

Concurso Punto de Partida

BIOLOGIA

PRIMER LUGAR

BIOQUIMICA DE VENENOS ANIMALES. AISLAMIENTO Y
CARACTERIZACION DE TRES FOSFOLIPASAS DEL
VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops asper*

Por Alejandro Alagón Cano

BIOQUIMICA DE VENENOS ANIMALES

INTRODUCCION

En los últimos años la investigación en venenos animales se ha incrementado en forma explosiva; se calcula que cada año se publican alrededor de 10,000 artículos en este campo (1). En el pasado, los aspectos médicos de los venenos eran la única motivación para trabajar con ellos. Sin embargo, la Toxinología actual va más allá de la mirada médica. Teleológicamente, los componentes de los venenos animales practican una bioquímica farmacológica de alto nivel, ellos han inventado un gran número de nuevas drogas muy activas y específicas que pueden ser útiles herramientas en la elucidación de los mecanismos básicos del sistema nervioso (i.e., apamina, tetrodotoxina) y de las membranas celulares (i.e., melitina, fosfolipasa A, pléptido degranulador de células cebadas) y otros fenómenos fisiológicos; son también fuentes potenciales de nuevos agentes terapéuticos, además de que, con el conocimiento de la estructura molecular de sus componentes, sirven para fines taxonómicos con bases moleculares (2). En otras palabras, la investigación básica en venenos se centra no sólo en el conocimiento de los compuestos directamente involucrados en los efectos letales para el hombre sino también en muchas otras sustancias que poseen un amplio espectro de acciones biológicas.

COMPOSICION

Los venenos animales son mezclas muy complejas de diversos tipos de sustancias. Es impresionante la diversidad en la composición de los venenos de distintos grupos animales, comenzando por los organismos unicelulares hasta llegar a los mamíferos incluyendo los principales phyla de animales terrestres y marinos. Esto se acompaña por la heterogeneidad en las estructuras anatómicas para la formación y liberación de las sustancias tóxicas desde las formas más simples de almacenamiento en los tejidos corporales como es el caso de los peces ponzoñosos hasta los sofisticados aparatos inoculadores de algunos artrópodos. También es alta la diversidad de los efectos patológicos causados por los diferentes venenos comenzando por la irritación que ocasionan algunas secreciones de ciertos artrópodos, el dolor intenso que produce el veneno de las avispas y muchos organismos marinos (3), los efectos necróticos e histolíticos por el veneno de crotálidos y vipéridos (4), hasta llegar a los potentes efectos paralíticos causados por las ponzoñas de los elápidos y alacranes (5, 6).

La variabilidad en la acción es la expresión de la gran diversidad de su composición química. Los animales venenosos incluyen compuestos alifáticos simples en la forma de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos así como compuestos cíclicos como fenoles y quinonas, todos éstos típicos de las secreciones defensivas de los artrópodos (7), compuestos algógenos como el ácido fórmico de las hormigas y la erotonina e histamina en las avispas (8), alcaloides complejos de naturaleza triterpénica y sus derivados glicosídicos, típicos de los venenos de anfibios (9), y un gran grupo heterogéneo de moléculas polipeptídicas que incluye péptidos cortos como los presentes en las secreciones cutáneas de los anfibios y en los venenos de abejas, avispas y serpientes; proteínas

de bajo peso molecular, básicas y termoestables como la neurotoxina de elápidos (cobra) y alacranes; neurotoxinas de alto peso molecular como en la araña Viuda Negra; enzimas, en su mayoría hidrolíticas, de muy diversos tipos como las presentes en los venenos de crotálicos y vipéridos. Estos diversos compuestos nunca aparecen como componentes únicos sino como parte de una mezcla altamente heterogénea. Los efectos patológicos de los venenos son consecuencia de los efectos combinados e interacciones de sus diversos constituyentes.

NEUROTOXINAS

La definición de neurotoxinas exige la demostración experimental de que el compuesto tenga afinidad específica hacia un tejido excitable modificando de alguna manera su funcionamiento normal (1). Dos toxinas de origen marino, la tetrodotoxina y la saxitoxina, son únicas por su gran potencia tóxica y su acción altamente específica ya que bloquean selectivamente los canales de sodio, impidiendo su entrada al interior de la célula, con lo que se evita la depolarización de la membrana y con ello la posibilidad de la conducción del impulso nervioso.

Las neurotoxinas básicas, de bajo peso molecular, obtenidas de las cobras (elápidos) y serpientes marinas (hidrófidos) son las toxinas mejor caracterizadas (10). Desde un punto de vista funcional estas toxinas pueden ser divididas en 3 grupos: 1. Las que bloquean la unión neuro muscular de modo no depolarizante al unirse al receptor de acetilcolina en los vertebrados. En este grupo se incluyen dos tipos de toxinas: Tipo 1, compuestas por una cadena polipeptídica de 61-62 aminoácidos estabilizada por 4 puentes disulfuro y con un peso molecular entre 6,700-7,000. Tipo 2, que incluye a la alfa-bungarotoxina, son proteínas con 71-74 residuos de aminoácidos con 5 puentes disulfuro y un peso molecular de alrededor de 7,800. Este grupo de toxinas constituyen el factor letal más importante de estas serpientes. 2. El grupo de las cardiotoxinas formado por polipéptidos fuertemente básicos (pI arriba de 12), y que son los constituyentes más abundantes en los venenos de elápidos (22-25% del peso seco). Están constituidas por una cadena polipeptídica de 57-62 aminoácidos estabilizada por 4 puentes disulfuro y con un peso molecular entre 6,000-7,000. Estas toxinas son mucho menos potentes que las anteriores (20 veces menos); sin embargo ejercen una amplia gama de acciones farmacológicas como inducir contracciones tanto en músculo liso como estriado (esquelético y cardíaco), bloquear la conducción axonal y la transmisión gangliónica, y lisis células (hemólisis) directamente. El análisis de las estructuras primarias de los tipos 1 y 2 del grupo 1 con las cardiotoxinas demuestran claras semejanzas por lo que se puede especular que están filogenéticamente relacionadas. 3. Este grupo está representado hasta el momento, sólo por la beta-bungarotoxina que difiere en forma bien marcada de las otras discutidas tanto en su química así como en su modo de acción. Esta neurotoxina está compuesta por 179 aminoácidos con un peso molecular de 28,500 y su bloqueo de la unión neuromuscular se debe a un efecto excitatorio presináptico que resulta en el agotamiento de las vesículas terminales y en daño anatómico. El uso de neurotoxinas del grupo 1 para aislar el receptor de acetilcolina mediante columnas de afinidad ha dado magníficos resultados (11).

El veneno de alacrán es otra fuente de neurotoxinas con acciones bloqueadoras y depolarizantes (6 y 12). Son también proteínas de bajo peso molecular (entre 6,500 y 9,000 con la mayoría alrededor de 7,000) de carácter básico y con puentes disulfuro. Hasta la fecha han sido caracterizadas más de 20 de estas neurotoxinas que no muestran un grado tan alto de homogeneidad como en los elápidos e hidrófidos. A menudo la composición y química de los venenos pueden ser usados como herramientas en taxonomía animal y filogénesis como lo ha sido para diferenciar especies de género *Bothrops*, *Laticauda*, y *Naja*, para los alacranes esto mismo se está intentando.

ENZIMAS

Muchas enzimas se encuentran presentes en los venenos de serpientes, sobre todo en los crotálicos y vipéridos (13). La mayoría son enzimas hidrolíticas (hialuronidasas, fosfolipasas, fosfatasa, fosfodiesterasas, diversas enzimas proteolíticas, etcétera), con la notable excepción de la L-aminoácido oxidasa. Los venenos de

algunas serpientes son verdaderos arsenales de enzimas. La mayor parte de lo que se conoce sobre especificidad y modo de acción de las fosfolipasas, ha sido realizado con fosfolipasas de venenos animales. Aunque con menor diversidad, los venenos de alacranes y de himenópteros presentan enzimas.

FOSFOLIPASAS DE VENENOS DE SERPIENTES

Las fosfolipasas son enzimas que degradan en forma hidrolítica fosfolípidos. Se reconocen cinco clases de fosfolipasas de acuerdo a su sitio de acción. Entre todas ellas la que predomina en los venenos de serpientes es la fosfolipasa A_2 (EC 3.1.1.4) conocida en el pasado como lecitinasa, que libera al ácido graso esterificado en la posición 2 del glicerol en los fosfolípidos.

Las fosfolipasas A_1 , son las enzimas de venenos mejor estudiadas tanto por sus propiedades químicas como por sus efectos biológicos. Se sabe desde hace varios años que son enzimas muy estables a temperaturas elevadas.

