

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y TOXICOLÓGICA DE
UNA FOSFOLIPASA ACÍDICA DEL VENENO DE *BOTHROPS ASPER*

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Microbiología, Parasitología y Química Clínica para optar
al grado de *Magister Scientiae* en Microbiología

JULIAN FERNANDEZ ULATE

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2010

Dedicatoria y agradecimientos

Agradezco a mi familia por todo el apoyo y el cariño. Siempre he disfrutado compartir con ustedes y espero que sigamos siempre unidos.

Al Dr. Bruno Lomonte, quien desde mi punto de vista es el tutor perfecto y que además es una excelente persona con quien he compartido muy buenos momentos.

Le agradezco al Dr. José María Gutiérrez “Chema”, por sus observaciones, ideas, ayuda en el diseño de experimentos y por ser un ejemplo a seguir como persona.

A la Dra. Yamileth Angulo por sus valiosas observaciones y consejos.

A la Dra. Teresa Escalante por su ayuda con las pruebas para medir la posible actividad anti agregante de la toxina sobre plaquetas.

A Juan Jo, Libia y Paula por su atención durante mi pasantía en Valencia.

Al Dr. Mahmood Sasa y al Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA-UCR) por la ayuda en diversos aspectos del trabajo.

Le agradezco al resto de compañeros del Instituto Clodomiro Picado por hacerme sentir parte de un gran equipo, por su solidaridad y afecto.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae* en Microbiología”.


Dra. Alexandra Rucavado Romero
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**


Dr. Bruno Lomonte Vigliotti
Director de Tesis


Dra. Yamileth Angulo Ugalde
Asesora


Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez
Asesor


M.Sc. Teresa Escalante Muñoz
Representante del Director
Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica

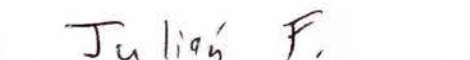

Julián Fernández Ulate
Candidato

Tabla de contenido

Portada.....	i
Dedicatoria y agradecimientos.....	ii
Hoja de aprobación.....	iii
Tabla de contenido.....	iv
Resumen.....	v
Resumen en inglés.....	vi
Lista de Cuadros.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de abreviaturas.....	xi
Introducción	1
Objetivos.....	10
Materiales y Métodos.....	11
Resultados.....	25
Discusión.....	50
Referencias.....	55
Apéndice.....	62

Resumen

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂s) son uno de los principales componentes de los venenos de serpiente y ejercen una gran variedad de actividades tóxicas como neurotoxicidad y miotoxicidad, entre otras. Dado que la mayoría de PLA₂s tóxicas son proteínas básicas, las isoformas ácidas y sus posibles papeles en los venenos son menos conocidos. En este trabajo, una enzima ácida (BaspPLA₂-II) fue aislada del veneno de *Bothrops asper* (región del Pacífico de Costa Rica) y caracterizada. BaspPLA₂-II es monomérica, con una masa de 14.212 ± 6 Da y un punto isoeléctrico de 4,9. Su secuencia completa de 124 aminoácidos se dedujo a través de su ADN copia y mediante la secuenciación automatizada de sus aminoácidos. Pertenece al grupo Asp49, de enzimas catalíticamente activas. Ensayos *in vivo* e *in vitro* demostraron que BaspPLA₂-II, en contraste con las PLA₂s básicas Asp49 presentes en el mismo veneno, carece de actividad miotóxica, citotóxica y anticoagulante. La enzima BaspPLA₂-II también se diferenció de otras PLA₂s ácidas descritas en venenos de *Bothrops* spp., ya que no generó hipotensión ni inhibición de la agregación plaquetaria. Además, esta enzima no fue letal para ratones, con dosis intravenosas de hasta 100 µg (5,9 µg/g), lo que indica su falta de actividad neurotóxica. El único efecto tóxico registrado *in vivo* fue una inducción moderada de edema local. Por lo tanto, las características toxicológicas de BaspPLA₂-II sugieren que no juega un papel clave en la fisiopatología del envenenamiento por *B. asper* y que su papel estaría limitado a funciones digestivas. Los análisis inmunoquímicos con anticuerpos contra BaspPLA₂-II revelaron que las PLA₂s ácidas y básicas forman dos grupos antigénicamente diferentes en el veneno de *B. asper*.

Resumen en Inglés

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are major components of snake venoms, exerting a variety of relevant toxic actions such as neurotoxicity and myotoxicity, among others. Since the majority of toxic PLA₂s are basic proteins, acidic isoforms and their possible roles in venoms are less understood. In this study, an acidic enzyme (BaspPLA₂-II) was isolated from the venom of *Bothrops asper* (Pacific region of Costa Rica) and characterized. BaspPLA₂-II is monomeric, with a mass of 14,212 ± 6 Da and a pI of 4.9. Its complete sequence of 124 amino acids was deduced through cDNA and protein sequencing, showing that it belongs to the Asp49 group of catalytically active enzymes. *In vivo* and *in vitro* assays demonstrated that BaspPLA₂-II, in contrast to the basic Asp49 counterparts present in the same venom, lacks myotoxic, cytotoxic, and anticoagulant activities. BaspPLA₂-II also differed from other acidic PLA₂s described in *Bothrops* spp. venoms, as it did not show hypotensive and anti-platelet aggregation activities. Furthermore, this enzyme was not lethal to mice at intravenous doses up to 100 µg (5.9 µg/g), indicating its lack of neurotoxic activity. The only toxic effect recorded *in vivo* was a moderate induction of local edema. Therefore, the toxicological characteristics of BaspPLA₂-II suggest that it does not play a key role in the pathophysiology of envenomings by *B. asper*, and that its purpose might be restricted to digestive functions. Immunochemical analyses using antibodies raised against BaspPLA₂-II revealed that acidic and basic PLA₂s form two different antigenic groups in *B. asper* venom.

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Principales actividades de las PLA ₂ s ácidas purificadas de venenos de serpientes de la subfamilia Crotalinae.....	6
Cuadro 2. Información obtenida por Alape-Girón <i>et al.</i> (2008) sobre una PLA ₂ ácida de <i>B. asper</i>	8
Cuadro 3. Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos contra la PLA ₂ ácida.....	22

Lista de Figuras

Figura 1. Aislamiento de BaspPLA ₂	26
Figura 2. Espectro utilizado para obtener la masa molecular de BaspPLA ₂ -II, por espectrometría de masas por ionización en Electrospray.....	27
Figura 3. Péptidos separados por RP-HPLC después de la digestión de BaspPLA ₂ -II con bromuro de cianógeno usando una columna analítica C18 y un gradiente lineal de 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (solución A) y acetonitrilo (solución B).....	28
Figura 4. Secuencia parcial de BaspPLA ₂ -II obtenida de la secuencia N-terminal de la proteína, las de los fragmentos digeridos con bromuro de cianógeno y la de espectrometría de masas en tándem.....	29
Figura 5. Resultados de la 3' RACE-PCR para la secuencia de BaspPLA ₂ -II.....	30
Figura 6. PCR para detectar la presencia del vector pGEM-T con la secuencia de la PLA ₂ ácida en las colonias de bacterias <i>E. coli</i> DH5α.....	31
Figura 7. Comparación de las secuencias obtenidas por biología Molecular y por técnicas de proteómica para BaspPLA ₂ -II.....	32
Figura 8. Secuencia completa de la PLA ₂ ácida obtenida por técnicas de biología molecular y de proteómica.....	33
Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias, comparando la secuencia de BaspPLA ₂ -II con proteínas relacionadas de venenos de serpiente.....	34

Figura 10. Relaciones filogenéticas de BaspPLA ₂ -II con otras fosfolipasas A ₂ de venenos de serpiente.....	35
Figura 11. Modelo tridimensional de BaspPLA ₂ -II, superpuesta con la estructura cristalizada de la PLA ₂ ácida de <i>B. jararacussu</i> (código PDB 1ZL7).....	36
Figura 12. Actividad enzimática de la PLA ₂ ácida de <i>B. asper</i> y de la Miotoxina I de <i>B. asper</i> sobre micelas de fosfatidilcolina.....	37
Figura 13. Medición de la actividad anticoagulante de 40 µg de BaspPLA ₂ -II y de 10 µg de la Miotoxina I de <i>Bothrops asper</i> sobre plasma humano citratado.....	38
Figura 14. Ausencia del efecto anti-agregante plaquetario de BaspPLA ₂ -II.....	39
Figura 15. Células musculares C2C12 después de que se sometieron a una dosis de 20 µg de BaspPLA ₂ -II (izq) y de 20 µg de miotoxina I de <i>B. asper</i> (der).....	40
Figura 16. Ausencia del efecto miotóxico y citotóxico de BaspPLA ₂ -II.....	41
Figura 17. Análisis histológico de la toxicidad sistémica de la PLA ₂ ácida.....	42
Figura 18. Actividad edematizante de BaspPLA ₂ -II en ratones inyectados con la PLA ₂ ácida, frente a ratones inyectados solamente con PBS.....	43
Figura 19. Medición de la presión arterial de un grupo de ratones inyectado de forma intravenosa con 10 µg de la PLA ₂ ácida, otro con 4 µg del veneno completo de <i>B. asper</i> y otro con 100 µl de PBS.....	44

Figura 20. Presencia de anticuerpos contra BaspPLA₂-II.....46

Figura 21. ELISA con el título de anticuerpos contra la PLA₂ acídica
y contra la Miotoxina I (Mt-I) de *B. asper* en el Suero Antiofidico
Polivalente del Instituto Clodomiro Picado.....49

Lista de abreviaturas:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

B. asper: *Bothrops asper*

BaspPLA₂-II: Fosfolipasa acídica de *Bothrops asper*

DTT: ditioneitol

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

HPLC: cromatografía líquida de alto desempeño

MS: espectrometría de masas

Mt-I: Miotoxina I

N-terminal: amino terminal

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pI: punto isoelectrico

PLA₂: fosfolipasa A₂

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

Introducción

Los accidentes causados por mordeduras de serpientes representan un problema de salud pública, principalmente en los países tropicales, debido a la frecuencia con que se presentan y la morbilidad y mortalidad que generan. Se estima que en el mundo ocurren alrededor de 2,5 millones de casos de envenenamiento ofídico y 125 000 muertes por año (Chippaux, 1998). Aunque se producen antivenenos por varios laboratorios en todos los continentes, el envenenamiento ofídico tiene un gran impacto en la población y en los sistemas de salud pública, especialmente en África, Asia, Oceanía y América Latina (Gutiérrez *et al.*, 2006).

En Costa Rica ocurren aproximadamente 500 accidentes ofídicos al año. La especie *Bothrops asper* causa la mayor cantidad de estos (casi el 50%). De hecho, *B. asper* es la especie que causa la mayor cantidad de accidentes ofídicos de América Central (Sasa y Vázquez, 2002). Esta serpiente se conoce popularmente como “Terciopelo” y pertenece a la familia Viperidae (Bolaños, 1982). La tasa de mortalidad por los envenenamientos ofídicos en Costa Rica, durante 1993-2006, se encontró entre 0,02-0,19 por 100.000 habitantes. Las provincias con mayor número de muertes por año y con mayor tasa de mortalidad son las de Puntarenas y Limón, donde abunda la serpiente *B. asper* (Fernández y Gutiérrez, 2008).

El envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae se caracteriza porque genera un cuadro de lesión muy grave en el sitio de la mordedura, con dolor fuerte, edema, hemorragia local y necrosis de tejido. En los casos muy graves, puede requerirse la amputación del miembro afectado. También se genera un cuadro sistémico que puede llevar a la muerte. Este cuadro sistémico se caracteriza por alteraciones en la coagulación sanguínea, hemorragias en diversos órganos y daño renal. Estas alteraciones pueden llevar a un choque cardiovascular (Otero *et al.*, 2002). Los efectos sistémicos se manifiestan horas después de la mordedura, mientras que los efectos locales inician minutos después de la mordedura.

