

# Actividades farmacológicas de la fosfolipasa A<sub>2</sub> Ba SpII RP4 del veneno de *Bothrops alternatus*

García Denegri, M.E.<sup>1</sup>; Bustillo, S.<sup>2</sup>; Romero-Vargas, F.<sup>3</sup>; Leiva, L.C.<sup>2</sup>; Acosta, O.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. E-mail: patmed@vet.unne.edu.ar. <sup>2</sup>Cátedra de Química Biológica I, FACENA, UNNE. <sup>3</sup>Laboratorio de Química de Proteínas, Instituto de Biología, UNICAMP, Brasil.

## Resumen

**García Denegri, M.E.; Bustillo, S.; Romero-Vargas, F.; Leiva, L.C.; Acosta, O.C.: Actividades farmacológicas de la fosfolipasa A<sub>2</sub> Ba SpII RP4 del veneno de *Bothrops alternatus*.** *Rev. vet.* 23: 1, 25-31, 2012. El objetivo del trabajo fue evaluar actividades farmacológicas (citotóxica, bactericida, agregante plaquetaria) y factores que afectan la actividad/estabilidad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aislada del veneno de *Bothrops alternatus*. Se utilizaron mioblastos/miotúbulos murinos (C2C12) y cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) y *Escherichia coli* (cepa ATCC 25922) para valorar respectivamente su acción miotóxica (*in vitro*) y bactericida, como así también líneas celulares epiteliales mamarias normales (NMuMG) y tumorales (LM3) para detectar su posible aplicación en terapia oncológica. Con el fin de evaluar la acción inhibitoria de la PLA<sub>2</sub> aislada sobre la agregación plaquetaria se empleó plasma rico en plaquetas y trombina como inductor fisiológico. Por último, se registraron los cambios en la actividad y estabilidad de la PLA<sub>2</sub> a diferentes temperaturas (4-90°C) mediante ensayo cinético, en tanto que, por hemólisis radial indirecta se hizo lo mismo para evaluar efecto del pH (2,5-10). La PLA<sub>2</sub> mostró una acción inhibitoria sobre la agregación plaquetaria dosis-dependiente. Presentó una alta estabilidad estructural al ser sometida a condiciones extremas de pH y temperatura durante varias horas, conservando la actividad catalítica prácticamente invariable. En cambio, cuando PLA<sub>2</sub> fue evaluada sobre las diferentes líneas celulares, no produjo citotoxicidad (aún a dosis elevadas) ni efecto bactericida sobre las cepas utilizadas. Estos hallazgos amplían la caracterización de la enzima, una de las más abundantes del paquete proteico del veneno total de *B. alternatus* del nordeste argentino. A la vez, la inocuidad y estabilidad detectadas, permiten proponer a esta enzima como un inmunógeno alternativo en la producción de sueros antiofídicos.

**Palabras clave:** *Bothrops alternatus*, fosfolipasa A<sub>2</sub>, actividad bactericida, citotoxicidad, agregación plaquetaria, inmunogenicidad.

## Abstract

**García Denegri, M.E.; Bustillo, S.; Romero-Vargas, F.; Leiva, L.C.; Acosta, O.C.: Pharmacological activities of Ba SpII RP4 PLA<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* snake venom.** *Rev. vet.* 23: 1, 25-31, 2012. The aim of this work was to evaluate the pharmacological activities (cytotoxicity, bactericidal, platelet aggregation) and the changes in the activity/stability of the isolated phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) from *Bothrops alternatus* venom. In order to elucidate myotoxic and bactericidal activities, murine myoblast /miotubules (C2C12) and strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) were used, respectively. Also, normal mammary epithelial cell culture (NMuMG) and tumoral type (LM3) were tested for a possible role in oncological therapy. With the purpose of studying the inhibitory effect of the PLA<sub>2</sub> on platelet aggregation, washed human platelet and thrombin as physiological inductor, were used. Finally, changes in the activity and stability of the isolated PLA<sub>2</sub> at different temperatures (4-90°C) by kinetic assays were recorded; while the enzyme was subjected to radial indirect hemolysis to evaluate the effect of different pH (2.5-10). The PLA<sub>2</sub> presented dose-dependent inhibitory effect on thrombin-induced platelet aggregation. Also, it showed high structural stability when exposed to extreme conditions of temperature and pH during several hours, and catalytic activity remained almost unchanged. Nevertheless, this enzyme tested on different cells cultures did not induce cytotoxic (even at high doses) or bactericidal activities. These findings have a scientific value for toxicology since

they expand the knowledge of the characterization (biological, biochemical and structural aspects) of one of the most abundant enzyme (PLA<sub>2</sub> Ba SpII RP4) from the protein package of *B. alternatus* snake venom from the northeast of Argentina. Likewise, the confirmed safety and stability of this PLA<sub>2</sub> strongly suggest that it could be proposed as an alternative immunogen for the antiserum production against *Bothrops* snake venom.