Recientemente, se han aislado de una gran variedad de venenos de casi todas las familias de serpientes ponzoñosas en forma homogénea (14 a 22). La enzima del veneno de un Hidrófido (serpiente marina) fue estudiada por dos grupos y ambos obtuvieron un peso molecular de alrededor de 11,000 (14 y 22). Para las fosfolipasas de venenos de Elápidos, Vipéridos y Crotálicos el peso molecular varía entre 12,000 y 15,000 para el monómero y es de 30,000 para el dímero, Joubert y Van der Walt (17) han mostrado que cambiando el PH y la fuerza iónica la fosfolipasa A_1 puede ser transformada en un dímero.

Las fosfolipasas A_1 han sido aisladas por los métodos convencionales de filtración en gel y de intercambio iónico. Recientemente, sin embargo, la cromatografía por afinidad ha sido utilizada con éxito (23). La fosfolipasa A_1 de *Vipera ammodytes* inmovilizada por Sefarosa 4 B acrivada con CNBr conserva su actividad enzimática y toxicidad (24).

Por un análisis de aminoácidos las fosfolipasas A de venenos dan un contenido alto de cisteínas y como no presentan sulfidrilos libres puede concluirse que gran parte de la estabilidad de estas enzimas se debe al número elevado de puentes disulfuro presentes.

Hasta el momento se ha reportado la secuencia completa de aminoácidos para las fosfolipasas A_1 de páncreas porcino (25) y equino (26), de veneno de abeja (27) y del veneno de varias serpientes incluyendo varias especies de cobras (28 a 31), la víbora tigre Australiana (32), la víbora gabónica (33), la mocasín acuática japonesa (34), y una cascabel del sur de los Estados Unidos (35). Todas las fosfolipasas, con excepción de la de abeja y de la mocasín japonesa, tienen grandes homologías en sus secuencias. Los análisis de comparación de secuencias (19, 30, 32, 33 y 35) muestran que hay una conservación muy marcada de las posiciones de los puentes disulfuro y de ciertas regiones que se piensan sean importante en la función de estas enzimas.

Gran parte del conocimiento actual sobre el sitio y mecanismo de acción de fosfolipasas, así como su especificidad de sustrato ha sido logrado gracias al uso de fosfolipasas obtenidas de venenos de serpientes (36 a 38).

Se han encontrado múltiples formas de fosfolipasas A_1 en un mismo veneno. Brabanca y Sambray (39) observaron múltiples componentes con actividad de fosfolipasa A_1 del veneno de *Naja naja*. Los puntos isoeléctricos de éstos componentes fueron 4.64, 4.90, 4.94, 5.02, 5.51 y 5.56 (40). Los pesos moleculares de de estos componentes catalíticamente activos varió entre 8,500 y 22,000. Debido a esto, se cuestiona si realmente son isoenzimas en el sentido tradicional. El veneno de *Vipera russelli* contiene siete isoenzimas con peso molecular que varían entre 15,000 y 23,000 (40). Dos fosfolipasas A_1 con peso molecular de aproximadamente 9,500 fueron aisladas del veneno de *Bothrops neuwiedii* (41). Hay tres fosfolipasas A_1 en el veneno de *Vipera berus*. Dos de ellas son inmunológicamente idénticas, mientras que la otra es completamente diferente (42).

El presente trabajo versará sobre el aislamiento y la caracterización bioquímica general de tres fosfolipasas obtenidas del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Garman, 1883). Los resultados preliminares de este estudio fueron presentados en el Primer Congreso Nacional de zoología. Esc. Nal. de Agricultura, Chapingo, México. Octubre de 1977.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE TRES FOSFOLIPASAS DEL VENENO DE LA SERPIENTE MEXICANA *Bothrops asper*

MATERIAL Y METODOS

El veneno fue extraído de ejemplares adultos colectados en San Juan Evangelista, Ver., centrifugado a baja velocidad, liofilizado y almacenado a -20°C . El ácido hialurónico utilizado fue de Nutritional Biochemical Corp. El Benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) y el benzoil-L- tirosina etil éster (BTEE) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Los Sefadex G-10 y G-75 y la dietilaminoetil celulosa CM-32 fueron de Pharmacia y Whatman Biochemical, respectivamente.

Las determinaciones de fosfolipasa fueron hechas midiendo el aclaramiento de una suspensión de yema de huevo en gel de agarosa (43) o bien mediante una procedimiento titulométrico utilizando yema de huevo como sustrato (18). Una unidad de fosfolipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 umole de ácido graso por minuto a pH 8 y 25°C en 3 ml de una solución al 10% (P/V) de yema de huevo en 0.1 M de NaCl. La actividad de hialuronidasa fue medida por un método turbidimétrico (44), con la modificación de que los ensayos se realizaron a 25°C . Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzimas que se requiere para hidrolizar 1 ug de ácido hialurónico por minuto a 25°C es 200 ug de una solución de 200 ug/ml de ácido hialurónico a pH 5.3. Las actividades semejantes a tripsina y a quimotripsina fueron medidas espectrofotométricamente utilizando BAEE y BTEE como sustratos, respectivamente. Estas determinaciones se hicieron a 25°C añadiendo de 25 a 100 ul de la enzima en tampón de aceta de amonio 20 mM (pH 4.7) a una solución de 50 mM CaCl_2 , 1 mM de BAEE o 0.5 mM de BTEE en tampón tris 40 mM (pH 7.8) y midiendo el cambio de absorbencia a 255 nm a intervalos de tiempo de 30 segundos durante 3 a 5 minutos. Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de proteína necesaria para hidrolizar 1 umole de sustrato en las condiciones descritas.

Para remover el exceso de sales después de cromatografía en DEAE-celulosa se utilizó diálisis contra la solución tampón apropiada en membranas Spectrapor Type 3 (Spectrum Medical Industries). La electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida (pH 8.3) se realizó de acuerdo al método de Jovin y colaboradores (45) y los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie G-250 (Serva Laboratories) (46). La electroforesis en geles con duodecil sulfato de sodio (SDS) se hizo conforme al procedimiento de Swank y Munkres (47).

La toxicidad de varias de las fracciones proteicas fue observada en ratones albinos de 18 a 20 inyectados intraperitonealmente con cantidades variables de proteína en 0.1 a 0.3 ml. de solución salina o de tampón de acetato de amonio. La dosis letal media (DL_{50}) del veneno soluble se obtuvo graficando el porcentaje de muertes a 20 horas contra el logaritmo de la dosis, para lo cual se usaron diez ratones para cada una de las doce dosis empleadas.

Los análisis de aminoácidos y la secuencia N-terminal para las fosfolipasas se realizaron como ha sido descrito previamente (12).

RESULTADOS

Caracterización del Veneno Soluble. El veneno de *B. asper* fue solubilizado, a 40°C por 2 horas, con tampón de acetato de amonio 20 mM (pH 4.7) y centrifugado. El sobrenadante (veneno soluble) mostró tener 8 bandas principales y 7 bandas menores en electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 1) y dio una LD_{50} de 86 ug de proteína por 20 g de peso en ratón.

Al veneno soluble se le estudiaron las actividades de fosfolipasa, hialuronidasa, triptica y quimotriptica. Los valores respectivos fueron de $3,900 \pm 490$, $6,300 \pm 550$, 63 ± 0.2 , y 8 ± 0.23 unidades enzimáticas por 100 mg de proteína tomando una unidad de A_{280} como 1 mg de proteína).

Fraccionamiento del Veneno Soluble. El veneno soluble fue cromatografiado inicialmente en una columna de Sefadex G-75 con lo que se obtuvieron siete fracciones de diferente peso molecular (Fig. 2). Las primeras cuatro fracciones tu-

vieron las cuatro actividades enzimáticas probadas y su distribución en cada una de las fracciones se muestra en la Tabla I. Debe hacerse notar que en tanto existe una sola población de hialuronidasa y principalmente una de fosfolipasa, la actividad quimotriptica se distribuye en dos picos de diferente peso molecular y la actividad triptica está presente a todo lo largo de las cuatro primeras fracciones con dos picos principales de actividad. Se realizó un ensayo cualitativo para conocer la toxicidad de las fracciones provenientes del Sefadex G-75 para lo que se utilizaron ratones albinos de 20 g. Las fracciones I a IV fueron letales con 300 a 400 ug, la fracción V fue tóxica pero no letal a la misma dosis y las fracciones VI y VII no fueron tóxicas.