El veneno de *B. asper* contiene proteínas que se agrupan en 8 familias: Serina proteinasas, fosfolipasas A₂, metaloproteinasa, L-aminoácido oxidasas, proteínas secretorias ricas en cisteína (CRISP por sus siglas en inglés), fragmentos DC, proteínas parecidas a lectinas tipo C, y disintegrinas (Alape-Girón *et al.*, 2008). Una reciente revisión indica que se han aislado y caracterizado alrededor de 25 proteínas que pertenecen a este veneno (Angulo y Lomonte, 2009).

Se ha descrito previamente que existe variabilidad en los componentes del veneno de *B. asper* según la ubicación geográfica. El veneno de *B. asper* de la vertiente del Pacífico es diferente al de *B. asper* de la vertiente Atlántica/Caribe. Primero se reportó que el veneno de *B. asper* de ambas regiones es diferente desde el punto de vista toxicológico y enzimático (Jiménez-Porras, 1964). El veneno de los especímenes del Caribe presentó una mayor actividad procoagulante, hemorrágica y mionecrótica, mientras que el veneno obtenido de las serpientes del Pacífico mostró una mayor actividad proteolítica (Aragón y Gubensek 1981; Gutiérrez *et al.*, 1980). Estas diferencias en la composición de los venenos se confirmaron posteriormente mediante estudios de proteómica con muestras de serpientes de ambas vertientes (Alape-Girón *et al.*, 2008). En el presente trabajo, se estudió una fosfolipasa A₂ ácida del veneno de *B. asper* de la vertiente del Pacífico.

Fosfolipasas A₂ (PLA₂s) y homólogos de PLA₂s

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂s, por sus siglas en inglés) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran en grandes cantidades en el páncreas de mamíferos y en el veneno de diferentes familias de serpientes, el veneno de abejas, de escorpiones y de lagartijas (Schaloske y Dennis, 2006). En los venenos de muchas serpientes, como *B. asper* del Pacífico, las PLA₂s son el componente mayoritario, constituyendo alrededor de un 45% de sus proteínas (Alape-Girón *et al.*, 2008).

Las PLA₂s son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster del C2 de los 3-*sn*-fosfoglicéridos, y producen lisofosfolípidos y ácidos grasos libres en una reacción dependiente de calcio. Las PLA₂s enzimáticamente activas requieren calcio para la estabilización de la conformación catalítica. El sitio de unión para el calcio se forma por los grupos beta-carboxílicos de Tyr 28, Gly 30 y Gly 32 y por el grupo carboxilo del Asp 49 (Magro *et al.*, 2004). Dos moléculas de agua completan estructuralmente la esfera para la unión del calcio, de tal manera que se forma una bipirámide pentagonal (Santos-Filho *et al.*, 2008). La estructura característica de las PLA₂s del género *Bothrops* sp. consiste en 3 hélices alfa, una hoja beta, una hélice corta y un bucle o *loop* de unión al calcio (Arni y Ward, 1996).

Muchas PLA₂s han mostrado tener actividades neurotóxicas, miotóxicas, hemorrágicas, hemolíticas, necróticas, o edematígenas (Kini, 2003; Gutiérrez y Lomonte, 1997). Algunas de estas PLA₂s afectan la agregación plaquetaria de distintas maneras, y se han clasificado en tres categorías, a saber: las que inducen la agregación plaquetaria (Clase A), las PLA₂s que inhiben la agregación plaquetaria inducida por distintos agonistas fisiológicos (Clase B) y las que inhiben e inducen la agregación plaquetaria pues presentan una respuesta bifásica (Clase C) (Kini y Evans, 1997).

La superfamilia de enzimas fosfolipasa A₂ (PLA₂) consiste actualmente de 15 grupos. Se encuentran en estos grupos 5 tipos distintos de enzimas: las PLA₂s secretadas, las PLA₂s citosólicas, las PLA₂s independientes de calcio, las acetilhidrolasas-factor activador de plaquetas y las PLA₂s lisosomales. La asignación a un grupo determinado se basa en el mecanismo de catálisis, así como características estructurales y funcionales. Las PLA₂s de serpientes se encuentran dentro del grupo de las PLA₂s secretadas. En el grupo IA se encuentran las PLA₂s de los elápidos. En el grupo II se encuentran las fosfolipasas de los venenos de la familia Viperidae. Las fosfolipasas de *B. asper*, que pertenecen a la familia Viperidae, se encuentran en el subgrupo IIA (Schaloske y Dennis, 2006).

En el subgrupo IIA, las PLA₂s se subdividen aún más en 2 grupos (Lomonte *et al.*, 2003):

- 1) Las PLA₂s Asp49 que tienen un residuo de aspartato en la posición 49 y que presentan actividad catalítica.
- 2) Los “homólogos de PLA₂s”: Los más comunes son Lys49, pero también hay Ser49, Arg49, Gln49 y Asn49. Estas proteínas tienen respectivamente un residuo de lisina, serina, arginina, glutamina o asparagina en la posición 49 y no tienen actividad catalítica.

Las PLA₂s también se pueden clasificar según su punto isoeléctrico en fosfolipasas ácidas, básicas o neutrales. La presencia de distintas isoformas de PLA₂s en el veneno de serpientes se ha demostrado, ya sea en el veneno de una misma serpiente o en venenos de serpientes del mismo género (Santos-Filho *et al.*, 2008). En la serpiente *B. asper*, las PLA₂s básicas son más abundantes que las ácidas (Alape-Girón *et al.*, 2008).

Muchas PLA₂s básicas de tipo Asp49 y de tipo Lys49 han mostrado ser miotoxinas, independientemente de su habilidad para catalizar la hidrólisis de fosfolípidos. Por esta razón, las PLA₂s de tipo Lys49 han atraído la atención, como modelos para la inducción de mionecrosis por un mecanismo de acción independiente de la actividad catalítica (Lomonte *et al.*, 2003).

Fosfolipasas A₂ ácidas

Los venenos de serpientes generalmente contienen una proporción variable de PLA₂s básicas con respecto a las PLA₂s ácidas, de acuerdo con la especie. Además, las PLA₂s básicas tienen una actividad miotóxica y neurotóxica mucho mayor que las

PLA₂s ácidas (Rosenberg, 1986). Estas son probablemente las razones por las que las fosfolipasas ácidas no han sido estudiadas a fondo.

Las PLA₂s ácidas que han sido purificadas y secuenciadas tienen en el aminoácido 49 de su secuencia un aspartato. Además, las PLA₂s ácidas se caracterizan, en general, por tener mucho mayor actividad catalítica que las fosfolipasas básicas (Rosenberg, 1986; Santos-Filho *et al.*, 2008).

Los primeros efectos tóxicos producidos por PLA₂s ácidas fueron demostrados por Nisenbom *et al.*, (1986), que describió que una fosfolipasa ácida de *Bothrops alternatus* podía causar daño severo en hígado, pulmones y corazón.

Las actividades que más se han descrito en las PLA₂s ácidas purificadas de distintos venenos de serpientes son la actividad anti-agregante plaquetaria y la actividad edematígena. En un inicio, las PLA₂s ácidas purificadas mostraron una actividad mitotóxica muy baja. Sin embargo, posteriormente se reportó la purificación de fosfolipasas ácidas con mayor actividad mitotóxica (Cuadro 1).

La mayoría de las fosfolipasas ácidas no son letales o muestran una letalidad muy baja en ratones. Estas enzimas tampoco tienen actividad hemolítica directa importante (Santos-Filho *et al.*, 2008).

El estudio de las PLA₂s ácidas de *B. asper* se inicia en 1978 cuando Ferlan y Gubenšek (1978) aislaron una fosfolipasa ácida del veneno de *B. asper*. La PLA₂ ácida aislada, denominada PLA I, mostró una actividad letal intravenosa de 2 µg/g en ratones. Posteriormente, Alagón y colaboradores (1980) también reportaron el aislamiento y la caracterización bioquímica de fosfolipasas ácidas del veneno de *B. asper*, denominadas PL A₂ 1, PL A₂ 2 y PL A₂ 3.

Cuadro 1. Principales actividades de las PLA₂s ácidas purificadas de venenos de serpientes de la subfamilia Crotalinae

Actividad	Especie	Referencias
Anti agregante plaquetaria	<i>Bothrops jararacussu</i>	Andrião-Escarso <i>et al.</i> , 2002;
	<i>Bothrops erythromelas</i>	De Albuquerque <i>et al.</i> , 2006
	<i>Lachesis muta</i>	Fuly <i>et al.</i> , 2000; 2002
	<i>B. jararacussu</i>	Ketelhut <i>et al.</i> , 2003
	<i>B. jararacussu</i>	Roberto <i>et al.</i> , 2004
	<i>Bothrops pauloensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2007
	<i>Bothrops moojeni</i>	Santos-Filho <i>et al.</i> , 2008
	<i>Bothrops jararaca</i>	Serrano <i>et al.</i> , 1999
	<i>Crotalus viridis viridis</i>	Tsai <i>et al.</i> , 2003
Edematígena	<i>Agkistrodon halys pallas</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008
	<i>B. jararacussu</i>	Andrião-Escarso <i>et al.</i> , 2002
	<i>Bothrops insularis</i>	Cogo <i>et al.</i> , 2006
	<i>Bothrops neuweidii</i>	Daniele <i>et al.</i> , 1995
	<i>L. muta</i>	Fuly <i>et al.</i> , 2002
	<i>B. jararacussu</i>	Ketelhut <i>et al.</i> , 2003
	<i>B. jararacussu</i>	Roberto <i>et al.</i> , 2004
	<i>B. pauloensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2007
	<i>B. moojeni</i>	Santos-Filho <i>et al.</i> , 2008
<i>C. viridis viridis</i>	Tsai <i>et al.</i> , 2003	
Anticoagulante	<i>B. jararacussu</i>	Ketelhut <i>et al.</i> , 2003
	<i>B. jararacussu</i>	Roberto <i>et al.</i> , 2004
Inducción de	<i>B. erythromelas</i>	De Albuquerque <i>et al.</i> , 2006

Prostaglandina I ₂	<i>B. moojeni</i>	Santos-Filho <i>et al.</i> , 2008
Miotóxica	<i>B. insularis</i>	Cogo <i>et al.</i> , 2006
	<i>L. muta</i>	Fuly <i>et al.</i> , 2000
	<i>B. jararacussu</i>	Ketelhut <i>et al.</i> , 2003
	<i>B. pauloensis</i>	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
	<i>B. moojeni</i>	Santos-Filho <i>et al.</i> , 2008
Hipotensora	<i>B. jararacussu</i>	Andrião-Escarso <i>et al.</i> , 2002
Bactericida	<i>B. jararacussu</i>	Roberto <i>et al.</i> , 2004
Anti tumoral	<i>B. jararacussu</i>	Roberto <i>et al.</i> , 2004

En el año 2000, Pinto reportó en su tesis de licenciatura en Microbiología y Química Clínica, el aislamiento de una fosfolipasa ácida de *B. asper* de la vertiente del Caribe con un peso molecular de aproximadamente 14500 Da, acción anti-agregante sobre plaquetas y la siguiente secuencia N-terminal: ELFELXCDILQETNXCCAXDY-GWYGC.

En un trabajo en el que se estudió el proteoma de *B. asper* de la vertiente del Océano Pacífico y de la vertiente del Caribe, Alape-Girón y colaboradores (2008) encontraron, entre otras, una fosfolipasa ácida en el veneno del Pacífico al someter el veneno completo a una corrida en un gel de electroforesis de poliacrilamida de 2 dimensiones. De la PLA₂ ácida obtuvieron parte de la secuencia N terminal así como algunas secuencias de péptidos internos por espectrometría de masas en tándem (Cuadro 2). También obtuvieron la masa molecular de la PLA₂ ácida mediante espectrometría de masas por ionización en electrospray. La PLA₂ ácida aislada en esta tesis

(BASPPLA₂-II) corresponde a la misma PLA₂ acídica de *B. asper* del Pacífico identificada por Alape-Girón y colaboradores.