**Key words:** *Bothrops alternatus*, phospholipase A<sub>2</sub>, bactericidal activity, cytotoxicity, platelet aggregation, immunogenicity.

## INTRODUCCIÓN

En Argentina se registran alrededor de 850 casos de accidentes ofídicos anuales, siendo en su gran mayoría producidos por serpientes del género *Bothrops* (*Viperidae*)<sup>9</sup>. Los accidentes se producen en el campo o en el peridomicilio, donde se acercan en busca de roedores o batracios que les sirven de alimento. La ocurrencia de intoxicación por estos ofidios es mayor en los meses más calurosos, debido a varias circunstancias entre las cuales se puede destacar el mayor número de horas/luz, lo que redundaría en una mayor oportunidad de interacción ofidio/hombre.

Las serpientes pertenecientes al género *Bothrops* son denominadas comúnmente “yará”, y comprenden especies como *Bothrops alternatus* (yará grande) y *Bothrops diporus* (yará chica)<sup>9</sup>, distribuidas en gran parte del país. Estudios epidemiológicos demostraron que *Bothrops alternatus* es la especie que produce el mayor porcentaje de accidentes ofídicos (63,08%) en la Provincia de Corrientes, con un claro predominio en los meses de enero y marzo, coincidentes con la estación de verano<sup>21</sup>.

La mordedura por esta serpiente puede inducir una serie de efectos locales complejos incluyendo hemorragia, mionecrosis y edema, en adición a efectos sistémicos<sup>1-3</sup>. Los venenos de estos vipéridos poseen un arsenal de proteínas capaces de degradar la matriz extracelular e interferir con la cascada de coagulación, el sistema hemostático y la reparación de tejidos<sup>10,14</sup>. Se deben a una variedad de componentes del veneno, como fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), enzimas similares a trombina (trombine-like)<sup>23</sup> y metaloproteasas<sup>12</sup> entre otros.

Las toxinas presentes en el veneno botrópico han sido ampliamente estudiadas mediante ensayos químicos y biológicos, tanto *in vitro* como en animales de experimentación. Así, se encontró que una metaloproteasa (baltergina) de *B. alternatus*<sup>12</sup> es capaz de desencadenar la apoptosis de células normales<sup>7</sup> o cancerígenas como en el caso de una toxina aislada de *Vipera lebetina turanica*<sup>24</sup> ó bien de exhibir actividad citotóxica sobre una amplia gama de bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*), como una PLA<sub>2</sub> de *B. neuwiedi pauloensis*<sup>20</sup> por lo que se evidencia que ciertos componentes del veneno botrópico son capaces de afectar no solo células eucariotas sino también procariontas.

En particular, las PLA<sub>2</sub> de *Bothrops alternatus*, que constituyen el 7,8% del veneno total<sup>16</sup>, son de relevan-

cia ya que además de cumplir su rol, probablemente en la digestión de la presa, exhiben numerosas actividades fisiopatológicas como neurotoxicidad, miotoxicidad, cardiotoxicidad, efectos anticoagulantes, pro-agregante plaquetario, inhibidor de la agregación plaquetaria y actividad hemolítica (indirecta), entre otras<sup>14,18</sup>. Si bien en los últimos tiempos se ha incrementado la purificación y caracterización de fosfolipasas A<sub>2</sub> de los venenos de serpientes<sup>4,19</sup> muy poco se conoce acerca de fosfolipasas A<sub>2</sub> del veneno de *Bothrops alternatus*. Así, generó especial interés un estudio exhaustivo, con la tecnología y conocimientos actuales, de las actividades biológicas y fisiopatológicas de la PLA<sub>2</sub> más abundante aislada del veneno de *Bothrops alternatus*. La enzima fue previamente purificada y caracterizada en sus aspectos estructurales, biológicos y, parcialmente bioquímicos<sup>11</sup>.

El objetivo del trabajo fue investigar, a través de ensayos *in vitro*, el comportamiento de PLA<sub>2</sub> previamente purificada, frente a determinadas actividades farmacológicas (citotóxica, bactericida y agregante plaquetaria), así como evaluar eventuales cambios sobre su actividad y estabilidad ante condiciones extremas de temperatura y pH.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Veneno y toxina.** Se trabajó con mezclas de venenos desecados de especímenes adultos de *Bothrops alternatus* del nordeste argentino mantenidos en cautiverio en el Serpentario de la ciudad de Corrientes, Argentina. Las mismas fueron homogeneizadas y conservadas a -20°C. La fosfolipasa A<sub>2</sub> (Ba SpII RP4) fue aislada según técnica previamente descripta<sup>11</sup>.