La fracción II con el 87.94% de la actividad total de fosfolipasa aplicada a la columna y el 17.48% del total de proteína, fue cromatografiada en DEAE-celulosa utilizando un gradiente salino lineal en tampón de fosfatos (pH 7.55). Se obtuvieron dos picos con actividad de fosfolipasa, 11.6 y 11.8 (Fig. 3). La fracción 11.6 aparentemente tuvo dos picos de actividad fosfolipásica ligeramente separados. Se juntó la fracción 11.6, dializó y recromatografió en una columna de DEAE-celulosa. La columna fue eluida con un gradiente salino lineal en tampón de fosfatos (pH 8.6) con lo que se obtuvo un componente principal 11.6.3 (Fig. 4). En electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en tampón de Tris-glicina (pH 8.3) este componente tuvo dos bandas (Fig. 5-A), ambas con actividad de fosfolipasa lo que se probó directamente utilizando rebanadas del gel del 1.5 mm y el método de Habermann y Hardt (43). La proteína con mayor movilidad fue llamada Fosfolipasa 1.a y la de menor Fosfolipasa 1.b Se pensó que este método pudiera ser utilizado con éxito para fines preparativos. La separación se realizó de acuerdo a Jovin et al. (45) en geles (7.5% de acrilamida en Tris-glicina, pH 8.3) de 5×50 mm. Se aplicaron 200 ug de proteína en 200 ul de solución que contenía azul de bromofenol como colorante marcador. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente con 2 mA por tubo y se dejó hasta que el colorante llegó al final del gel. La recuperación de las fosfolipasas de los geles se hizo homogeneizando cada una de las porciones del gel con las enzimas en presencia de NaCl 0.5 M en tampón de acetato de amonio 20 mM (pH 4.7) y centrifugando a $27,000 \times g$ durante 20 minutos. El sobrenadante fue dializado exhaustivamente contra agua y concentrado por liofilización. El rendimiento de este procedimiento fue del 54.4% (por proteína) y no produce pérdida detectable de la actividad fosfolipásica. Para limpiar por completo de glicina contaminante a las fosfolipasas fue necesario el uso de una columna de Sefadex G-10.

Una tercera fosfolipasa fue purificada a partir de la fracción 11.8 proveniente de la columna de DEAE-celulosa a pH 8.6 con un gradiente lineal de KCl (Fig. 6-A). Para obtenerla en forma homogénea fue vuelta a cromatografiar en las mismas condiciones anteriores (Fig. 6-B), en donde el componente 11.8 4.2 corresponde a la Fosfolipasa 2.

La purificación de las Fosfolipasas 1.a y 1.b se resume en la Tabla II y lo mismo para la Fosfolipasa 2 en la Tabla III.

Caracterización de las Fosfolipasas. La pureza de las tres fosfolipasas fue comprobada por electroforesis en gel de poliacrilamida tanto en presencia como en ausencia (fig. 5B, C y D) de SDS. El peso molecular aparente por geles del poliacrilamida con SDS fue de 10,000 para las Fosfolipasas 1.a y 2 y de 27,500 para la 1.b.

Las fosfolipasas fueron caracterizadas por análisis de aminoácidos. Para la 1.a y 1.b se hizo un sólo hidrolizado con HCl 6N por 20 horas. Para la Fosfolipasa 2 se hicieron hidrólisis con HCl 6 N a 20, 48, 72 y 110 horas para medir la liberación progresiva de los aminoácidos de hidrólisis lenta, como valina, isoleucina y leucina, y la destrucción de aminoácidos sensibles, como serina y treonina. La determinación de cisteínas en la Fosfolipasa 2 se hizo previa oxidación de la muestra con ácido per fórmico. La cuantificación de triptofano está en proceso. Estos resultados, ya integrados, se muestran en la Tabla IV donde puede apreciarse que las Fosfolipasas 1.a y 2 son muy semejantes en composición, en tanto que, por este criterio, la Fosfolipasa 1.b es distinta a las otras dos.

Se han identificado los primeros 22 residuos de aminoácido por degradación de Edman automática de las Fosfolipasas 1.a y 2. Hasta esta posición ambas Fosfolipasas son idénticas, teniendo una secuencia amino terminal como sigue:

H - Asx-Leu-Trp-Fen-Gli-Glx-Met- Ser-Asx-Val-Met-Arg-Lis-Asx-Val-Val - Fen-Lis Tir Leu. La determinación completa de la secuencia está actualmente en progreso.

DISCUSION

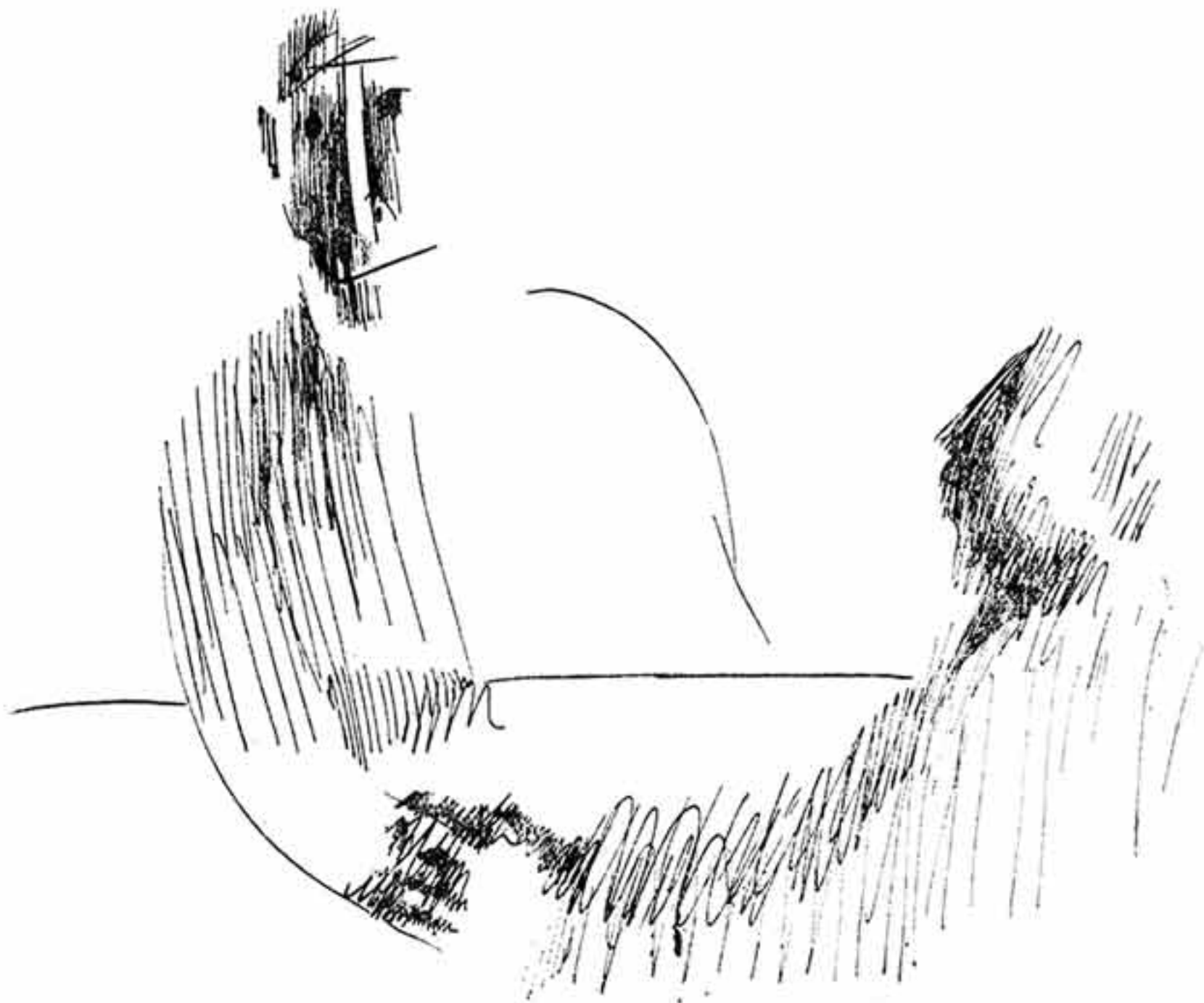
Tres fosfolipasas han sido purificadas del veneno de la serpiente *B asper*, dos de las cuales parecen ser isoenzimas en el sentido estricto de la palabra ya que tienen un peso molecular y una composición de aminoácidos muy semejantes, además de que su secuencia N-terminal es igual. Esto se refuerza porque, de acuerdo a los resultados preliminares, tanto la Fosfolipasa 1.a como la 2 son A_2 .