Cuadro 2. Información obtenida por Alape-Girón *et al.* (2008) sobre una PLA₂ acídica de *B. asper*

Secuencia N terminal	N L W Q F G Q M M S D V M R
Masa molecular	14211.6
Secuencia de algunos péptidos internos	YWFYGAK QICECDR YSYSWKDK CCFVHDCCYGK
pI aproximado	4,5

Justificación e importancia del estudio

Hasta el momento no se han determinado las posibles actividades tóxicas de ninguna PLA₂ ácida aislada del veneno de *B. asper* y se desconoce cuál es su papel en la fisiopatología del envenenamiento ocasionado por esta especie. Por tal razón, determinar las actividades tóxicas de esta enzima y su posible papel en el envenenamiento constituiría un aporte original y valioso para la comprensión de este veneno y de sus acciones tóxicas en el organismo. A la vez, sería posible comparar las actividades que tenga esta enzima con las actividades reportadas de otras fosfolipasas ácidas de otros venenos de serpientes, para contribuir a la comprensión de las relaciones entre estructura y función en esta familia de proteínas. Adicionalmente, es de interés aplicado determinar si el antiveneno de uso hospitalario en la región centroamericana posee los correspondientes anticuerpos contra dicha PLA₂, y si los mismos son capaces de neutralizar sus actividades biológicas, especialmente si se encontrara en el presente estudio que estas juegan un papel importante en el envenenamiento.

Objetivos

Objetivo general

Aislar una fosfolipasa ácida del veneno de *Bothrops asper* de la región del Pacífico de Costa Rica para determinar sus características bioquímicas y toxicológicas y su papel en el envenenamiento ofídico.

Objetivos específicos

Purificar una fosfolipasa ácida del veneno de *Bothrops asper* de la región del Pacífico de Costa Rica.

Realizar la caracterización bioquímica de la fosfolipasa ácida de *Bothrops asper*.

Realizar la caracterización toxicológica de la fosfolipasa ácida de *Bothrops asper* y determinar su papel en la fisiopatología del envenenamiento.

Determinar mediante estudios inmunoquímicos las relaciones antigénicas de la fosfolipasa ácida con otras fosfolipasas, y si en el suero antiofídico polivalente del Instituto Clodomiro Picado se encuentran anticuerpos contra esta enzima.

Materiales y métodos

1. Obtención del veneno y de animales

El veneno de la serpiente *Bothrops asper* de la vertiente del Océano Pacífico se obtuvo a partir de una colección de serpientes de esta especie y de esta región geográfica. Esta colección de serpientes se encuentra en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado. Una vez recolectado, el veneno fue liofilizado. La selección de este veneno particular radicó en su mayor abundancia y disponibilidad en las reservas que posee dicho instituto, así como en la importancia epidemiológica que tienen las mordeduras por las serpientes de esta región.

Los experimentos en animales se realizaron con ratones CD-1 del animalario del Instituto Clodomiro Picado. Estos experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica (ver apéndice).

2. Purificación de la fosfolipasa ácida (BaspPLA₂-II)

El procedimiento para aislar la fosfolipasa ácida a partir del veneno de *B. asper* del Pacífico fue el siguiente: se pesaron 0,5 gramos del veneno crudo de *B. asper* del Pacífico, y se disolvieron en 6 ml de buffer de acetato de amonio (0,1M; pH=7). Se aplicó este volumen en una columna de cromatografía líquida de Carboximetil-Sephadex y se recogió toda la fracción no unida a la columna. Esta fracción se introdujo posteriormente en una columna de cromatografía líquida de Dietilaminoetil-Sepharose y se aplicó un gradiente lineal de acetato de amonio de 0,1 M a 1,0 M, pH 7.

Una vez que se recogieron las fracciones separadas mediante la cromatografía en DEAE-Sepharose, se procedió a medir la actividad fosfolipasa de cada una de estas fracciones. La fracción que mostró la mayor actividad fosfolipasa se recogió, se liofilizó y se sometió a otro paso de purificación: cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC por sus siglas en inglés) en fase reversa, utilizando una columna C8 semi-preparativa (250 x 10 mm, 5 μ m de tamaño de partícula). En este paso 7 mg de la fracción 2 se disolvieron en 1 ml de una solución de buffer A (0,1% de ácido trifluoroacético, 5% acetonitrilo y 95% agua), se centrifugaron por 3 minutos a 6500 g y el sobrenadante se inyectó y se sometió a un flujo de 1 ml/min, en un gradiente lineal de 100% buffer A y 0% buffer B (5% agua y 95% acetonitrilo) inicialmente, hasta 30% buffer A y 70% buffer B, en 55 minutos.

Una vez que se recolectó la fracción mayoritaria obtenida a partir del HPLC, se liofilizó y se sometió a un último paso de purificación para eliminar trazas de un contaminante: se disolvió en 1 ml de buffer de acetato de amonio (0,1M; pH=5) y se aplicó en una columna de cromatografía líquida de Carboximetil-Sephadex. Posteriormente se recogió toda la fracción no unida a la columna y se liofilizó. Se realizó una corrida electroforética de esta fracción en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% en condiciones reductoras, para evaluar la pureza de la enzima.

3. Determinación del punto isoeléctrico (pI) de BaspPLA₂-II:

Para la determinación del pI de BaspPLA₂-II se utilizó una electroforesis en dos dimensiones con geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Se utilizó un instrumento Multiphor II (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia). Para el isoelectroenfoque, 5 μ g de BASPPLA₂-II se cargaron en una tira IPG Immobiline Dry Strip® de 7 cm (ámbito del pH de 3-10) y se usaron las siguientes condiciones de enfoque: 200 V por 1 minuto, 3500 V por 120 minutos. El SDS-PAGE se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% y se utilizó azul de Coomassie para la tinción de las proteínas. El punto isoeléctrico

observado experimentalmente se comparó con el esperado teóricamente con base en la secuencia de aminoácidos.

4. Determinación de la masa molecular de la PLA₂ ácida:

La masa molecular de la PLA₂ ácida se determinó utilizando espectrometría de masas por ionización en electrospray, con un espectrómetro de masas Qtrap 2000 de Applied Biosystems, en el modo de *Enhanced Multi Charge* (EMC).

5. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la fosfolipasa ácida

- a. Secuenciación N-terminal de BaspPLA₂-II y de los fragmentos obtenidos por digestión con bromuro de cianógeno.

La secuenciación N-terminal se realizó mediante secuenciación de Edman automatizada (Procise Instruments Sequenator, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Primero se realizó la secuenciación N-terminal de la PLA₂ ácida y luego la secuenciación de fragmentos generados mediante la digestión de la proteína con bromuro de cianógeno.

Los fragmentos de la PLA₂ ácida se separaron al someterse a HPLC en fase reversa, utilizando un sistema ETTAN LC (Amersham Biosciences) y una columna analítica C18 (250 x 4 mm, 5 µm de tamaño de partícula) con un flujo de 1 ml/min y un gradiente lineal de 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (solución A) y acetonitrilo (solución B). Se usó 5% B por 10 minutos, seguido de 5-15% B durante 20 minutos, 15-45% B durante 120 minutos y 45-70% de B durante 20 minutos. La detección de proteínas se realizó a 215 nm.

Estos fragmentos también se secuenciaron usando la secuenciación de Edman automatizada (Procise Instruments Sequenator, Applied Biosystems, Foster City, CA).

(b) Secuenciación de péptidos internos por espectrometría de masas en tándem

Con el objetivo de secuenciar péptidos internos de la PLA₂ ácida, se sacó la banda obtenida al correr la PLA₂ purificada en un gel SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras y se sometió a una reducción automatizada con DTT, alquilación con iodoacetamida y digestión con tripsina pancreática bovina (Roche) usando un digester ProGest (Genomic Solutions) según las instrucciones de la casa comercial. De la digestión, se puso 0,65 µl en un portamuestras de un espectrómetro MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization –Time-Of-Flight*, por sus siglas en inglés), mezclados con un volumen igual de una solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) en 50% acetonitrilo con 0,1% de ácido trifluoroacético. La muestra se secó y se analizó con el espectrómetro de masas Applied Biosystems Voyager-DE Pro MALDI-TOF, operado en modo de extracción retrasada y modo reflector. El producto de la digestión se cargó en una columna capilar de nanospray y se sometió a un análisis de espectrometría de masas por ionización en electrospray con un espectrómetro Qtrap de Applied Biosystems equipado con una fuente de nanospray (Protana, Dinamarca). Los iones cargados doble o triplemente, de péptidos seleccionados del espectro obtenido por MALDI-TOF fueron analizados en modo de Resolución Mejorada de MS y los iones monoisotópicos se fragmentaron. Los espectros de la espectrometría de masas en tándem se interpretaron de forma manual o usando una versión del programa MASCOT (<http://matrixscience.com>) frente a una base de datos privada que contenía 927 secuencias de proteínas de vipéridos depositadas en la base de datos Swiss-Prot/TrEMBL. La tolerancia de la masa por MS/MS fue de +/- 0,6Da.

c) Secuenciación de la BaspPLA₂-II mediante su clonaje

La secuencia completa de la PLA₂ ácida se obtuvo a partir del clonaje de su ADNc.

Se extrajo ARN total a partir de las glándulas de veneno de *B. asper* del Pacífico de Costa Rica utilizando las especificaciones del kit RNEasy Protect Mini kit (Qiagen).

El ARNm específico de la fosfolipasa ácida fue sometido a transcripción reversa para obtener ADNc, con el kit FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion) mediante una reacción en cadena de la polimerasa con rápida amplificación de los extremos 3' (*Rapid amplification of 3' cDNA ends polymerase chain reaction* ó 3' RACE-PCR). Según las especificaciones del kit, primero se retrotranscribió todo el ARNm utilizando un OligodT que tenía además una secuencia adaptadora: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACG-ACTCACTATAGGT12VN-3, donde 12VN representa a 12 nucleótidos variables.

A partir del ADNc obtenido, se amplificó la secuencia específica de la PLA₂ ácida utilizando un *primer* específico para la secuencia de la enzima.

Para llevar a cabo esta reacción, se utilizó el producto de la secuenciación N-terminal y se diseñó un *primer* que pudiera reconocer parte de la secuencia N-terminal y que permitiera la amplificación de la secuencia específica de la fosfolipasa ácida (Gene specific primer). El *primer* utilizado fue 5' tggcaattcgggcaaatgatg-3' que corresponde a la parte de la secuencia N-terminal WQFGQMM de la PLA₂ ácida. Posteriormente, los nucleótidos del adaptador que se incluyó en la transcripción reversa sirvieron para generar en la hebra complementaria a ellos otros *primers*: 3' RACE Outer Primer (secuencia 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT-3') y el 3' RACE Inner Primer (secuencia 5'-CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG-3').

La 3' RACE-PCR se llevó a cabo utilizando la transcriptasa reversa RT-M-MLV (Promega). La reacción ocurrió bajo las siguientes condiciones: 5 min a 65 ° C y después 1 hora a 42 ° C. Para la segunda parte de la reacción se realizó una reacción de PCR tipo "touchdown" de 60 a 50 ° C. El protocolo de la reacción de PCR "touchdown" 60/50 incluyó un paso de desnaturalización inicial a 95 ° C durante 10 min seguido de 4 ciclos de desnaturalización (30 s a 94 ° C), apareamiento (30 s a 60 ° C), y extensión (30 s a 72 ° C) , 21 ciclos empezando con las condiciones anteriores y en los ciclos posteriores, se disminuyó la temperatura de hibridación en 0,5 ° C (llegando a 50 ° C en el ciclo 21); 10 ciclos de desnaturalización (30 s a 94 ° C), apareamiento (30 s, a 50 ° C) , y extensión (30 s a 72 ° C); y una extensión final por 10 min a 72 ° C. Los productos se identificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, al observar bandas de 0,4 kb aproximadamente.