**Ensayos de citotoxicidad sobre cultivo de líneas celulares. Ensayos realizados sobre línea C2C12.** Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron mioblastos indiferenciados obtenidos de monocapas subconfluentes. Las células resuspendidas se sembraron en placas de 96 pocillos, 1,5-2,5 x 10<sup>4</sup> células por pocillo, en el mismo medio de crecimiento (DMEM-SFB 5%). En los ensayos realizados con mioblastos, al alcanzar la monocapa un 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y diferentes concentraciones de la enzima Ba SpII RP4 (20-200 µg) aislada de *B. alternatus*, diluida en el medio de cultivo suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) fueron adicionados a las células en cultivo (200 µl/pocillo). En tanto, para

los ensayos con miotúbulos se procedió a la diferenciación de los mismos previo a la adición de la enzima. Luego de tres horas de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda, la viabilidad celular fue cuantificada por tinción con cristal violeta. Las células no adheridas fueron removidas por lavado con PBS y las células que permanecieron adheridas fueron fijadas con 100 µl de metanol:ácido acético glacial (3:1) y posteriormente teñidas con 100 µl de cristal violeta 0,5% en metanol 20% (v/v). El colorante fue removido de las células por adición de 100 µl de una solución reveladora de etanol:ácido acético glacial (3:1). La densidad óptica de la solución coloreada se determinó a 620 nm en lector de microplacas (Thermo Multiskan Ex). La citotoxicidad se evaluó por comparación de las absorbancias resultantes de los pocillos con la enzima, con la absorbancia promedio de los pocillos utilizados como control (sin enzima, considerados como 100% de viabilidad) y fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular. Estos valores se graficaron versus las concentraciones de enzima ensayadas. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Para analizar cualitativamente la presencia de alteraciones morfológicas de las células por el tratamiento con la enzima, se utilizó un microscopio de contraste de fases Axiovert 40®, Carl Zeiss Argentina, y se tomaron fotografías con cámara digital Canon 4 mega píxeles CCD 2272x1704 píxeles efectivos.

#### **Ensayos realizados sobre líneas LM3 y NMuMG.**

Para los ensayos de citotoxicidad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> aislada (concentración de 1-80 µg/ml), se utilizaron las células epiteliales normales mamarias murinas (NMuMG) ó las células epiteliales tumorales mamarias murinas (LM3) obtenidas de monocapas subconfluentes y se realizaron los ensayos como se describe en las pruebas con la línea celular C2C12.

**Evaluación de la actividad bactericida. Método de McGeachie.** Se utilizaron placas de Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo agar tripticosa de soya (TSA). Se adicionaron 50 µl de cada suspensión bacteriana de *S. aureus* (cepa ATCC 25923) y *E. coli* (cepa ATCC 25922), correspondiente al tubo N°2 de la escala McFarland (6 x 10<sup>8</sup> UFC/ml), uniformemente en el medio de cultivo. Luego, se realizaron orificios de 2 mm en el gel utilizando un sacabocados previamente esterilizado. En cada placa los orificios se distribuyeron equidistantemente. Posteriormente, se agregó a cada orificio 10 µl de la dilución correspondiente de Ba SpII RP4 a ensayar (6; 3; 1,5 y 0,75 µg/ml). Uno de los orificios se utilizó como control negativo, en el que se sembró solamente solución fisiológica estéril y en otro pocillo se sembró solo veneno (10 mg/ml) como control positivo de inhibición de crecimiento bacteriano. Después de la distribución de las diluciones de la PLA<sub>2</sub>, las placas se incubaron en estufa a 37°C durante 24 h. La lectura se realizó por la medición del diámetro del halo de la zona de inhibición, considerando inclusive el diámetro del

orificio<sup>6</sup>. Las pruebas se realizaron por cuadruplicado para cada cepa y enzima ensayada. La presencia de un halo de inhibición definido alrededor del pocillo indicó actividad antibacteriana positiva.

**Test de microdilución en caldo.** Esta prueba fue realizada en placas de ELISA con fondo plano de 96 pocillos<sup>17</sup>. Brevemente, las suspensiones bacterianas utilizadas en el método anterior se ajustaron al tubo N° 1 de la escala McFarland (3 x 10<sup>8</sup> ufc/ml) y se preincubaron con igual volumen de la enzima a ensayar (6; 3; 1,5 y 0,75 mg/ml). Luego de 7 h de incubación a 37°C, a la densidad óptica a 620 nm fue leída en un lector de microplacas (Termo Multiskan Ex). Se realizaron controles utilizando caldo TSA en lugar de enzima. La actividad antibacteriana fue medida como una disminución en la absorbancia.