La posibilidad de que estas fosfolipasas puedan formar dímeros o algún otro estado oligomérico es fuerte, aunque la única indicación en este sentido nos la da el volumen de elución e Sefadex G-75 ya que las tres fosfolipasas salen entre ovoalbúmina (45,000) y citocromo C (12,400), lo que se esperaría para la Fosfolipasa 1.b, pero no para la 1.a y la 2. Actualmente se llevan estudios para aclarar este fenómeno y su dependescia con pH y fuerza iónica.

El uso de una técnica originalmente analítica con fines preparativos para separar las Fosfolipasas 1.a y 1.b ha sido la única que nos ha dado resultados adecuados, si bien el rendimiento (54.5%) es más bien bajo; gran parte del éxito se debió a la alta estabilidad de las enzimas. Estamos en busca de un método más simple y que de rendimientos mayores.

En la Fig. 7 la secuencia amino terminal de las Fosfolipasas 1.a y 2 se compara con las secuencias correspondientes de otras cinco fosfolipasas de diversas fuentes. Los residuos fueron alineados buscando la máxima homología entre ellos, para lo cual se han introducido espacios. Entre todas ellas existe homología. El grupo de los elápidos forma el grupo más homogéneos; el de los crotálidos presenta menos semejanzas. Para poder formar tipos estructurales de fosfolipasas es necesario tener más información sobre la secuencia de otras fosfolipasas de distintas fuentes.

PRIMERA MENCION

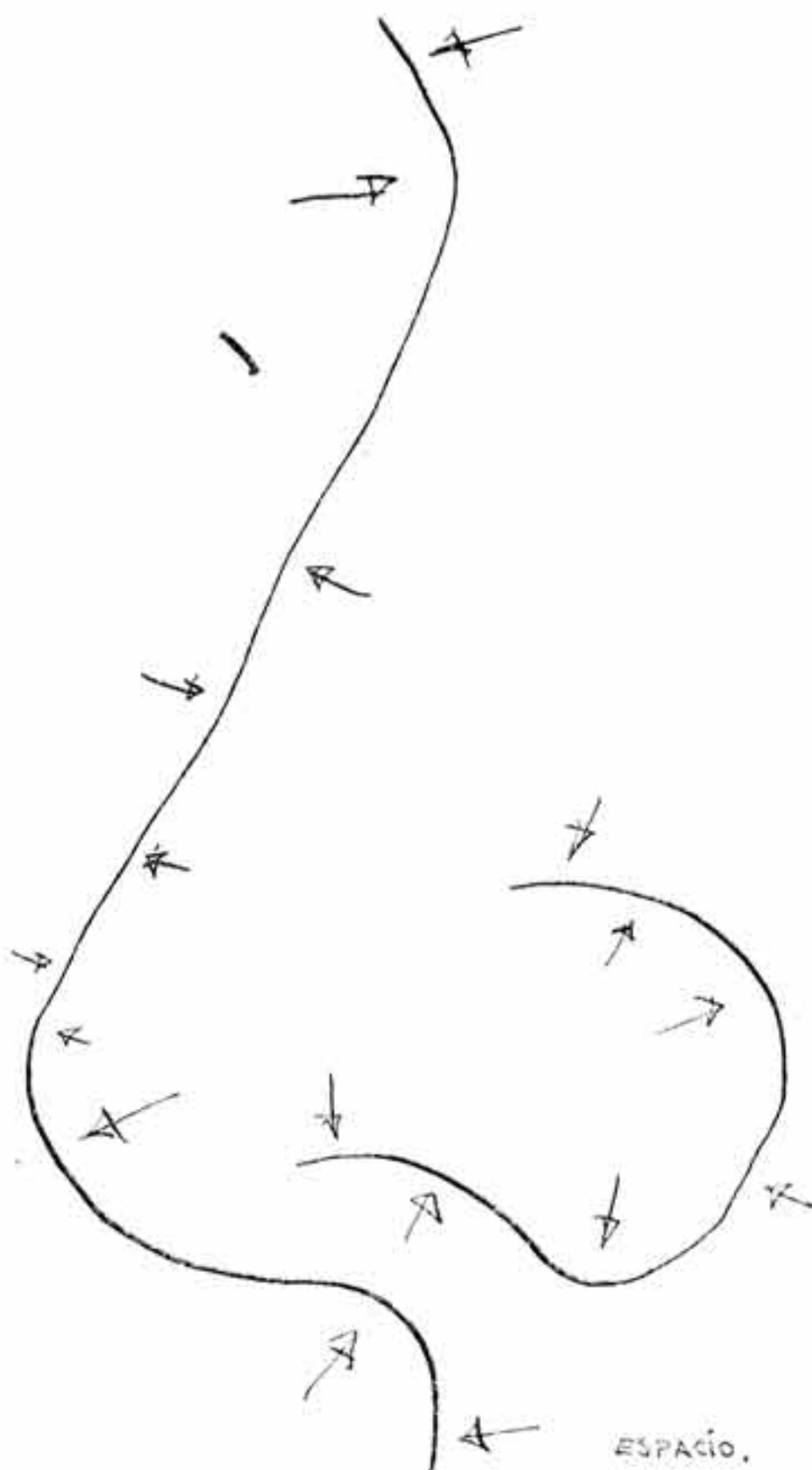


BIBLIOGRAFIA

1. Zlotkin, E., *Experiencia*, 29, 1454 (1973).
2. Dayhoff, M. O., "Atlas of Protein Sequence and Structure". (National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., 1972).
3. Keele, C. A., Armstrong, D., "Substances Producing Pain and Itch: (Edward Arnold, London, 1964).
4. McCollough, N. C. y Gensaro, J. F. (1971) "Treatment of venomous snakebite in the United States", en S. A. Minton, Ed., *Snake Venoms and Envenomation*, Marcel Dekker, New York, p.p. 137-154.
5. Chang, C. C. y Lee, C. y *Br. Pharmacol. Chemother*, 28, 172 (1973).
6. Zlotkin, E. y Shulov, A., *Toxicon* 7, 217 (1969).
7. Pavan, A. y Dazzini, M. V., en *Chemical Zoology* (Eds. Florkin, M. y Scheer, B. T.; Academic Press, New York, London, 1971), Vol. 6, pp. 365.
8. Habermann, E., *Science*. 177, 314-22 (1972).
9. Habermehl, G., *Justus Liebigs Annln. Chem.*, 680, 104 (1964).
10. Tu, A. T., *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 235.
11. Klett, R. P., Fulpius, B. W., Cooper, D., Smith, M., Reich, E., y Possani, L. D., *J. Biol. Chem.*, 248-6841 (1973).
12. Possani, L. D., Alagón, A. C., Fletcher, Jr. PI L., y Erickson, B. W., *Arch. of Biochem. Biophys.*, 180, 394 (1977).
13. Tu, A. T., "VENOMS" (John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto, 1977), pp. 21-148.
14. Tu, A. T., Passey, R. B. y Toom, P. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 140, 96 (1970).
15. Vidal, J. C. y Stoppani. A. O. M., *Arch., Biophys.*, 145, 453 (1971).
16. Joubert, F. J., *Eur. J. Biochem.*, 52, 539 (1975).
17. Joubert, F. J. y Van der Walt, S. J., *Biochim. Biophys. Acta.*, 379, 317 (1975).
18. Shiloah, J., Klibansky, C., De Vries, A., y Berger, A., *J. Lipid Res.*, 14, 267 (1973).
19. Tsao, F. H. C., Keim, P. S., y Heinrikson, R. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 706 (1975).
20. Kawanchi, S., Iwanaga, S., Samejima, Y., y Suzuki, T., *Biochim. Biophysé Acta*, 236, 142 (1971).
21. Botes, D. P. y Viljoen, C. C., *Toxicon*, 12, 611 (1974).
22. Uwatoko-Setoguchi, Y. y Ohbo, F., *Acta. Med. Univ. Kagoshima.*, 11, 139 (1969).
23. Rock, C. O., y Snyder, F., *J. Biol. Chem.*, 250, 6564 (1975).
24. Gubensek, F. *Bull. Inst. Pasteur París*, 74, 47 (1976).
25. de Haas, G. H., Slotboom, A. J., Bonsen, P. P. M. y Van Deenen. L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 221, 31 (1970).
26. Evenberg, A., Meyer, H., Gaastra, W., Verhey, H. M. y de Haas, G. H., *J. Biol. Chem.*, 252, 1189 (1977).
27. Shipolini, R. A., Callewaert, G. L., Cottrell, R. C. y Vernon, C. A., *Eur. J. Biochem.*, 48, 465 (1974).
28. Joubert, F. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 379, 329 (1975).
29. Joubert, F. J. *Biochim., Biophys. Acta*, 379, 345 (1975).
30. Eaker, D. (1975) in *Peptides: Chemistry, Structure, Biology* (Walter, R., y Meienhofer, J., eds) pp. 17-30, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor.
31. Joubert, F. J. *J. Biochem.* 52, 539 (1975).
32. Halpert, J., y Eaker, D., *J. Biol. Chem.* 250, 6990 (1975).
33. Botes, D. P., y Viljoen, C. C., *J. Biol. Chem.*, 249, 3827 (1974).
34. Samelima. Y., Iwanaga, S., y Suzuki, T., *FEBS Lett.*, 47, 348 (1974).
35. Heinrikson, R. L., Krueger, E. T., y Keim, P. S. *J. Biol. Chem.*, 252, 4913 (1977).
36. De Haas, G. H. y Van Deenen, L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 469 (1963).