El ADNc obtenido se trató con el *kit* ExoSAP-IT[®] (Affymetrix) por 15 minutos a 37 ° C y 15 minutos a 80 ° C, para eliminar todos aquellos contaminantes y se adicionaron colas de dA al ADNc, por 30 minutos a 72 ° C.

Posteriormente se clonó el ADNc en el vector pGEM-T[®] (Promega), durante toda la noche a 4 ° C, según las especificaciones del *kit*. Una vez que se ligó el ADNc al vector, se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH 5 α (Novagen) mediante electroporación. Mediante una PCR se tamizó para confirmar la presencia del vector, con la secuencia de la PLA₂ ácida, en las colonias.

Las bacterias con el vector incluido, crecieron por 72 horas a 37 ° C. Luego se extrajo el vector con el kit de extracción de ADN Wizard *plus* Minipreps DNA purification system (Promega). La secuenciación de los nucleótidos se realizó con un sistema de secuenciación de Applied Biosystems, modelo 377, usando los *primers* T7 y SP6.

6. Modelaje molecular

El modelaje molecular por homología se realizó usando el servidor “Swiss-Model Server” (<http://swissmodel.expasy.org>), con el objetivo de predecir la estructura tridimensional de BaspPLA₂-II. La PLA₂ ácida de *B. jararacussu* (código PDB 1ZL7) se utilizó como una plantilla, ya que ha sido cristalizada y resuelta a 1,6 Å (Murakami *et al.*, 2006) y tiene una identidad en su secuencia del 81% con BaspPLA₂-II. La superposición del modelo con la plantilla se realizó con el programa informático Swiss-PdbViewer (Arnold *et al.*, 2006) y el programa DS ViewerPro (Accelrys).

7. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la fosfolipasa ácida se determinó mediante el método colorimétrico de Araújo *et al.*, (1994), usando rojo de fenol como un indicador de pH y micelas de Tritón X-100 al 0,4% v/v y *sn*-3-fosfatidilcolina al 0,25% m/v como sustrato. En esta prueba, 20 µl de una solución con 500, 250, 125 y 62,5 ng de la PLA₂ ácida en agua se adicionaron a 1 ml de sustrato en una cubeta termorregulada a 30 °C y después de un período de estabilización de 20s, el descenso en la absorbancia a 558 nm se monitoreó continuamente por 2 minutos. Una unidad de actividad de PLA₂ se definió como el cambio de 0,001 en absorbancia por minuto.

Los resultados obtenidos con el método de Araújo *et al.*, se confirmaron mediante el método de Dole para la actividad fosfolipasa (Dole, 1956). En este método se agregan 0,1 ml de la solución cuya actividad fosfolipasa se quiere medir a 1 ml de sustrato de yema de huevo (yema de huevo diluida 1:5 con amortiguador Tris-HCl 0,1M con CaCl₂ 0,01M a pH 8,5. A toda esta solución se le agrega Tritón X-100 al 1% final). Se incuba por 15 minutos a 37 °C. Se agrega 5 ml de mezcla de extracción (80 ml isopropanol + 20 ml de heptano + 55 µl de H₂SO₄ concentrado) y se agita fuertemente. Se espera 10 min a temperatura ambiente, se agrega 2 ml de heptano a cada tubo y luego 3 ml de agua a cada tubo y se invierte la mezcla 3 veces. Se toman 2 ml de la fase

superior y se pasan a un tubo limpio. Luego se agrega 1 ml de la mezcla de titulación (10 ml de azul de timol 0,1% en agua y 90 ml de etanol al 99%) y se titula con NaOH 0,018 N (72 mg NaOH por cada 100 ml de agua) hasta viraje a amarillo verdoso. Con base en esto se calculan los μEq de ácidos grasos generados con base en el NaOH, por unidad de tiempo y masa de enzima.

8. Actividad anticoagulante

Para la determinación de la actividad anticoagulante, se utilizó plasma humano anticoagulado con citrato de sodio a 3,8 g/dl. Se agregó 0,2 ml de plasma a tubos de vidrio y se incubó durante 5 minutos en un baño de agua a 37 °C. Luego se agregó 50 μl de una solución de 40 μg de BaspPLA₂-II disuelta en solución salina amortiguada (PBS, pH 7,4) y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. También se hizo lo mismo con una solución de 10 μg de Miotoxina I de *B. asper*. Los tubos control contenían plasma incubado solamente con PBS. Posteriormente, 50 μl de una solución de 0,25M de CaCl₂ se adicionó a los tubos y se determinó el tiempo de coagulación.

9. Actividad anti-agregante plaquetaria

El plasma humano fresco rico en plaquetas se preparó por centrifugación de la sangre a partir de voluntarios sanos, a 135 g durante 15 minutos. Alícuotas de 450 μl de esta preparación se incubaron con la PLA₂ ácida en una relación de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma por 2 minutos a 37 °C. Luego, se inició la agregación plaquetaria mediante la adición de 5 μl de ADP 0,1 mM y se monitoreó mediante el incremento en la señal de transmitancia de la luz usando un agregómetro modelo 530-VS (Chrono-Log Corporation) unido a un graficador. Como blanco, se utilizó 450 μl de plasma pobre en plaquetas, obtenido después de la centrifugación del plasma a 1500 g por 15 minutos. Como control positivo se utilizó 450 μl de plasma rico en plaquetas incubado sólo con ADP (50 μl).

10. Actividad citotóxica

La actividad citotóxica se determinó en células musculares de la línea C₂C₁₂. Para esto, dosis de 2,5; 5; 10; 20 y 40 µg de BaspPLA₂-II se diluyeron en el medio de ensayo (Medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero fetal bovino al 1%) y luego se adicionaron a células que crecieron en placas de 96 hoyos, en un volumen de 100 µl por hoyo. Los controles para el 0 y el 100% de toxicidad consistían en sólo el medio de ensayo para el 0% de toxicidad y en 0,1% de Triton X-100 en el medio de ensayo para el 100%. Después de 3 horas a 37 °C, se tomó una alícuota de 40 µl del sobrenadante para la determinación de la actividad de la deshidrogenasa láctica liberada por células dañadas, usando un ensayo cinético (LDH-P Mono, Biocon Diagnostik). Los ensayos se realizaron por duplicado.

11. Actividad letal

Para determinar la actividad letal de BaspPLA₂-II, se inyectaron 4 ratones CD-1 (16-18 g de peso) por vía intravenosa con 100 µg de la toxina disueltos en 100 µl de PBS. Como control, se inyectaron de forma intravenosa 2 ratones con 100 µl de PBS cada uno. Se determinó la mortalidad de los ratones después de 24 horas.

12. Actividad miotóxica

Para la determinación de la actividad miotóxica, se usó un ensayo cinético para la cuantificación de la enzima creatina quinasa (CK; E.C. 2.7.3.2), con el *kit* CK-Nac de Biocon Diagnostik. Se usaron ratones de 18-20 g de peso. Se inyectó a 5 ratones por vía intramuscular, en el gastronemio derecho con 50 µg de BaspPLA₂-II disuelta en 50 µl de PBS. Se inyectó además 50 µl de PBS en 5 ratones como grupo control y a otros 5 ratones se les inyectó con 50 µg de Miotoxina I de *B. asper* en 50 µl de PBS. Después de

3 horas, se recogió aproximadamente 25 μ l de sangre de la cola de los ratones utilizando capilares heparinizados. Estos capilares se centrifugaron en una centrífuga para tubos de microhematocrito, con el objetivo de obtener el plasma. La actividad CK se determinó usando 4 μ l de plasma, los cuales se incubaron por 3 minutos a 37 °C con 1 ml del reactivo, de acuerdo con el protocolo especificado en el *kit*. La actividad se expresó en U/L.

Para el análisis histológico de la miotoxicidad, se sacrificaron todos los ratones mediante inhalación de dióxido de carbono y se tomaron muestras del gastronemio derecho de los ratones de ambos grupos. Todas las muestras se mantuvieron durante 72 horas en una solución de formalina al 3,7% en agua. Posteriormente, se sometieron a deshidratación en soluciones de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% etanol. Una vez deshidratadas, las muestras se pasaron a una solución de xilol al 100%. Después se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 4 μ m. Las secciones se pusieron en un portaobjetos, se eliminó la parafina al ponerlas sucesivamente en xilol 100%, etanol al 100%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50%, hasta finalizar con 100% agua. Por último se sometieron a tinción con Hematoxilina y Eosina.

13. Análisis histológico de la toxicidad sistémica de BaspPLA₂-II:

Para el análisis histológico de la toxicidad sistémica de BaspPLA₂-II, se inyectaron 2 ratones por vía intravenosa con 100 μ g de la toxina disueltos en 100 μ l de PBS. Como control, se inyectaron por la misma vía 2 ratones con 100 μ l de PBS cada uno. Se utilizaron ratones con un peso de 16-18 g. Se tomaron muestras de hígado, pulmón, corazón y riñón de todos los ratones después de 24 horas, una vez que se sacrificaron mediante la inhalación de dióxido de carbono. Todas las muestras se mantuvieron durante 72 horas en una solución de formalina al 3,7%. Posteriormente, se sometieron al mismo tratamiento descrito para el análisis histológico de la miotoxicidad.

14. Actividad edematizante

La determinación de la actividad edematizante se realizó en ratones de 18-20 g. Se inyectó 10 μg de la fosfolipasa ácida disueltos en 50 μl de PBS en la almohadilla plantar de 4 ratones. Como grupo control se utilizaron 4 ratones que se inyectaron con 50 μl de PBS. El grosor de las patas se determinó utilizando un calíper (Oditest). Se midió en ambos grupos el grosor de las patas, previo a la inyección de PBS ó PLA₂, para determinar el porcentaje de edema en los 2 grupos a los 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos.

15. Actividad hipotensora

Para la medición de esta actividad, se utilizó el equipo CODA[®] (Kent Scientific Corporation). Este equipo permite determinar la presión arterial al medir el volumen sanguíneo en la cola mediante la cuantificación de la presión diferencial. Se utilizaron ratones de 18-20 g de peso que se inyectaron por la vía intravenosa. La presión arterial se determinó antes de inyectar a cada ratón y a los 5, 30 y 60 minutos posterior a la inyección. Un ratón se inyectó con 25 μg de la PLA₂ ácida disuelta en 100 μl de PBS. Un grupo de 5 ratones se inyectó con 10 μg de la PLA₂ ácida disuelta en 100 μl de PBS. Otro grupo de 5 ratones se inyectó con 4 μg de veneno de *B. asper* en 100 μl de PBS. Como grupo control, 5 ratones se inyectaron con 100 μl de PBS.

16. Preparación de anticuerpos contra la fosfolipasa ácida:

Los anticuerpos contra BaspPLA₂-II se prepararon mediante la inmunización de dos conejos, uno por vía intramuscular (conejo 1) y otro por vía subcutánea (conejo 2), con la enzima purificada. Se utilizó el siguiente esquema de inmunización para ambos conejos (Cuadro 3):

Cuadro 3. Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos
contra la PLA₂ ácida

Semana	Fecha	Dosis (µg)	Adyuvante
1	28/8/08	100	Freund completo
5	6/10/08	50	Freund incompleto
10	7/11/08	50	Freund incompleto

Se obtuvo 20 ml de sangre de ambos conejos en la semana 12 y se guardaron alícuotas del suero a -20°C.