**Actividad sobre la agregación plaquetaria.** Se evaluó el efecto de la enzima PLA<sub>2</sub> sobre la agregación de plasma rico en plaquetas (PRP) humano. Se preparó una suspensión de plaquetas 300.000/µL y se llevó a cabo la agregación plaquetaria en un agregómetro PA-04 (Qualitem Electrónica) de acuerdo al procedimiento usual<sup>5</sup>. Como agonista plaquetario (control de 100% de agregación) se utilizó trombina bovina (Sigma-Aldrich, USA) en una dosis de 1,04 µg/10 µl. Previamente, unos 500 µl de PRP fueron pre-incubados por 2 minutos antes de llevar a cabo este test. Después de la preincubación del PRP, éste fue incubado con 5 y 10 µl de la enzima PLA<sub>2</sub> (1 mg/ml) aislada durante 5 min. Se midió el tiempo de agregación luego de adicionar el agonista (trombina).

**Factores que afectan la estabilidad de la enzima. Efecto de la temperatura.** Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la PLA<sub>2</sub> aislada mediante test cinético. Para ello, las soluciones de enzima (1 mg/ml) fueron preincubadas a diferentes temperaturas (4, 25, 37, 50, 60, 80 y 90°C) por 30 minutos. Finalizado el tiempo de exposición, se sometió la enzima a las condiciones estándares del ensayo cinético<sup>15</sup>. El sustrato consistió de una solución de fosfatidilcolina de soja (0,265%), CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, rojo fenol 100 mM y Triton X-100 7 mM (pH 7,6). En este ensayo enzimático el sustrato se encuentra bajo la forma fisicoquímica de micela mixta PC-Tritón X-100 en una relación molar 1:2. La actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (basada en el cambio de pH por la liberación de ácidos grasos) se expresó como la pendiente máxima de disminución de absorbancia/minuto utilizando un espectrofotómetro UV/visible CamSpec M 330 (a 30°C, λ 558 nm). Una unidad (U) corresponde al cambio de 1 unidad de absorbancia. La actividad específica se expresó en U/min/mg (enzima). Las lecturas se realizaron en intervalos de 60 segundos durante 5 minutos. Una variante que resultó apropiada en este ensayo fue la medición directa del pH con un peachímetro (Lab pHmeter Adwa AD-1000). En este caso la actividad

se calculó como la pendiente máxima de disminución de pH/minuto. La temperatura óptima fue aquella que provocó el mayor cambio de pH por minuto.

**Efecto del pH.** Se evaluó el efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima aislada mediante el ensayo de hemólisis radial indirecta a través de una técnica ya descrita<sup>13</sup>. Para ello se incubaron soluciones de la enzima (1 mg/ml) en diferentes buffers en un rango de 2,5-10 por 19 h a 25°C, para luego someterla al ensayo bajo las condiciones habituales del mismo. En placas plásticas (135 x 80 mm) se depositaron 25 ml de agar al 1% en PBS (previamente fundido y enfriado a 50°C), 0,3 ml de suspensión de yema de huevo 1:3 en PBS, 0,3 ml de paquete de glóbulos rojos lavados, 0,25 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M y 5 µg de azida sódica. Se dejó solidificar y se confeccionaron orificios de 3 mm de diámetro con sacabocados, aplicándose posteriormente 15 µl de solución de la PLA<sub>2</sub> purificada a diferentes concentraciones (desde 0,0312 a 2,00 mg/ml). Uno de los orificios se utilizó como control negativo sembrándose 15 µl de PBS, mientras que otro se utilizó como control positivo sembrándose 15 µl de solución de veneno de *Bothrops alternatus* (1 mg/ml). Las placas se incubaron en cámara húmeda durante 20 h a 37°C, midiéndose luego los diámetros de los halos de hemólisis.

**Factores que afectan la actividad de la enzima (Ba SpII RP4). Efecto de la temperatura.** Este efecto se evaluó mediante test cinético. Para ello las cinéticas se llevaron a cabo, tal como se describió previamente (ver *Factores que afectan la estabilidad*) incubando las mezclas de reacción a distintas temperaturas (5, 15, 22, 30, 50 y 60°C), midiéndose la actividad a través de la disminución del pH de la mezcla de reacción. Así, la temperatura óptima fue aquella que provocó el mayor cambio de pH por minuto.