37. Deems, R. A., Eaton, B. R., y Dennis, E. A., J. Biol. Chem., 250, 9013 (1975).
38. Woelk, H., y Debuch, H., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 352, 1275 (1971).
39. Braganca, B. A. y Sambray, Y. M. Nature, 216, 1210 (1967).
40. Salach, J., Turini, P., Seng, R., Hanber, J., y Singer, T. P., J. Biol. Chem., 246, 331 (1971).
41. Vidal, J.C., Cattaneo, P., y Stoppani, A. O. M., Arch. Biochem. Biophys., 151, 168 (1971).
42. Delori, P. J., Biochimie, 55, 1031 (1973).
43. Habermann, E., y Hardt, K. L. Anal. Biochim., 50, 163 (1972).
44. Tolksdorf, S., Mc Cready, M. H., Mc Cullagh, D. R., y Schwenk, E., J. Lab. Chn. Med., 34, 74 (1949).
45. Jovin, T., Chrambach, A., y Naughton, M. A., Anal. Biochem, 9, 35 (1964).
46. Reisner, Nemes y Bucholtz Anal. Biochem., 64, 509 (1975).
47. Swank, R. T. y Munkres, K. D., Anal. Bicohem. 39, 462 (1971).

SEGUNDA MENCION



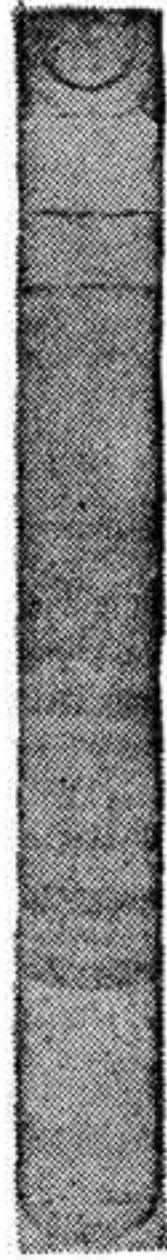


Fig. 1. Electroforesis del veneno soluble. 200 ug de veneno se corireron en un gel cilíndrico de poliacrilamida (5 cm; 2 mA) en tampón de Tris-glicina (pH 8.3) (45) y fue teñido con Azul Brillante de Coomassie G-250. Las proteínas migraron hacia abajo en dirección al cátodo. Se observan 8 bandas principales y 7 menores. Por lo menor una proteína migró hacia el cátodo.

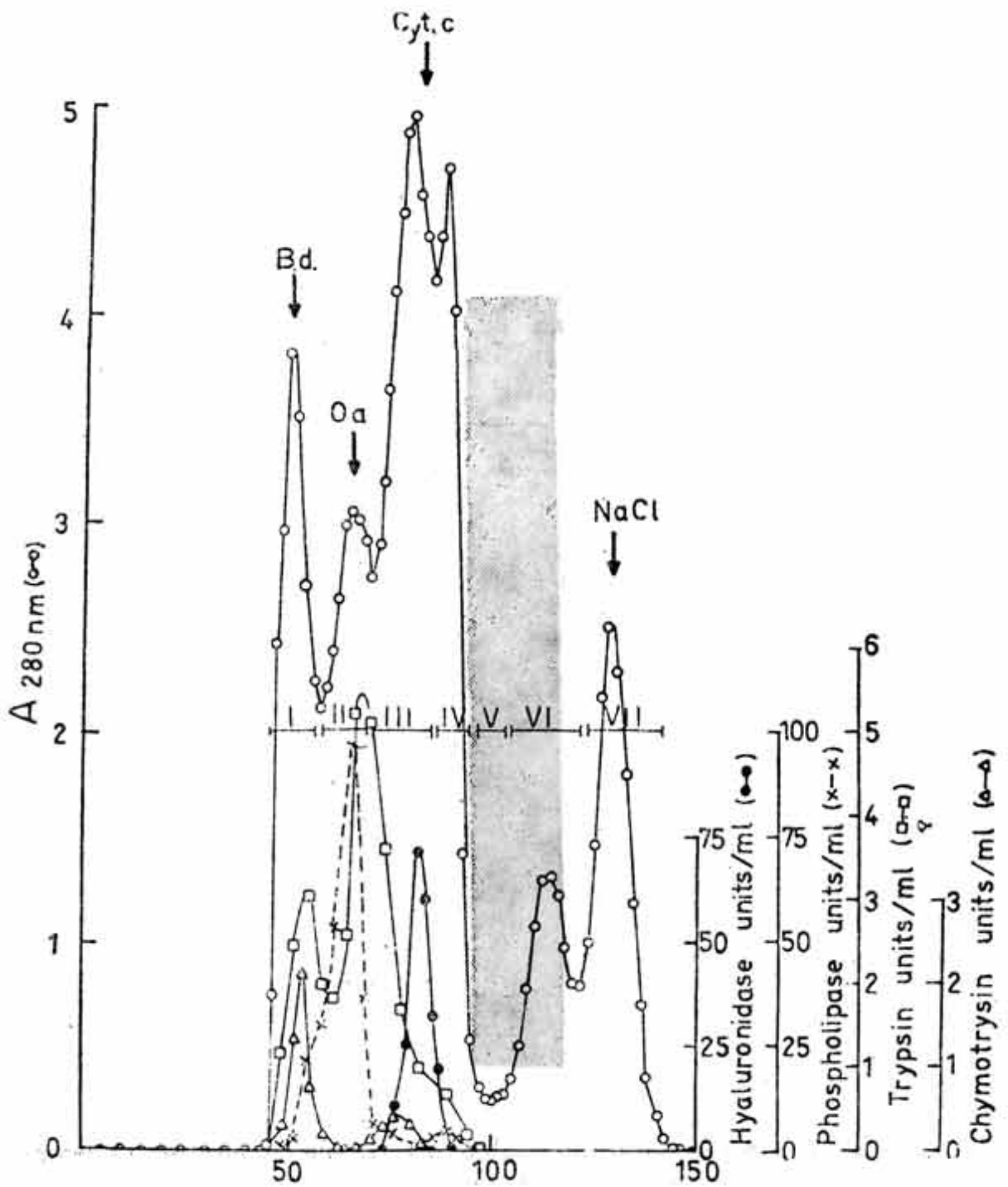


Fig. 2. Separación de los componentes del veneno de *Bothrops asper*. 200 mg de veneno fueron disueltos en 1.5 ml de tampón de acetato de amonio 20 mM (pH 4.7) y después de ser clarificado por centrifugación a $27,000 \times g$ durante 10 minutos, la solución fue aplicada a una columna (0.9×200 cm) de Sefadex G-75. La columna fue eluida con el mismo tampón de acetato con una velocidad de flujo de 18 ml/hr, y se colectaron fracciones de 30 gotas que fueron mezcladas como las Fracciones I a VII con base a la absorbencia a 280 nm y a las actividades enzimáticas. Se corrieron, por separado, marcadores de peso molecular: Azul de dextrano, ovoalbúmina (45,000), citocromo C de corazón equino (12,400) y NaCl. Las actividades enzimáticas se midieron como se describe en Material y Métodos.

