 250, 9008 (1975).
12. Heinrichson, R.L., Krueger, E.T. y Keim, P.S., J. Biol. Chem., 252, 4913 (1977).

13. Tsao, F.H.C., Keim, P.S. y Henrikson, R.L., Arch. Biochem. Biophys., 167, 706 (1975).
14. Rock, C.O., y Snyder, F., J. Biol. Chem., 250, 6664 (1975).
15. Joubert, F.J. y Van der Walt, S.J., Biochim. Biophys Acta, 379, 317 (1975).
16. Haas, G.H., de, et al, Biochim. Biophys. Acta, 221, 31 (1970).
17. Evenberg, A., et al, J. Biol. Chem., 252, 1189 (1977).
18. Shipolini, R.A., et al, FEBS Lett., 17, 39 (1971).
19. Shipolini, R.A., et al, Eur. J. Biochem., 48, 465 (1974).
20. Joubert, F.J., Biochim. Biophys. Acta, 379, 329 (1975).
21. Joubert, F.J., Biochim. Biophys Acta, 379, 345 (1975).
22. Joubert, F.J., J. Biochem., 52, 539 (1975).
23. Halpert, J. y Eaker, D., J. Biol. Chem., 250, 6990 (1975).
24. Botes, D.P. y Viljoen, C.C., J. Biol. Chem., 249, 3827 (1974).
25. Samejima, Y., Iwanaga, S. y Suzuki, T., FEBS Lett., 47, 348 (1974).
26. de Haas, G.H. y Van Deenen, L.L.M., Biochem. J., 81, 34P (1961).
27. Shiloah, J., et al, J. Lipid Res., 14, 267 (1973).
28. Rosenfeld, G., Nahas, L. y Kelen, E.M.A., en: "Animal Venoms and their Venoms" (Bucherl, W., Buckley, E.E. y Deulofen, V., Eds.), Academic Press, New York (1968). Vol. 1, Cap. 9.
29. Sarkar, N.K. y Devi, A., en: "Animal Venoms and their Venoms" (Bucherl, W., Buckley, E.E. y Deulofen, V., Eds.), Academic Press, New York

(1968). Vol. 1, Cap. 7

30. Condrea, E., Barsilay, M. y Mager, J., Biochim. Biophys. Acta, 210, 65 (1970).
31. Wernicke, J.F., Vanker, A.D. y Howard, B.D., J. Neurochem., 25, 483 (1975).
32. Howard, B.D. y Troug, R., Biochemistry, 16, 122 (1977).
33. Halpert, J. y Eaker, D., FEBS Lett, 71, 91 (1976).
34. Petruska, E., Quastel, J.H. y Scholefield, P.G., Can. J. Biochem. Physiol., 37, 989 (1959).
35. Habermann, E. y Hardt, K.L., Anal. Biochem., 50, 163 (1972).
36. Tolksdorf, S., et al, J. Lab. Clin. Med., 34, 74 (1949).
37. Russel, F.E., Toxicol., 4, 153 (1966).
38. Jovin, T., Chrambach, A., y Naughton, M.A., Anal. Biochem., 9, 35 (1964).
39. Swank, R.T. y Munkres, K.D., Anal. Biochem., 39, 462 (1971).
40. Taylor, F. y Cronan, J.E., Jr., J. Bacteriol., 126, 518 (1976).
41. Christie, W.W., en: "Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids", Pergamon Press, New York (1973).
42. Cronan, J.E., Jr., y Gelmann, E.P., J. Biol. Chem., 248, 1188 (1973).
43. Moore, S., J. Biol. Chem., 238, 235 (1963).
44. Hugli, T.E. y Moore, S., J. Biol. Chem., 247, 2828 (1972).
45. Possani, L.D., et al, Arch. Biochem. Biophys., 180, 394 (1977)
46. Smithies, O., et al, Biochem., 10, 4912 (1971).

47. Yamada, S. e Itano, H.A., Biochem, Biophys. Acta, 130, 538 (1966).
48. Frank, H. y Petersen, H., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 299, 1 (1955).
49. Chang, C.C. y Lee, C.Y., Arch. Int. Pharmacodyn., 144, 241 (1963).
50. Sosa, B.P., et al, Comunicación en el XXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Chihuahua, México (1978). Pp. 243.
51. Vidal, J.C. y Stoppani, A.O.M., Arch. Biochem. Biophys., 145, 543 (1971)
52. Volwerk, J.J., Pieterse, W.A. y de Haas, G.H., Biochemistry, 13, 1446 (1974).
53. Eaker, D., en: "Peptides: Chemistry, Structure, Biology", (Walter, R. y Meienhofer, J., Eds.), Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Harbor, Mich. (1975). Pp. 17-30.
54. Yang, C.C., Toxicon, suplemento No. 1, 261 (1978).
55. Delori, P.J., Biochimie, 55, 1031 (1973).