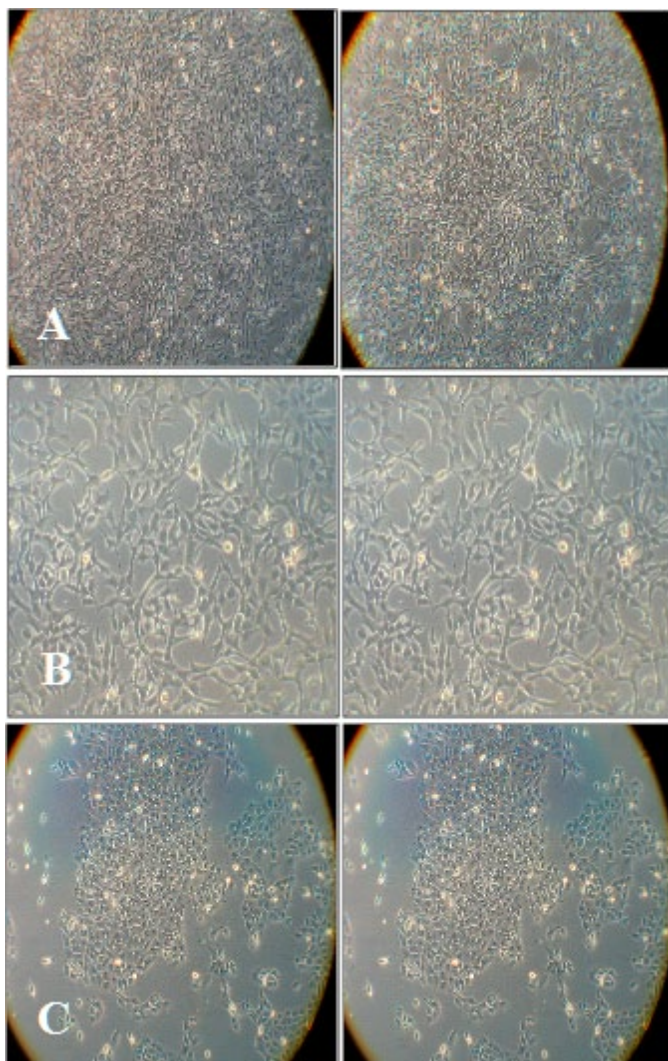
**Efecto del pH.** El efecto del pH sobre la actividad de la enzima aislada se evaluó mediante el ensayo de hemólisis radial indirecta, dado que el principio en el cual se basa el método cinético (disminución de pH inducido por la liberación de ácidos grasos ó de la absorbancia, en el caso de incluir un colorante) es incompatible con el efecto que aquí fue de interés evaluar. Para ello, se prepararon soluciones de la enzima en diferentes buffers fosfatos (que abarcaron rangos de pH de 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). Luego se sembraron en pocillos de agar-sangre tal como se describió anteriormente. El pH óptimo fue aquel que generó el halo hemolítico de mayor diámetro.

**Análisis estadístico.** Todos los experimentos fueron repetidos al menos cuatro veces. La

significancia de las diferencias entre las medias fue evaluada mediante ANOVA siguiendo el test de Dunnet para comparaciones múltiples entre grupos. Los valores de *p* menores a 0,05 fueron considerados significativos estadísticamente. El efecto del pH sobre la actividad enzimática fue estimado mediante regresión lineal ajustada al método de los mínimos cuadrados.

## RESULTADOS

La fosfolipasa A<sub>2</sub> aislada del veneno de *B. alternatus* (Ba SpII RP4) no presentó actividad citotóxica sobre los mioblastos/miotúbulos murinos, como tampoco lo hizo sobre la estirpe de células epiteliales mamarias murinas normales y tumorales a las dosis y tiempos de exposición ensayados. (Figura 1A). Al microscopio se observó que las células C2C12 no tratadas (control) y tratadas se encontraron distribuidas homogéneamente en el cultivo, exhibiendo una forma fina y alargada. Las células NMuMG y LM3 tratadas con la PLA<sub>2</sub> y aque-



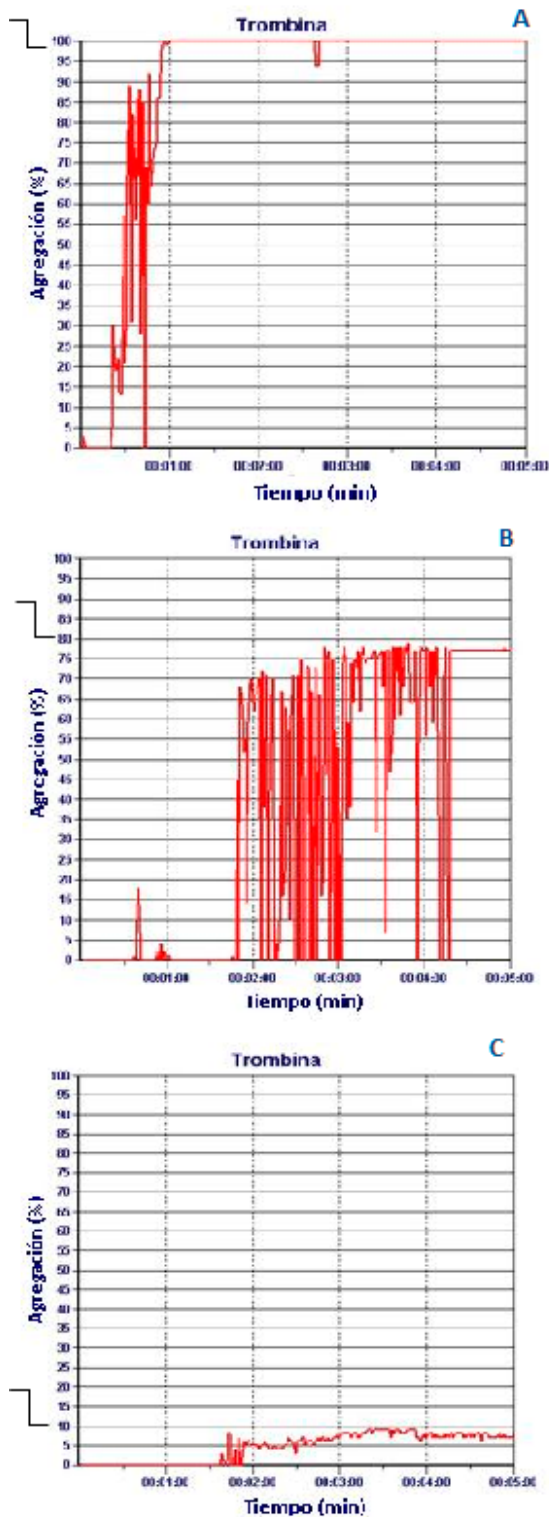
**Figura 1.** Morfología de líneas celulares bajo microscopio de contraste de fases. Columna izquierda: células control, columna derecha: células tratadas con fosfolipasa A<sub>2</sub>. A: células miogénicas C2C12. B: células epiteliales normales (NMuMG). C: células epiteliales tumorales (LM3).