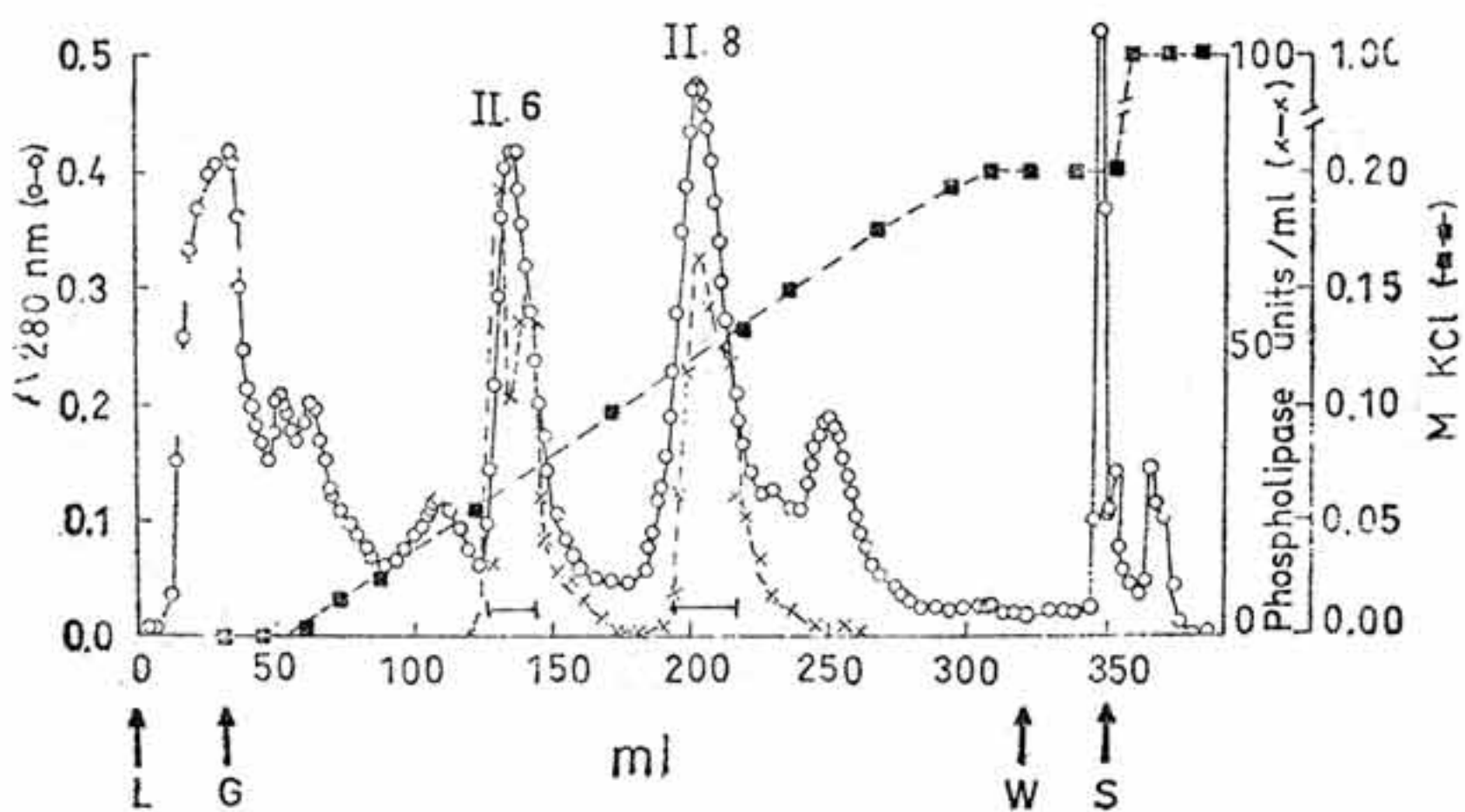


Fig. 3. Purificación por intercambio iónico de las Fosfolipasas. La fracción II de la Fig. 1 previo ajuste de pH a 7.55 con KOH 1.0 M fue aplicada (36 ml) a una columna (0.9 × 30 cm) de DEAE-celulosa y eluida con un gradiente salino lineal que contenía 150 ml de tampón de fosfato de potasio 15 mM (pH 7.55) y 150 ml de cloruro de potasio 0.2 M en el mismo tampón de fosfatos. La velocidad de flujo fue de 40 ml/hr y se colectaron fracciones de 2 ml que fueron mezcladas como se muestra por las barras horizontales para obtener las Fracciones 11.6 y 11.8 en base a la absorbancia y a actividad de fosfolipasa. La concentración de KCl fue medida conductimétricamente.

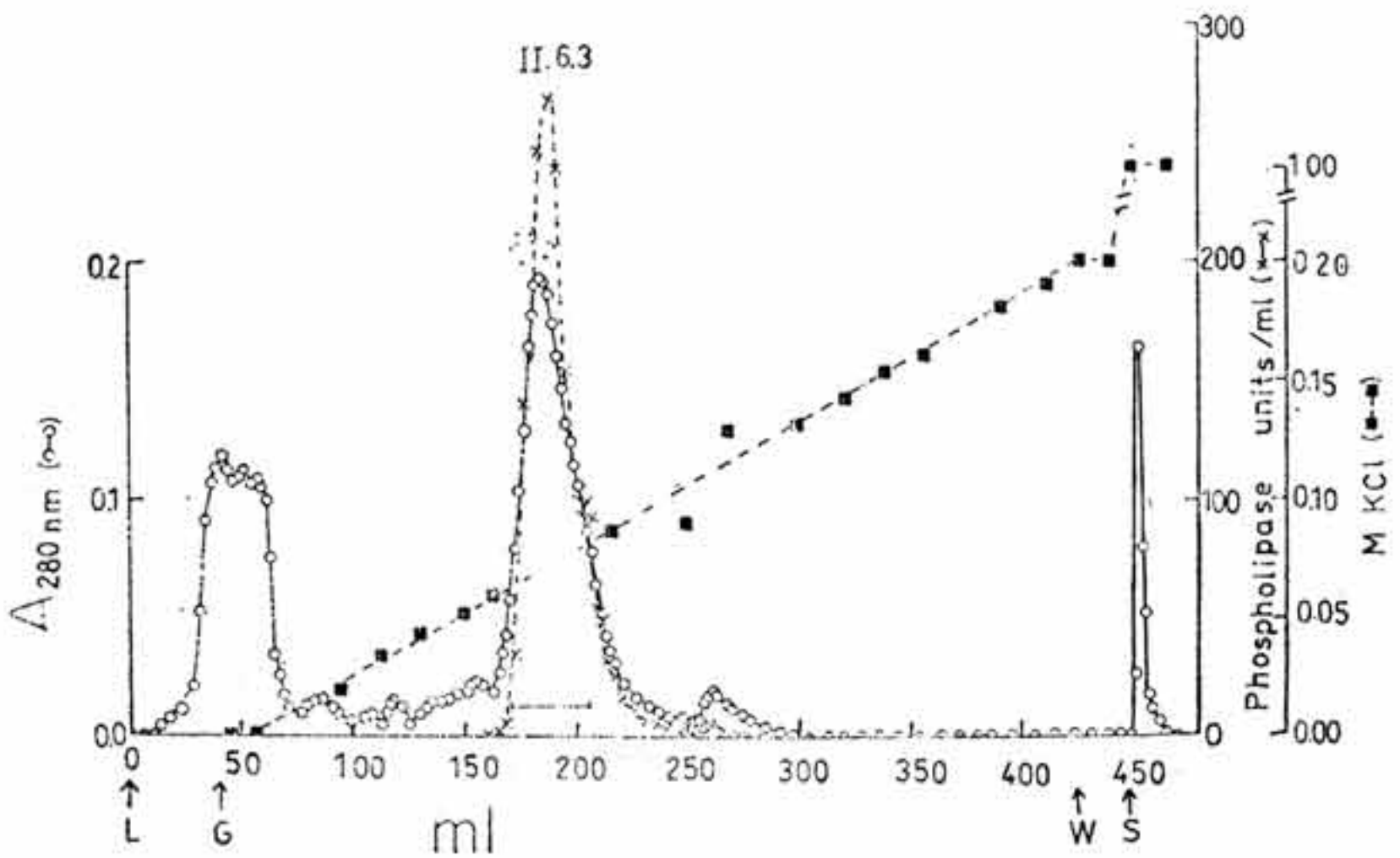


Fig. 4. Purificación ulterior de la Fracción 11.6 de la Fig. 2 en una segunda columna de DEAE-celulosa. La Fracción 11.6 (11.15 mg de proteína) fue dializada en contra del tampón inicial y aplicada a una columna (0.65×42 cm) de DEAE-celulosa. La columna se eluyó con un gradiente salino lineal que estuvo formado por 200 ml de tampón de fosfato de potasio 15 mM (pH 8.6) y 200 ml de 0.2 M de cloruro de potasio en el mismo tampón de fosfatos. La velocidad de flujo fue de 30 ml/hr y se colectaron fracciones de 2 ml que fueron mezcladas para dar la Fracción 11.6.3 en base a la absorbancia a 289 nm y a la actividad fosfolipásica. Esta Fracción 11.6.3, por electroforesis preparativa (como se describe en Resultados), fue fraccionada aún más en las Fosfolipasas 1.a y 1.b.