17. Estudios inmunoquímicos con BaspPLA₂-II

Para los estudios inmunoquímicos se utilizó suero antiofidico polivalente (Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica), un antisuero producido en conejo contra la miotoxina I de *Bothrops asper* (Lomonte et al., 1987) y el antisuero contra BaspPLA₂-II producido en este trabajo. Con ellos se determinó la presencia de anticuerpos contra BaspPLA₂-II en el suero antiofidico polivalente y en el suero producido en los conejos, mediante una doble inmunodifusión en gel (Ouchterlony y Nilsson, 1978), mediante un ELISA y mediante Western Blot. También se determinó la reactividad cruzada entre la PLA₂ ácida y la miotoxina I mediante una doble inmunodifusión en gel y mediante un ELISA. La doble inmunodifusión se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% en PBS. Se

cargó 30 µl/pocillo de suero sin diluir, enzimas (0,2 mg/ml) o veneno crudo (2 mg/ml) y se leyó después de 24 horas.

Para el ELISA, 0,2 µg/pocillo de enzimas (BaspPLA₂-II o Miotoxina I) se adsorbieron en microplacas de acuerdo con Lomonte *et al.*, 1991. Una vez que se lavaron y se bloquearon los sitios libres con PBS que contenía 1% de albúmina sérica bovina, se agregaron distintas diluciones de antisuero por triplicado en los pocillos y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con buffer FALC (Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, ZnCl₂ 20 µM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.4), se detectaron los anticuerpos unidos con conjugados anti IgG equina con fosfatasa alcalina o con anti IgG de conejo con fosfatasa alcalina en una dilución de 1:5000. Se usó *p*-nitrofenilfosfato como sustrato. Las absorbancias se midieron a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Multiskan RC microplate reader, Labsystems). Se utilizó suero normal de conejo y equino como controles negativos.

Para el Western Blot, primero se corrió 30 µg del veneno en un gel de poliacrilamida al 15% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora y media a 150 mA, se preñaron con Rojo de Ponceau y se incubaron con 1% de albúmina sérica bovina en PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente, para bloquear sitios libres. Luego las membranas se incubaron con una dilución de 1/1000 en PBS del antisuero (Suero anti- BaspPLA₂-II ó Suero antiofidico Polivalente) o del respectivo suero normal de cada especie por una hora y media a temperatura ambiente. Después se realizaron 5 lavados de 5 minutos con 0,2% albúmina y 0,05% de Tween-20 diluidos en PBS, y las membranas se incubaron por una hora y media a temperatura ambiente con una dilución 1/2000 de anticuerpos anti-IgG de la respectiva especie conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma) y se realizaron otros 5 lavados de 5 minutos con 0,2%

albúmina y 0,05% de Tween-20 diluidos en PBS. Se utilizó como sustrato de la fosfatasa alcalina el reactivo BCIP-NBT (Chemicon).

18. Neutralización de la actividad fosfolipasa de BaspPLA₂-II por los anticuerpos producidos en conejo contra BaspPLA₂-II y por el suero antiofidico polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado.

La neutralización de la actividad fosfolipasa se realizó mediante la incubación por 30 minutos a 37 °C de BaspPLA₂-II con el suero producido en conejo contra la PLA₂ acídica y con el suero antiofidico polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado en una relación de 4000, 2000, 1000 y 500 ul de suero por mg de la enzima. Posteriormente, a alícuotas que contenían 0,25 µg o 15 µg de la enzima se les midió la actividad fosfolipasa, según se indicó previamente, mediante el ensayo colorimétrico o el titrimétrico, respectivamente. Como control, se midió la actividad enzimática de la misma cantidad de PLA₂ acídica incubada con las mismas proporciones de PBS por mg de BaspPLA₂-II. Los ensayos se realizaron por duplicado.

19. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm D.S. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de dos grupos distintos se analizaron mediante una prueba t de Student, donde se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

1. Purificación de BaspPLA₂-II

Después de pesar 0,5 gramos del veneno crudo de *B. asper* del Pacífico, y de disolverlos en 6 ml de buffer de Acetato de amonio (0,1M; pH=7), se aplicó este volumen en una columna de cromatografía líquida de Carboximetil-Sephadex y se recogió toda la fracción no unida a la columna (Fig 1^a). Al introducir esta fracción en una columna de Dietilaminoetil-Sepharose y aplicar un gradiente lineal de acetato de amonio de 0,1 M a 1 M., se obtuvo el cromatograma de la Figura 1B. Al medir la actividad fosfolipasa de cada una de las fracciones obtenidas por la cromatografía en DEAE-Sepharose, la fracción que mostró la mayor actividad fue la fracción D1. Esta fracción se recogió, se liofilizó y se sometió a cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, Fig 1C). Una vez que se recogió la fracción mayoritaria obtenida a partir del HPLC se liofilizó. Luego se disolvió en 1 ml de buffer de acetato de amonio (0,1M; pH=5) y se aplicó en una columna de cromatografía líquida de Carboximetil-Sephadex. Se recogió toda la fracción no unida a la columna y se liofilizó. Se realizó una corrida electroforética de esta fracción en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% en condiciones reductoras, para evaluar la pureza de la enzima (Fig 1D).

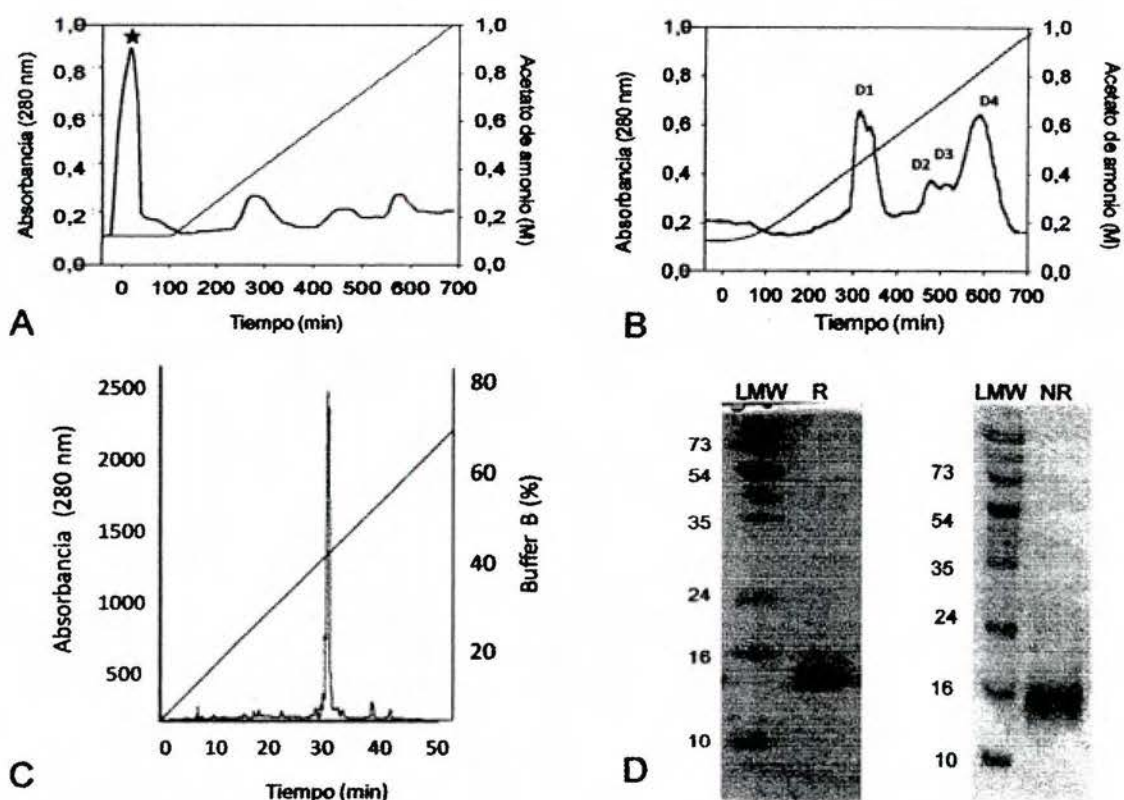


Figura 1. Aislamiento de BaspPLA₂. **(A)** Fraccionamiento del veneno crudo de *B. asper* en una columna de CMS a pH 7, eluida con acetato de amonio (0,1-1M) de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. La fracción no unida (estrella) se sometió a una cromatografía líquida en DEAE-Sepharose **(B)** con un gradiente idéntico al de **(A)**. La fracción D1 se purificó todavía más usando RP-HPLC **(C)**, utilizando una columna C8 semi-preparativa, en un gradiente lineal de 100% buffer A y 0% buffer B inicialmente, hasta 30% buffer A y 70% buffer B, en 55 minutos. En **(D)** se observa la corrida electroforética en un gel SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras, de BaspPLA₂-II. (LMW: marcadores de peso molecular).

2. Determinación del punto isoeléctrico de BaspPLA₂-II₂:

El punto isoeléctrico esperado según la base de datos de ExPASy (<http://www.expasy.ch/>), al introducir la secuencia de aminoácidos obtenida, fue de 5.05. El punto isoeléctrico de la PLA₂ ácida obtenido al realizar un isoelectroenfoque con el Multiphor II fue de 4,9.

3. Determinación de la masa molecular de la BaspPLA₂-II

La masa molecular de la PLA₂, determinada por espectrometría de masas por ionización en electrospray, es de 14212 +/- 6 Da (figura 2).

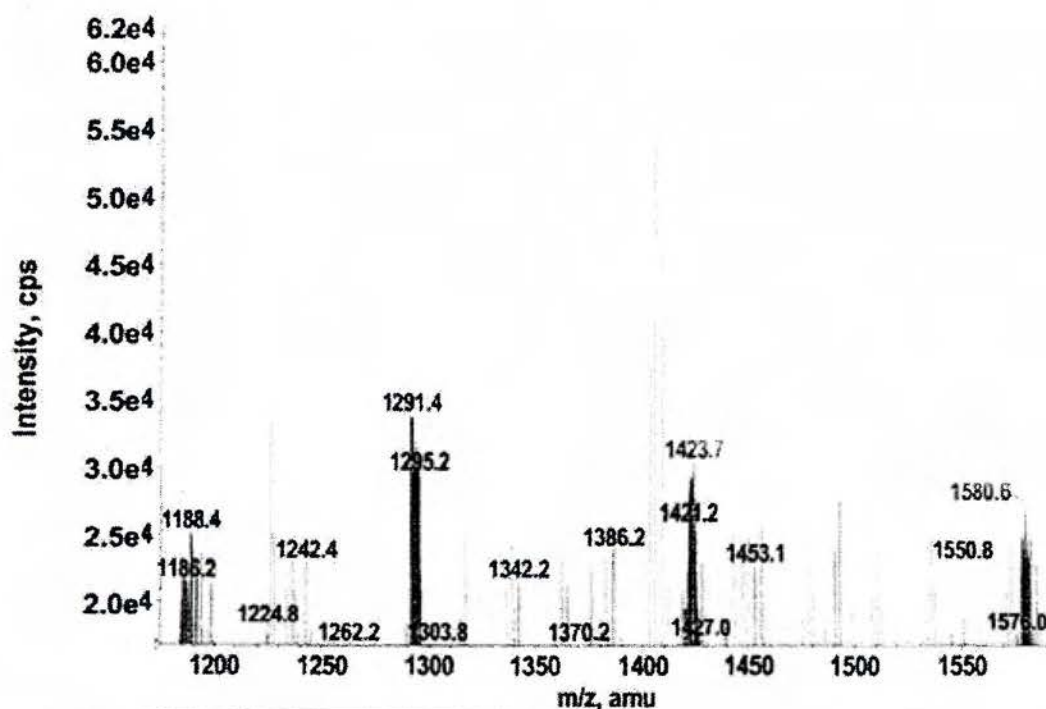


Figura 2. Espectro utilizado para obtener la masa molecular de BaspPLA₂-II, por espectrometría de masas por ionización en electrospray (Modo Enhanced Multi Charge)

4. Determinación de la secuencia de aminoácidos de BaspPLA₂-II:

La secuenciación N-terminal logró determinar la identidad de los primeros 45 aminoácidos de la PLA₂ acídica.