llas no tratadas (controles), mostraron crecimiento homogéneo en el cultivo, exhibiendo una forma poligonal con bordes definidos (Figuras 1B y C). Por otra parte, se constató ausencia de actividad bactericida sobre las

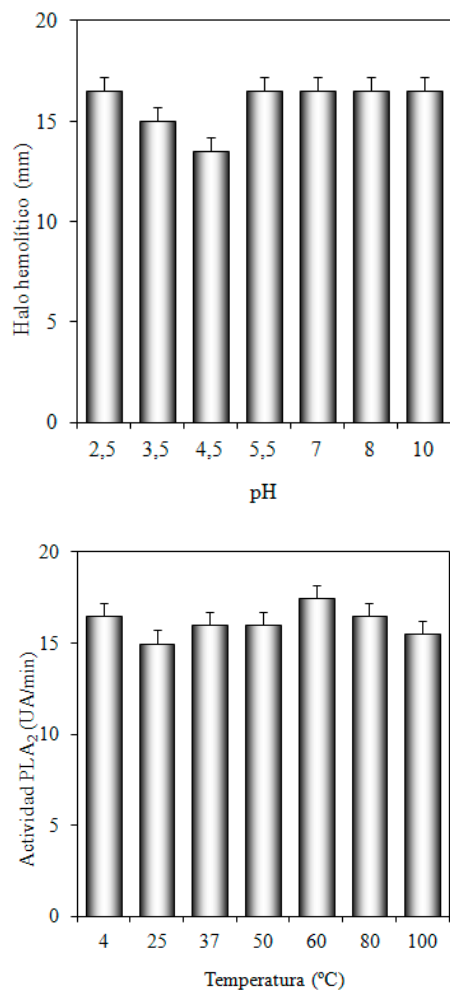
cepas de *S. aureus* (cepa ATCC 25923) y *E. coli* (cepa ATCC 25922) detectable por el método de McGeachie y por el método de mayor sensibilidad de microdilución en caldo a las dosis ensayadas (6; 3; 1,5 y 0,75 µg/ml) de la PLA<sub>2</sub> aislada.

Sin embargo, la PLA<sub>2</sub> mostró capacidad para inhibir la agregación plaquetaria. Como se observa en la Figura 2, la trombina que se utilizó como agonista plaquetario (1,04 µg/10µl) y por lo tanto control positivo de la reacción, fue capaz de inducir el 100% de agregación plaquetaria (A). En tanto, cuando el PRP fue preincubado con 5 µl de la PLA<sub>2</sub> aislada (1 mg/ml), en presencia de la trombina (5 µL) y habiendo pasado 2 minutos, la mezcla inhibió la agregación en una magnitud del 20% (B). Al aumentar la cantidad de enzima (10 µg) en la mezcla (10 µL), esta causó un 90% de la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por trombina (C). Se comprueba así una actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria dosis-dependiente de la concentración de la enzima PLA<sub>2</sub> utilizada en este ensayo.

Además, la fosfolipasa Ba SpII RP4 exhibió alta estabilidad frente a su pre-incubación en un amplio rango de temperaturas (4 a 90°C) y de pH (3-12) (Figura 3).