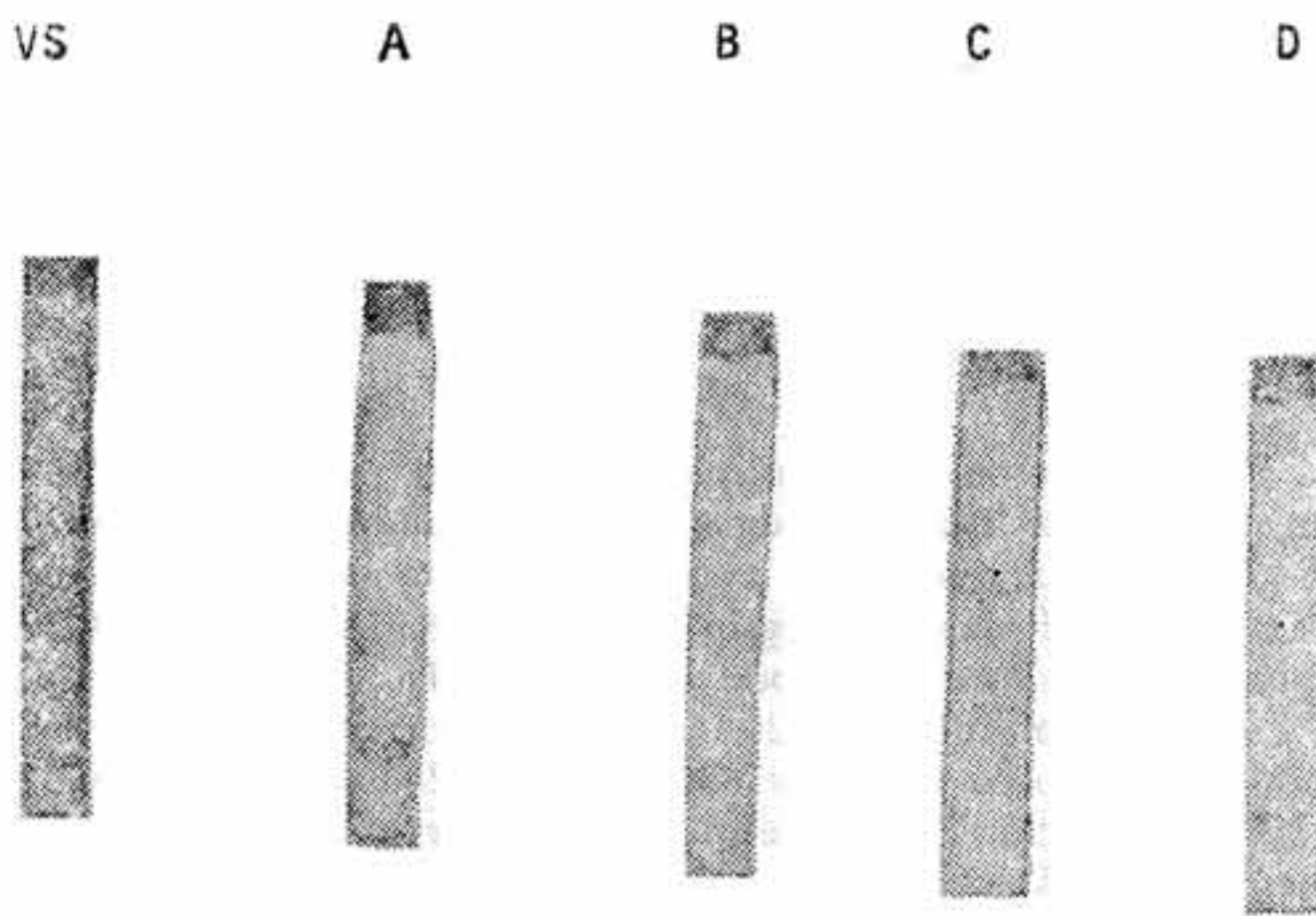


Fig. 5. Geles de poliacrilamida de diferentes pasos de purificación de las Fosfolipasas del veneno de *B. asper*. VS es el veneno soluble. A es la Fracción 11.6.3 proveniente de DEAE-celulosa con dos bandas que corresponden a las Fosfolipasas 1.a y a.b. B es la Fosfolipasa 1.a y C la Fosfolipasa 1.b después de electroforesis preparativa y en donde muestra su homogeneidad. D es la Fosfolipasa 2 en estado homogéneo. Las condiciones de la electroforesis son las mismas que para la Fig. 1.

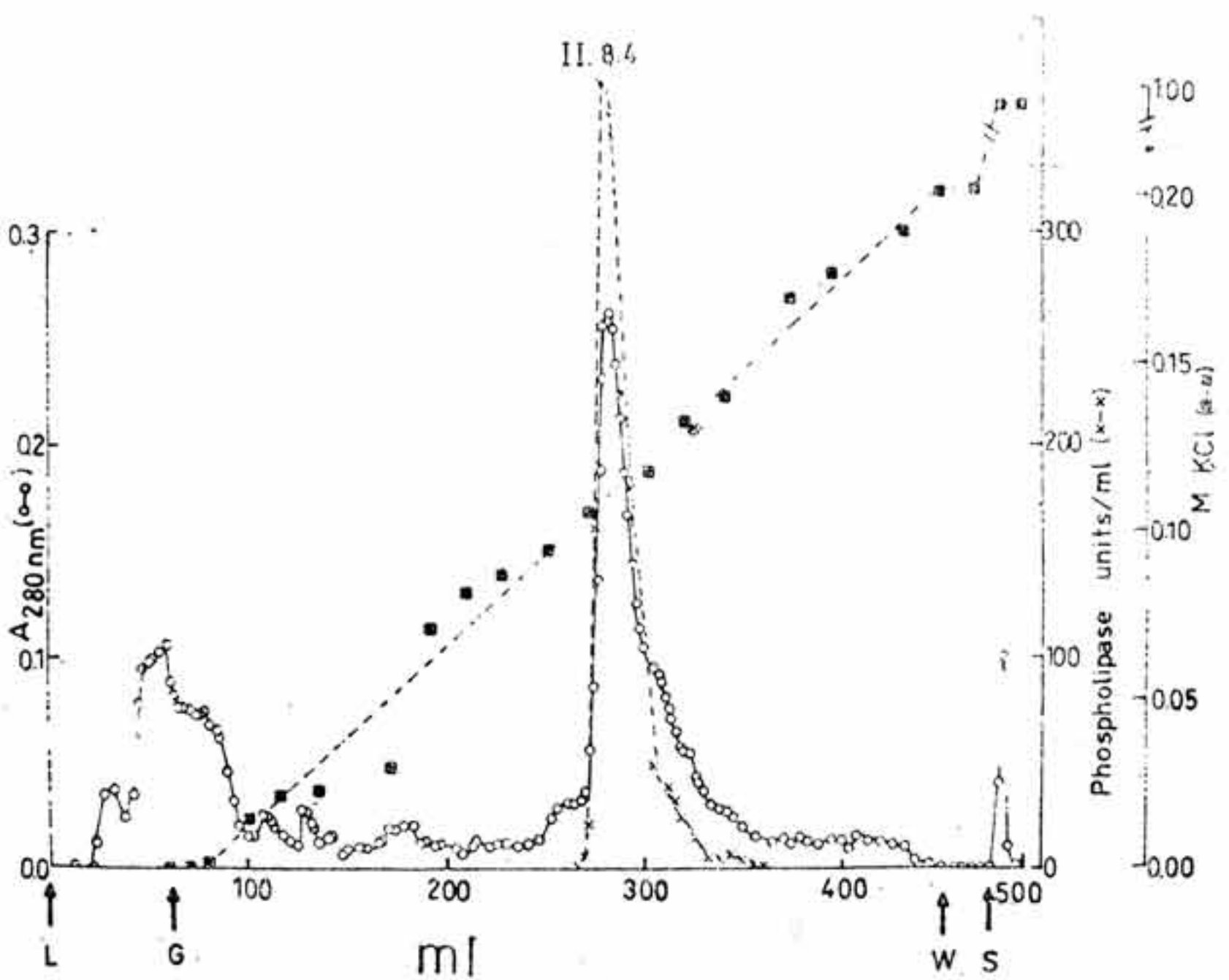


Fig. 6. Purificación de la Fosfolipasa 2. (A). La muestra 11.8 de la Fig. 2 (16.81 mg de proteína) fue dializada y aplicada a una columna (0.65 × 42 cm) de DEAE-celulosa, que fue eluida con un gradiente salino lineal formado por 200 ml de tampón de fosfato de potasio 15 mM (ph 8.6) y 200 ml de 0.2 M de cloruro de potasio en el mismo tampón de fosfatos. La velocidad de flujo fue de 30 ml/hr y se colectaron tubos con 2 ml. La región correspondiente al Corte 11.8.4 fue mezclada tomando en cuenta la absorbancia a 280 nm y la actividad de fosfolipasa. (B), La Fracción 11.8.4 fue dializada y recromatografiada en las mismas condiciones que en (A) con lo que se obtuvo la Fosfolipasa 2 (Fracción 11.8.4.2) en estado homogéneo. Puede notarse que en este paso de purificación la actividad específica de la enzima permanece constante.