Al digerir la proteína con bromuro de cianógeno y separar los péptidos por HPLC, se obtuvo el siguiente cromatograma (figura 3):

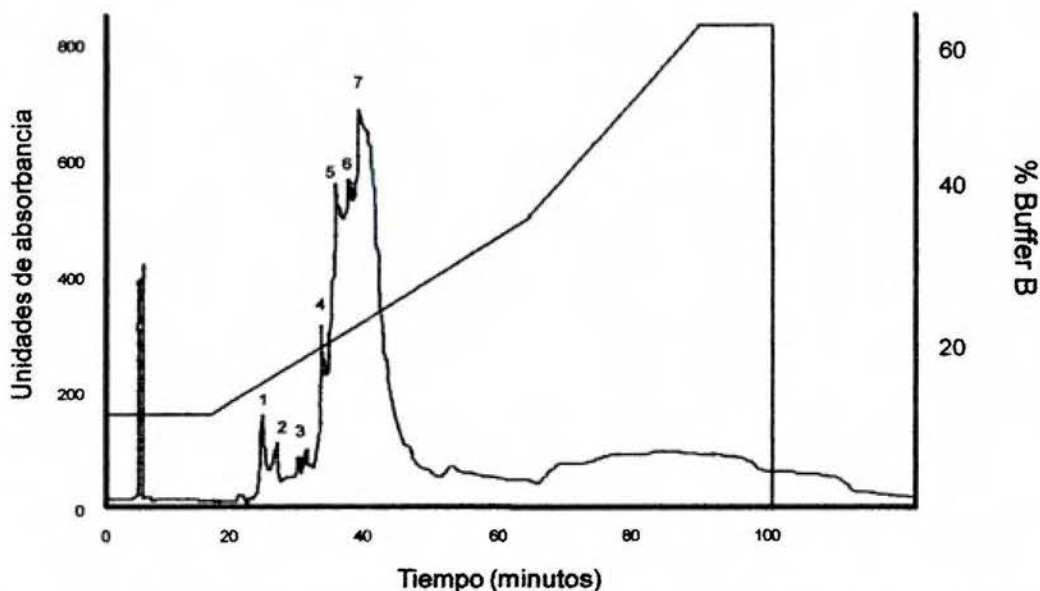


Figura 3. Péptidos separados por RP-HPLC después de la digestión de BaspPLA₂-II con bromuro de cianógeno usando una columna analítica C18 y un gradiente lineal de 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (solución A) y acetonitrilo (solución B). Se usó 5% B por 10 minutos, seguido de 5-15% B durante 20 minutos, 15-45% B durante 120 minutos y 45-70% de B durante 20 minutos.

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de los fragmentos CNBr-3, CNBr-5, CNBr-6, CNBr-7. La secuencia obtenida al juntar la del extremo amino terminal de la proteína con las secuencias de los fragmentos digeridos con bromuro de cianógeno y las secuencias de espectrometría de masas en tándem fue la siguiente (Figura 4):

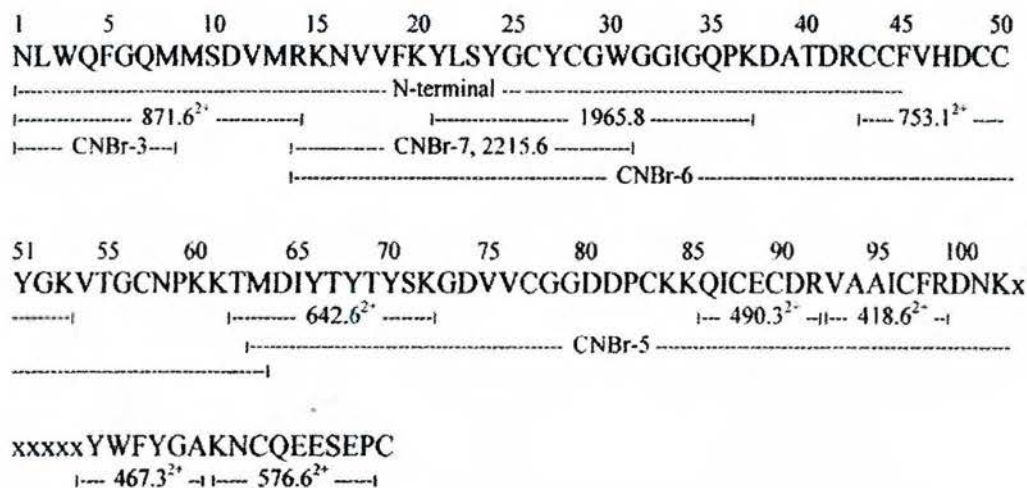


Figura 4. Secuencia parcial de BaspPLA₂-II obtenida de la secuencia N-terminal de la proteína, las de los fragmentos digeridos con bromuro de cianógeno y la de espectrometría de masas en tándem.

La secuencia se completó mediante el clonaje de la PLA₂ ácida.

Determinación de la secuencia de BaspPLA₂-II mediante su clonaje

Después de realizar la 3' RACE-PCR a partir del ARN total de las glándulas de veneno de *B. asper*, se obtuvo el siguiente resultado (Figura 5):

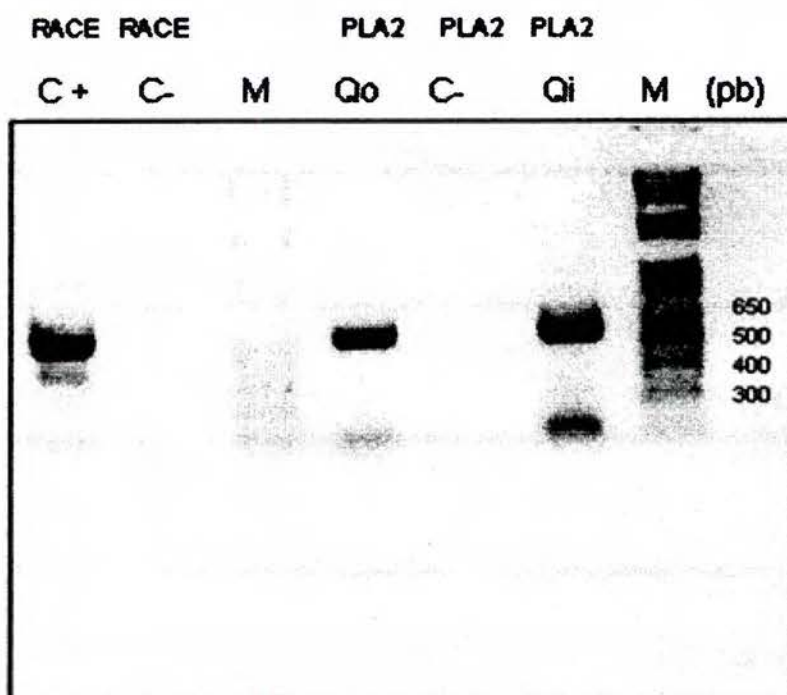


Figura 5. Resultados de la 3' RACE-PCR para la secuencia de BaspPLA₂-II (RACE C+ y RACE C-: Control positivo y Control negativo del kit, M: marcadores de peso molecular, PLA₂ Qo y Qi: PCR con el “Gene specific primer” y el “outer primer” (Qo) ó “inner primer” (Qi), PLA₂ C-: PCR sin el “Gene specific primer” y con Qo)

En la figura 5 se observa tanto en el carril de PLA₂ Qo como en el de PLA₂ Qi, un producto de alrededor de 500 pares de bases que correspondió al ADNc con la secuencia de la PLA₂ ácida. Una vez que se ligó el ADNc de la PLA₂ ácida al vector pGEM-T y que se introdujo este vector en bacterias *E. coli* DH5 α , se realizó una PCR para detectar cuáles colonias habían incorporado el vector con la secuencia de la PLA₂ ácida (Figura 6).



Figura 6. PCR para detectar la presencia del vector pGEM-T con la secuencia de la PLA₂ ácida en las colonias de bacterias *E. coli* DH5 α .

Las colonias que incorporaron este vector (colonias 1 y 17) se cultivaron y posteriormente se les extrajo el vector para secuenciar la PLA₂. La secuencia de aminoácidos obtenida mediante biología molecular se observa en la figura 7. En esta figura además se compara la secuencia obtenida mediante biología molecular con la secuencia obtenida por técnicas de proteómica:

1 5 10 15 20 25
 NLW Q F G Q M M S D V M R K N V V F K Y L S Y G C Y C G
N L W Q F G Q M M S D V M R K N V V F K Y L S Y G C Y C G

30 35 40 45 50 55
 W G G I G Q P K D A T D R C C F V H D C C Y G K V T G C D P
W G G I G Q P K D A T D R C C F V H D C C Y G K V T G C N P

60 65 70 75 80 85
 K M D I Y T Y T Y S K E N G D V V C G G D D P C K K Q I C E
K M D I Y T Y T Y S K X X G D V V C G G D D P C K K Q I C E

90 95 100 105 110 115
 C D R V A A I C F R D N K D T Y D S K Y W F Y G A K N C Q E
C D R V A A I C F R D N K X X X X X Y W F Y G A K N C Q E

120
 D S E P C
E S E P C

Figura 7. Comparación de las secuencias obtenidas por biología molecular (arriba) y por técnicas de proteómica (abajo y en itálica) para BaspPLA₂-II. La letra X indica que no se obtuvo la identidad del aminoácido correspondiente. El color gris indica las diferencias entre ambas secuencias

En la figura 8 se observa la secuencia completa final de BaspPLA₂-II:

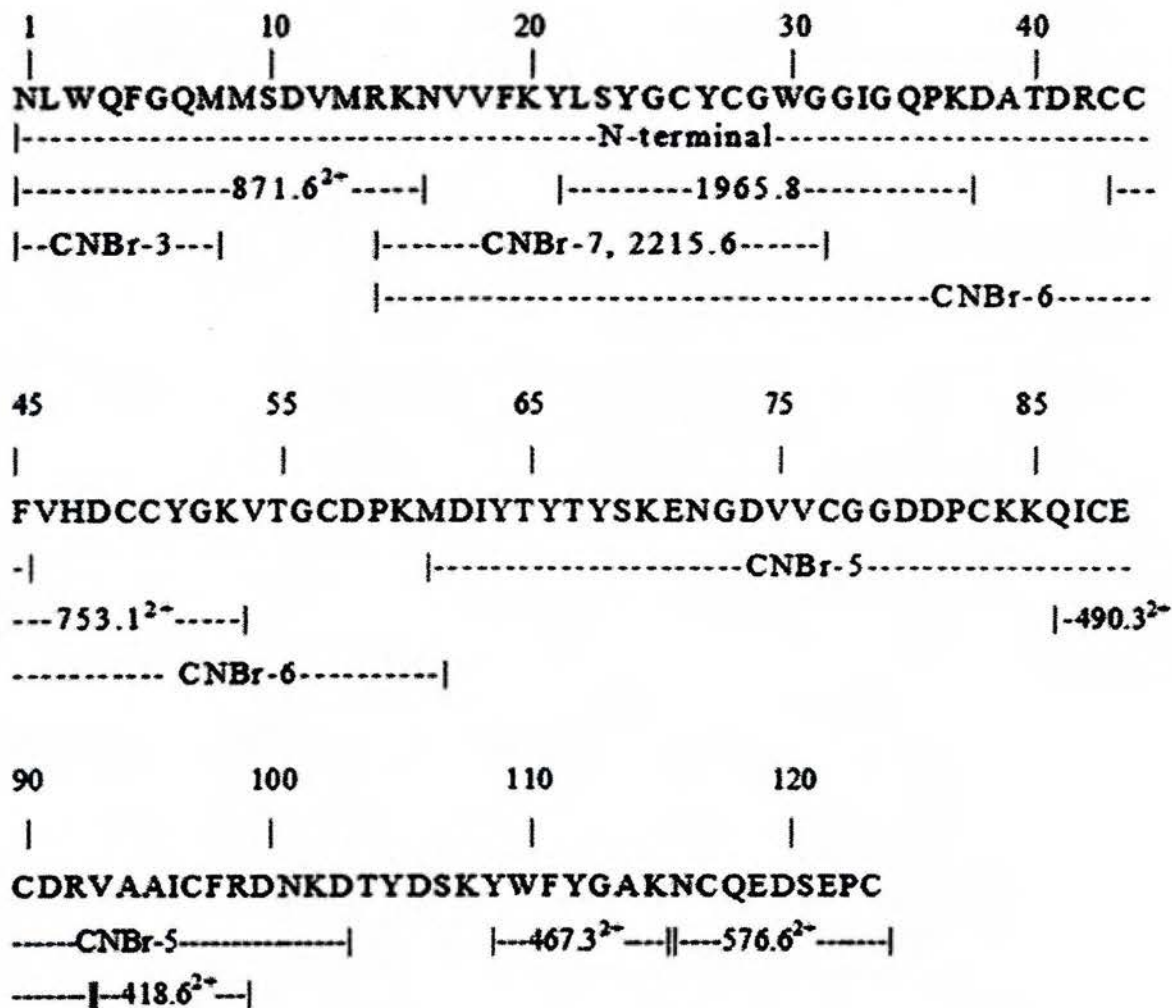


Figura 8. Secuencia completa de la PLA₂ ácida obtenida por técnicas de biología molecular y de proteómica

Con la secuencia completa de BaspPLA₂-II se realizó un alineamiento múltiple de secuencias y un árbol de relaciones filogenéticas, que se muestran en las figuras 9 y 10 respectivamente.

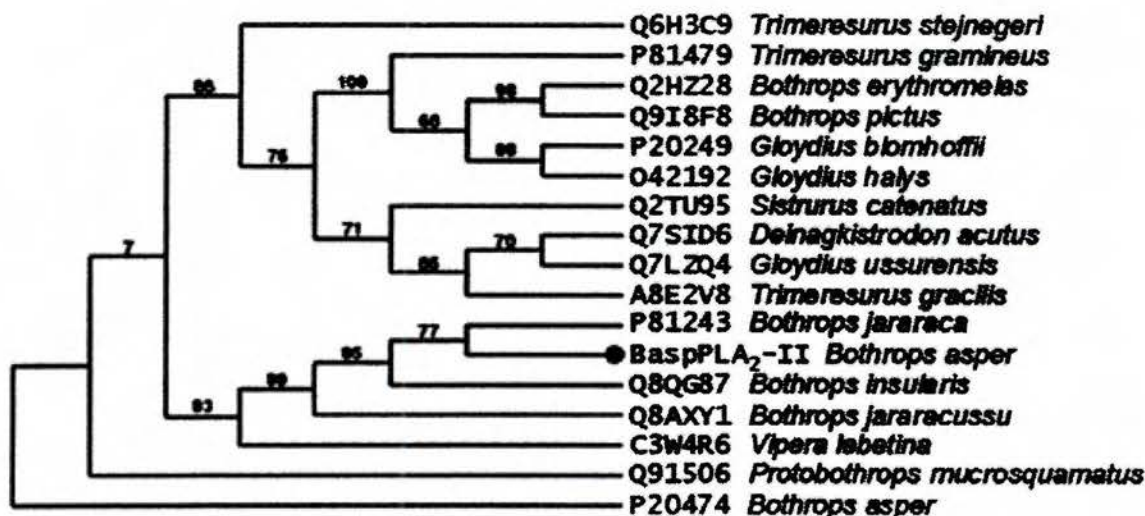


Figura 10. Relaciones filogenéticas de BaspPLA₂-II con otras fosfolipasas A₂ de venenos de serpiente. Los códigos de las proteínas corresponden a los de la base de datos UniProtKB. El cladograma se calculó utilizando el método de máxima verosimilitud, implementado en el programa PhyML, y representado gráficamente con TreeDyn. Los valores de apoyo para las ramas se indican como porcentajes. Además de todas las proteínas alineadas en la Figura 11, una PLA₂ básica de *B. asper* (P20474, Miotoxina I) y una PLA₂ acídica de un Vipérido no Crotalineo (C3W4R6 de *Vipera lebetina*) fueron incluidos como grupos externos.

5. Modelaje molecular

Una vez que se obtuvo la secuencia completa de BaspPLA₂-II, también se realizó el modelaje molecular, que se observa en la figura 11.

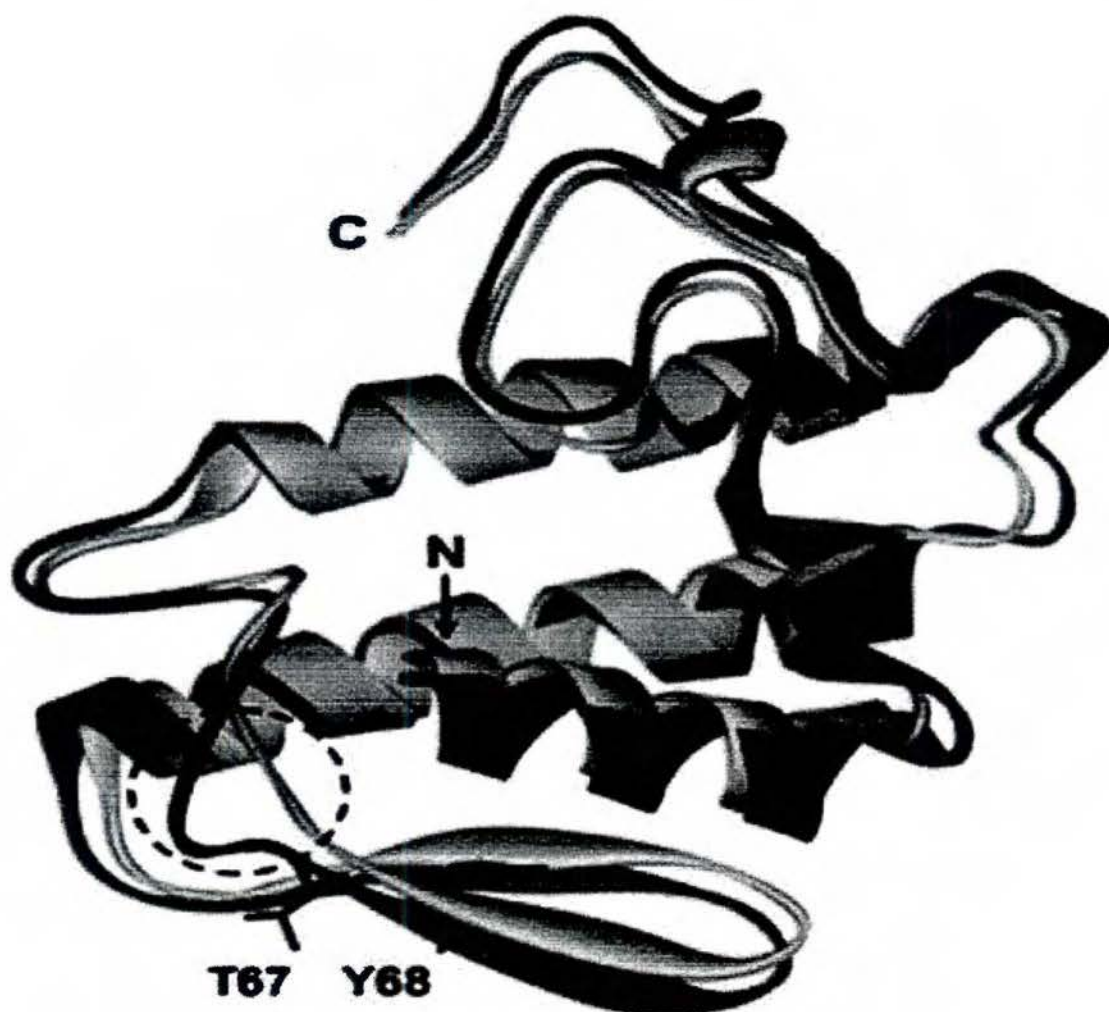


Figura 11. Modelo tridimensional de BaspPLA₂-II (gris oscuro), superpuesta con la estructura cristalizada de la PLA₂ ácida de *B. jararacussu* (código PDB 1ZL7, de color gris claro). Se marcan los extremos N-y C-terminales. Las cadenas laterales de los aminoácidos T67 y Y68 de BaspPLA₂-II se muestran en gris oscuro. El círculo destaca la gran desviación en el segmento de 62-65, justo antes de la región del ala β , que sobresale en comparación con la estructura de la proteína de *B. jararacussu*.

6. Actividad enzimática

En la figura 12 se observa la actividad PLA₂ de la fosfolipasa ácida de *B. asper*, en comparación con la actividad enzimática de la Miotoxina I de *B. asper*.

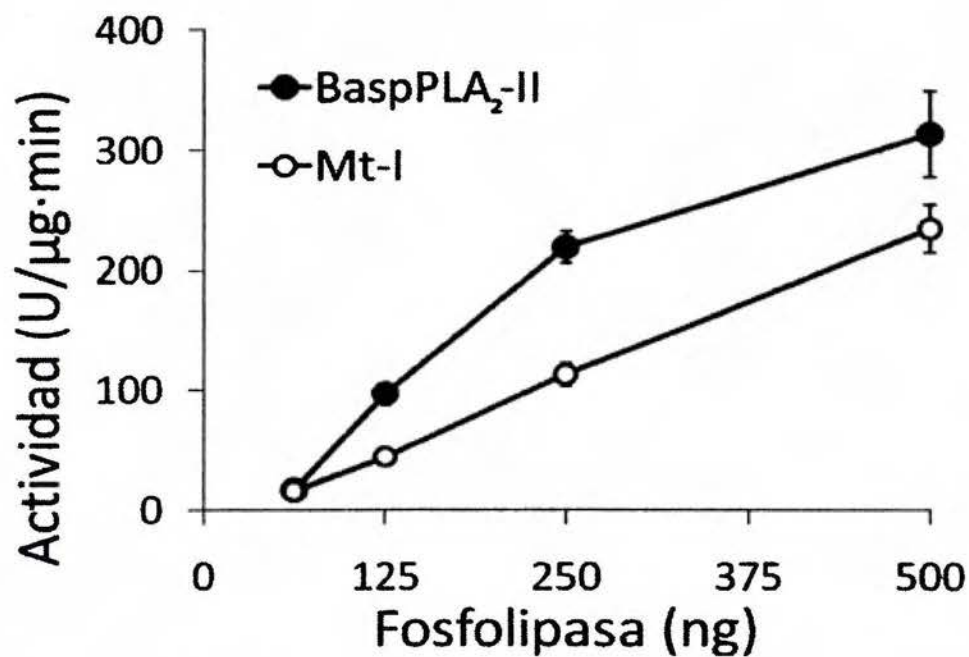


Figura 12. Actividad enzimática de la PLA₂ ácida de *B. asper* y de la Miotoxina I de *B. asper* sobre micelas de fosfatidilcolina. (●) es BaspPLA₂-II y (○) es la Miotoxina I.

Cada punto corresponde a la media ± D.S.

7. Actividad anticoagulante

Se determinó que BaspPLA₂-II no presenta actividad anticoagulante hasta dosis de 40 µg. Se observa claramente que la Miotoxina I de *B. asper* presenta actividad anticoagulante con una dosis mucho menor: 10 µg (Ver figura 13).