**Figura 2.** Efecto de la fosfolipasa de *B. alternatus* sobre la agregación plaquetaria. A. trombina; PLA<sub>2</sub> aislada B (5 µl) y C (10µl) en presencia del agonista plaquetario. Las flechas señalan el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria por efecto de la fosfolipasa A<sub>2</sub> aislada en presencia de la trombina.



**Figura 3.** Efectos del pH y la temperatura sobre la estabilidad de la fosfolipasa A<sub>2</sub>.



**Tabla 1.** Valores de actividad enzimática a diferentes temperaturas de reacción.

temperatura (°C)	actividad ( $\Delta$ pH/min)	r
5,6	0,058	0,996
15	0,091	0,993
22	0,110	0,996
31	0,176	0,999
50	0,164	0,999
60	0,101	0,996
70	no medible	----

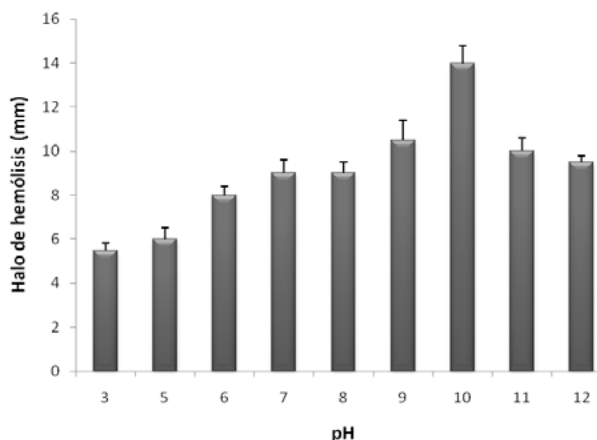
r = coeficiente de correlación lineal.

La PLA<sub>2</sub> se mantuvo catalíticamente activa sin mostrar variaciones significativas, aunque a pH 3,5 y 4,5 la actividad enzimática disminuyó por encontrarse cercanos al punto isoelectrónico (pI) de la enzima (4,88) (Figura 4). Luego, la actividad enzimática mostró una dependencia directa con el aumento de la temperatura aunque por encima de los 50°C se observó una ligera turbidez en la emulsión del test, que se incrementó aún más a los 70°C. Es probable que debido a las elevadas temperaturas, la emulsión se haya visto afectada en su estabilidad (Tabla 1) y ello no permitiera registrar cambios en la reacción por la enzima.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo amplía la caracterización bioquímica de la PLA<sub>2</sub> más abundante (Ba SpII RP4) del veneno de *Bothrops alternatus* que habita el nordeste argentino. Trabajos previos realizados por este grupo de investigación mostraron que la enzima, catalíticamente activa y de naturaleza ácida, exhibe actividades farmacológicas de leves a nulas, e.g. es poco edematogénica, no es letal ni anticoagulante, sólo alarga el tiempo de coagulación, y carece de actividad miotóxica<sup>11</sup>.

Los resultados aquí descriptos demuestran que además es capaz de inhibir la agregación plaquetaria, actividad que juega un rol importante en la retracción y cicatrización de heridas. El efecto inhibitorio de esta



**Figura 4.** Evaluación del efecto del pH sobre la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> en solución en buffer fosfato a diferentes valores de pH.

enzima sobre la agregación del PRP humano fue dosis-dependiente. Estas evidencias son coincidentes con las encontradas por otros investigadores<sup>4</sup>, quienes además indicaron que los fosfolípidos presentes en el plasma son el sustrato necesario para la expresión de dicho efecto sobre las plaquetas.

Al estudiar la acción tóxica de la enzima sobre cultivos celulares y cepas bacterianas se demostró que la PLA<sub>2</sub> de *B. alternatus* carece de actividades citotóxica y bactericida a las dosis y tiempos de exposición ensayados. Contrariamente, el veneno entero de *B. alternatus* de Argentina produjo una disminución en la viabilidad celular de mioblastos murino de músculo esquelético (CC50: 5,8 µg/ml) como también mostró un efecto apoptótico<sup>8</sup>. Al respecto, otras investigaciones avalan la acción sinérgica de la PLA<sub>2</sub> aislada<sup>7</sup> y de una metaloproteínasa<sup>12</sup> del mismo veneno, ya que la primera (no miotóxica) es capaz de provocar un efecto tóxico después de la citotoxicidad causada por la metaloproteínasa (baltergina) antes mencionada. Asimismo, este veneno (10 mg/ml) posee acción bactericida indicando la presencia de otras enzimas capaces de afectar estas células procariontas del tipo Gram-positivas y Gram-negativas, que podrían proteger a las serpientes durante su alimentación.

Los estudios de estabilidad muestran una resistencia estructural de la fosfolipasa a los cambios de temperatura y pH, manifiesta por una actividad catalítica prácticamente invariable. Este comportamiento es común entre las PLA<sub>2</sub> como aquella Asp49 aislada de *B. moojeni*<sup>22</sup> también de naturaleza ácida. Esta efectiva estabilidad frente a los cambios de temperatura y pH la tornan apta para su manipulación y conservación sin riesgo a pérdida de actividad biológica.