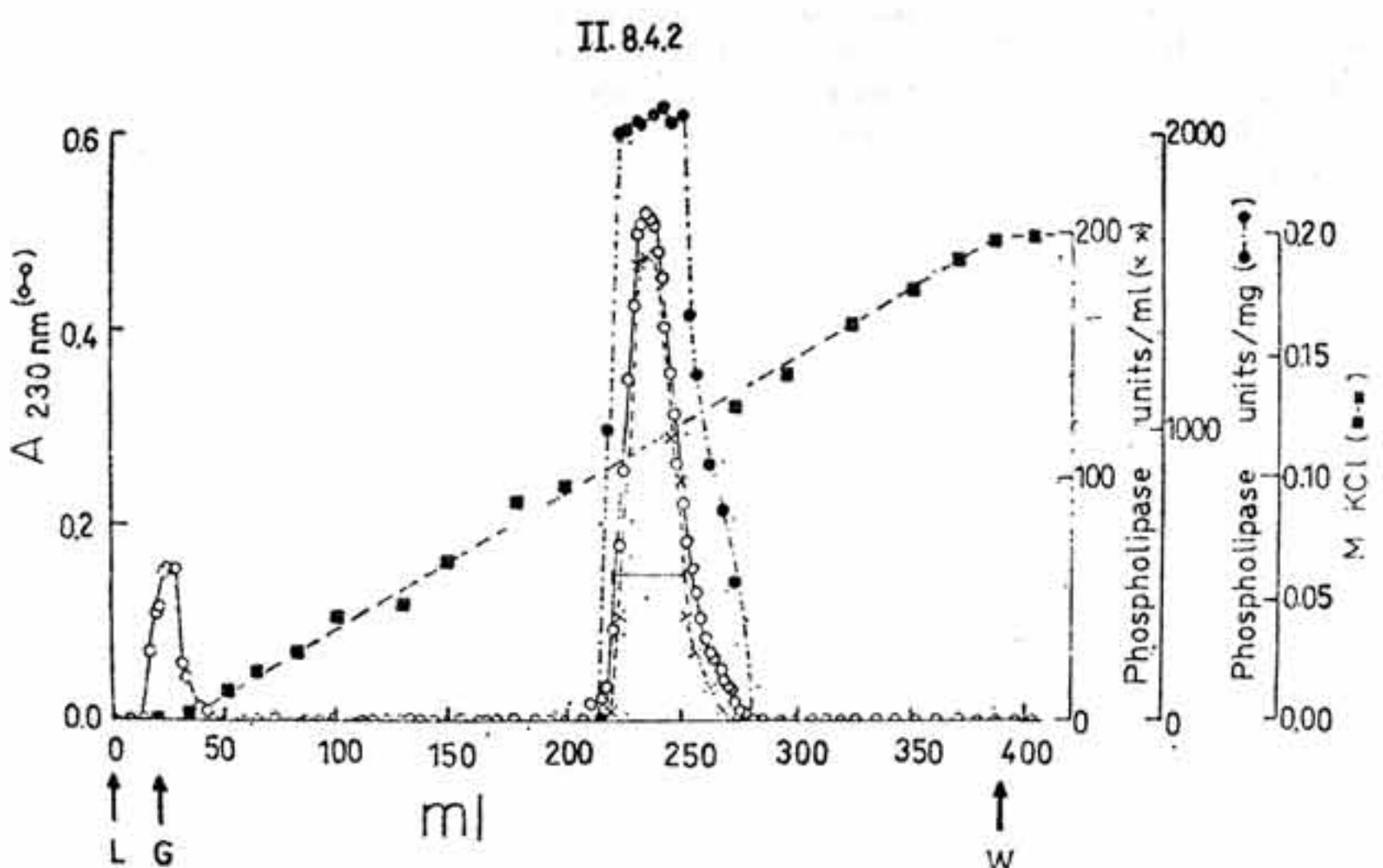


Fig. 7

Origen	Identificación	Ref.	SECUENCIA AMINO TERMINAL																										
			1	5	10	15	20	25																					
PaE	—	26	A	V	W	Q	F	R	S	M	I	Q	C	T	I	P	N	S	K	P	Y	L	E	F	N	D			
Nme	DE-I	29	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	H	C	T	V	P	N	-	R	S	W	H	F	F	A	N			
Nni	básica	30	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	H	C	T	V	P	-	S	R	P	W	H	F	F	A	N			
Hha	DE-I	16	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	K	C	T	V	P	-	S	R	S	W	H	F	F	A	N			
Cad	—	35	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	K	-	V	A	K	-	R	S	G	L	L	W	-	Y	S	A	Y
Bas	1.a y 2		B	L	W	Z	F	G	Z	M	-	M	S	B	V	M	-	-	R	K	B	V	V	F	K	Y	L		

Fig. 7. Secuencia amino terminal de siete fosfolipasas, seis de ellas de venenos de serpientes. Se utiliza la simbología de una letra para cada aminoácido. Los residuos se colocaron para lograr el máximo de homología por lo que se han dejado intervalos (-) Clu - Gln y Asp - Asn se consideraron equivalentes entre sí, respectivamente. Se han enmarcado los aminoácidos que se repiten con mayor frecuencia en cada posición. PaE, páncreas equino; Nme, *Naja melanoleuca*; Nni, *Naja nigrocillis*; Hha, *Haemachatus haemachatus*; Cad, *Crotalus adumanteus*; Bas, *Bothrops asper*.

Tabla I. Distribución de las actividades enzimáticas en las fracciones provenientes de Sefadex G-75^a

	I	II	III	IV
Fosfolipasa	7.36	87.94	3.22	1.48
Hialuronidasa	0.00	0.00	95.76	4.24
Tripsina	22.56	40.06	33.78	3.60
Quimotripsina	66.92	8.85	24.23	0.00

^a Los valores representan el porcentaje con relación al total de la actividad enzimática respectiva en cada una de las fracciones

TERCERA MENCION



TABLA II

TABLA DE LA PURIFICACION DE LAS FOSFOLIPASAS 1.a y 1.b
DEL VENENO DE *Bothrops asper*

Fracción	Procedencia de la fracción	Proteína (mg ^a)	Actividad Total (unidades ^b)	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	Sefadex G-75	17.48	5,541	317	87.94	5.03
II.6	DEAE-celulosa (7.55)	2.40	1,730	721	27.46	11.44
II.6.3	DEAE-celulosa (8.60)	1.12	1,176	1,050	18.67	16.67
II.6.3 (1.a)	Electroforesis en gel	0.46	529	1,149	8.40	18.24
II.6.3 (1.b)	Electroforesis en gel	0.15	112	748	1.78	11.87

^a Tomando una unidad de A₂₈₀ como 1 mg de proteína

^b Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que libera 1 umole de ácido graso en un minuto, usando yema de huevo emulsionada como sustrato en las condiciones descritas en Material y Métodos.

TABLA III
RESUMEN DE LA PURIFICACION DE LAS FOSFOLIPASA 2
DEL VENENO DE *Bothrops asper*

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

^a Tomando una unidad de A₂₈₀ como 1 mg de proteína

^b Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzimas que libera 1 umole de ácido graso en un minuto, usando yema de huevo emulsionada como sustrato en las condiciones descritas en Material y Métodos.

TABLA IV

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA FOSFOLIPASAS PURIFICADAS

Aminoácido	Fosfolipasa 1.a ^a	Fosfolipasa 1.b ^a	Fosfolipasa b ^b
Lis	7	14	7
His	1	6	1
Arg	3	8	3
Trp	-c	-c	-c
Asp	13	32	13
Tre	5	13	5
Ser	4	22-23	5
Glu	9	32	9
Pro	3	18	4
Gli	9	25-26	10
Ala	4	15	4
Cis	-c	-c	8-10 ^d
Val	5	15	6
Met	3	3	3
Ile	3	13	3
Len	2	15	2
Tir	7	7	7
Fen	4	7	4

^a Resultado de un solo hidrolizado a 20 horas con HCl 6 N

^b Resultado de hidrólisis seriada a 20, 48, 72 y 110 horas con HCl 6 N

^c No determinado

^d Cuantificado como ácido cistético por oxidación previa de la muestra con ácido perfórmico.