Las evidencias reunidas en este ensayo demuestran los escasos efectos lesivos que produce la Ba SpII RP4 PLA<sub>2</sub> y su gran estabilidad química y estructural. Estos resultados la tornan un atractivo inmunógeno para la producción de antiveneno específico a través del desarrollo de planes de inmunización de elevada carga antigénica, sin compromiso del estado general del animal productor. Futuros estudios deberán confirmar/descartar su empleo en el desarrollo de inmunobiológicos alternativos más específicos, que neutralicen la letalidad del veneno con menores complicaciones en el accidentado.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por la Secretaría General de Ciencia y Técnica (PI B013/2010) de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Argentina.

## REFERENCIAS

1. Acosta OC, Teibler P, Koscinczuk P, Sánchez Negrette M, Trulls H, Maruñak S. 1996. Edema and myonecrosis induced by *Bothrops jararaca* venom of Argentina in mice. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 46: 233-238.

2. **Acosta OC, Koscinczuk P, Gutiérrez JM.** 1996. Actividades hemorrágica y coagulante del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina. *Acta Bioquim Clin* 30: 401-405.
3. **Acosta OC, Koscinczuk P, Teibler P, Sánchez Negrette M, Ruiz R, Maruñak S, Bogarin G.** 1998. Hemorrhagic and edema-forming activity and histologic changes in the mouse footpad induced by venoms from Argentinian *Bothrops* and *Crotalus* genuses. *Toxicon* 36: 1165-1172.
4. **Andriao-Escarso SH, Soares AM, Fontes MR, Fuly AL, Correa FM, Rosa JC, Greene LJ, Giglio JR.** 2002. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol* 64: 723-732.
5. **Born GV.** 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194: 927-929.
6. **Branson D.** 1974. *Métodos en bacteriología clínica. Manual de tests y procedimientos*, Panamericana, Buenos Aires, p. 256.
7. **Bustillo S, Gay C, García Denegri ME, Ponce LA, Kier-Joffé EB, Acosta OC, Leiva LC.** 2012. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon* 59: 338-343.
8. **Bustillo S, Lucero H, Leiva LC, Acosta OC, Kier-Joffé EB, Gorodner JO.** 2009. Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 15: 28-42.
9. **Esteso SC.** 1985. *Ofidismo en la República Argentina*, Ed. Arpón, Córdoba (Argentina), p. 170.
10. **Fox JW, Serrano SM.** 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45: 969-985.
11. **García Denegri ME, Acosta OC, Huancahuire S, Martins D, Marangoni S, Maruñak SL, Teibler GP, Leiva LC, Ponce LA.** 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 56: 64-74.
12. **Gay CC, Leiva LC, Maruñak S, Teibler P, Acosta OC.** 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46: 546-54.
13. **Gutiérrez JM, Avila C, Rojas E, Cerdas L.** 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26: 411-413.
14. **Kini RM.** 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem J* 397: 377-387.
15. **Lobo A, Radvanyi F.** 1987. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25: 1181-1188.
16. **Ohler M, Georgieva D, Seifert J, von Bergen M, Arni RK, Genov N, Betzel C.** 2010. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *J Proteome Res* 9: 2422-2437.
17. **Perumal R, Gopalakrishnakone P, Ho B, Chow VT.** 2008. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie* 90: 1372-1388.
18. **Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutierrez JM, Rodrigues L, Novello JC, Marangoni S.** 2007. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta* 1770: 585-593.
19. **Rodrigues RS, Izidoro LF, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homsí MI, Selistre HS, Giglio JR, Fuly AL, Soares AM, Rodrigues VM.** 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 50: 153-165.
20. **Rodrigues VM, Marcussi S, Cambraia RS, Araujo AL, Malta NR, Hamaguchi A, Ferro EA, Homsí MI, Giglio JR, Soares AM.** 2004. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon* 44: 305-314.
21. **Ruiz R, Sario HM.** 2004. Epidemiología del accidente ofídico en la provincia de Corrientes. *Ann Com Cientif Tecnol UNNE* (Corrientes, Argentina), V-029.
22. **Santos NA, Silveira LB, Oliveira CZ, Bernardes CP, Menaldo DL, Fuly AL, Arantes EC, Sampaio SV, Mamede CC, Beletti ME, Oliveira F, Soares AM.** 2008. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inducer phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 52: 908-917.
23. **Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC.** 1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 36: 1059-1063.
24. **Son DJ, Park MH, Chae SJ, Moon SO, Lee JW, Song HS, Moon DC, Kang SS, Kwon YE, Hong JT.** 2007. Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. *Mol Cancer Ther* 6: 675-683.