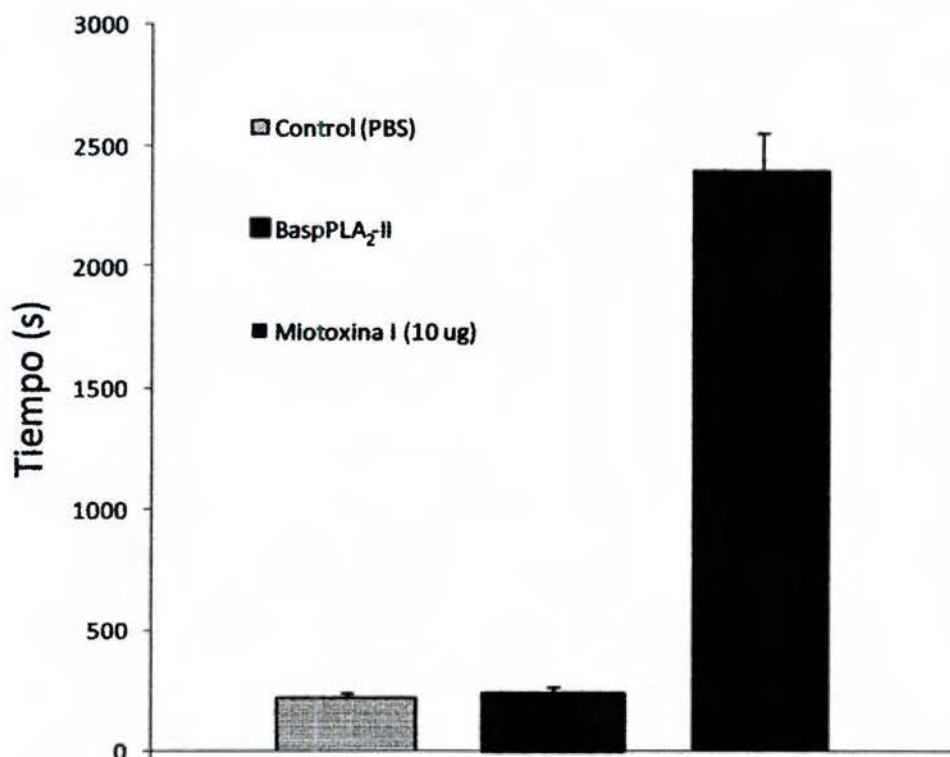


Figura 13. Medición de la actividad anticoagulante de 40 µg de BaspPLA₂-II y de 10 µg de la Miotoxina I de *Bothrops asper* sobre plasma humano citratado.

Cada punto muestra la media ±D.S de triplicados.

8. Actividad anti-agregante plaquetaria

La PLA₂ acídica no presentó actividad anti-agregante plaquetaria hasta dosis de 20 µg/ml. (Ver Figura 14).

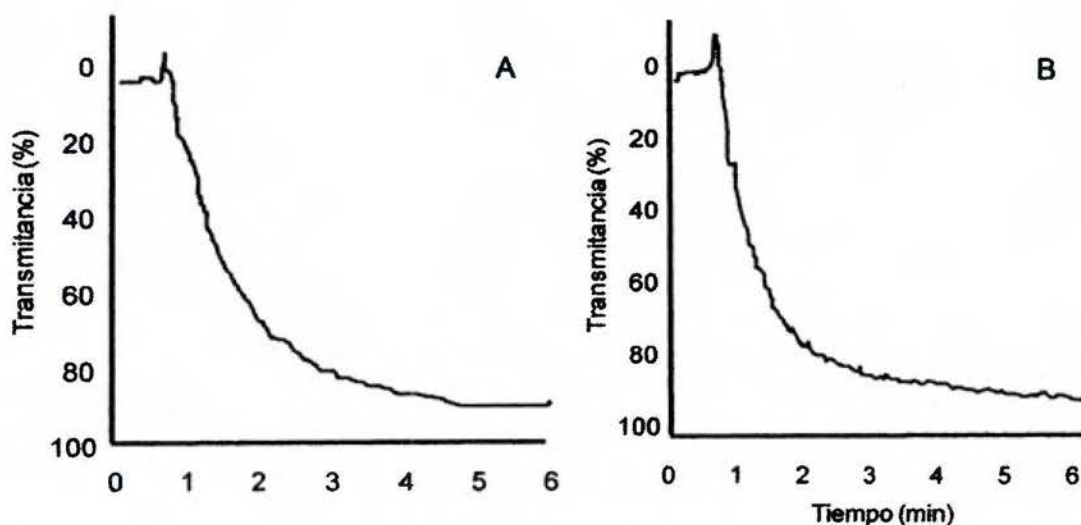


Figura 14. Ausencia del efecto anti-agregante plaquetario de BaspPLA₂-II. En **A** se observa el plasma control que fue incubado con PBS y en **B** se observa el gráfico obtenido con 20 µg de BaspPLA₂-II /ml de plasma rico en plaquetas. La agregación plaquetaria fue inducida mediante la adición de 5 µl de ADP 0,1 mM.

9. Actividad citotóxica

Según se observa en la figura 16 A, la PLA₂ acídica no presentó actividad citotóxica *in vitro* hasta dosis de 40 µg/pocillo, de acuerdo con la liberación de LDH por las células. Esto contrasta con lo observado con la Miotoxina II en las mismas condiciones. En la figura 15 se observan las células después de someterlas a una dosis de 20 µg de PLA₂ acídica y 20 µg de miotoxina I de *B. asper*.

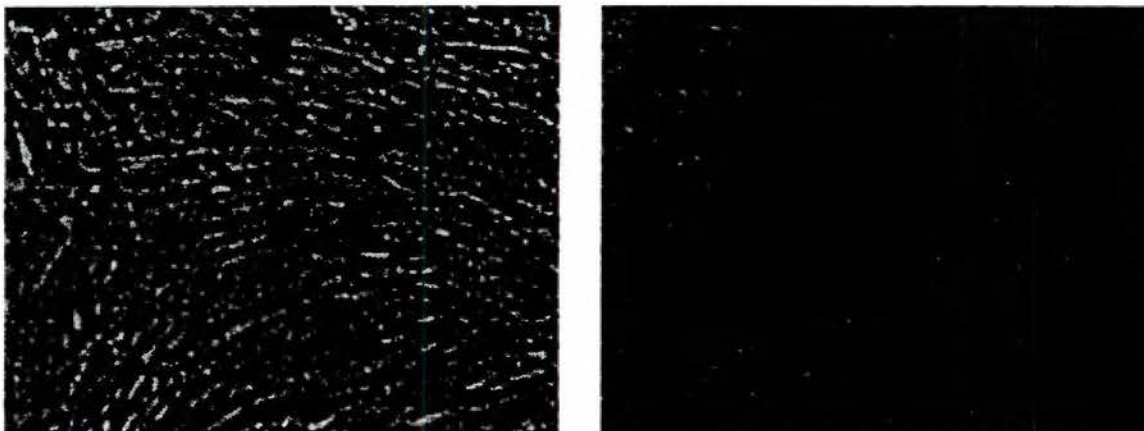


Figura 15. Células musculares C2C12 después de que se sometieron a una dosis de 20 μg de BaspPLA₂-II (izq) y de 20 μg de mitorxina I de *B. asper* (der) .

10. Actividad letal

Se determinó que la dosis de 100 μg de BaspPLA₂-II no fue letal a las 24 horas para ninguno de los 4 ratones. Se observó un efecto letárgico únicamente en los primeros 30 minutos en los 4 ratones inyectados con la fosfolipasa ácida.

11. Actividad miotóxica

En la figura 16 B y 16 D se observan los resultados que se obtuvieron al inyectar a BaspPLA₂-II en el gastronemio derecho de los grupos de ratones. Se observa claramente que esta PLA₂ no tiene actividad miotóxica. Además de los datos de la actividad CK del plasma, se obtuvo muestras del gastronemio de los ratones de ambos grupos para ver si se observaba mionecrosis mediante histología en los ratones inyectados con la PLA₂ ácida. Según se observa en la figura 16 D, no se encontró mionecrosis en estos ratones, lo que concuerda con los datos de la actividad CK.

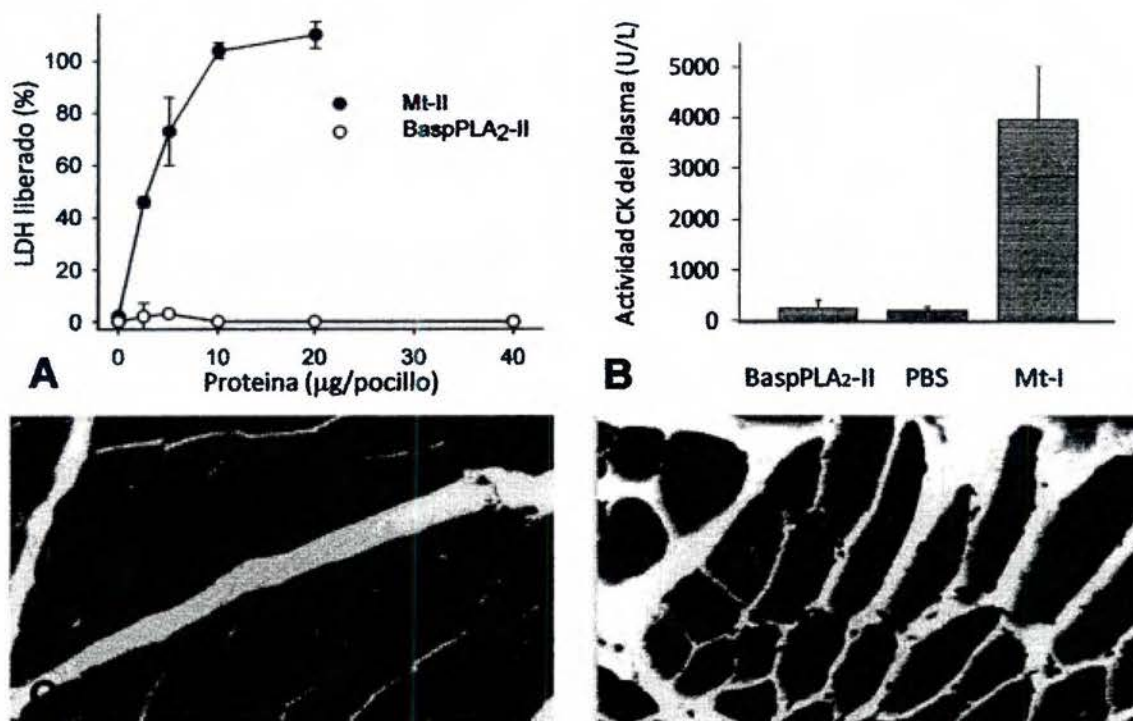


Figura 16. En A se observa la falta de actividad citotóxica de BaspPLA₂-II, en contraste con la actividad citotóxica de la Miotoxina II de *Bothrops asper*, sobre células musculares C2C12. Cada punto corresponde a la media \pm D.S. En B se observa la actividad CK después de 3 horas de la inyección intramuscular de 50 μ l de BaspPLA₂-II (1 μ g/ μ l), de la misma cantidad de Miotoxina I de *B. asper* y de 50 μ l de PBS en ratones. En C se observa la evaluación histológica del gastronemio de ratones, después de 24 horas de ser inyectados intramuscularmente con PBS y en D después de 24 horas de ser inyectados intramuscularmente con 50 μ g de la PLA₂ ácida.

12. Análisis histológico de la toxicidad sistémica de BaspPLA₂-II

El análisis histológico de hígado, pulmón, corazón y riñón no mostró diferencias entre el grupo de ratones inyectados con la PLA₂ ácida y el grupo inyectado con PBS, según se observa en la figura 17.

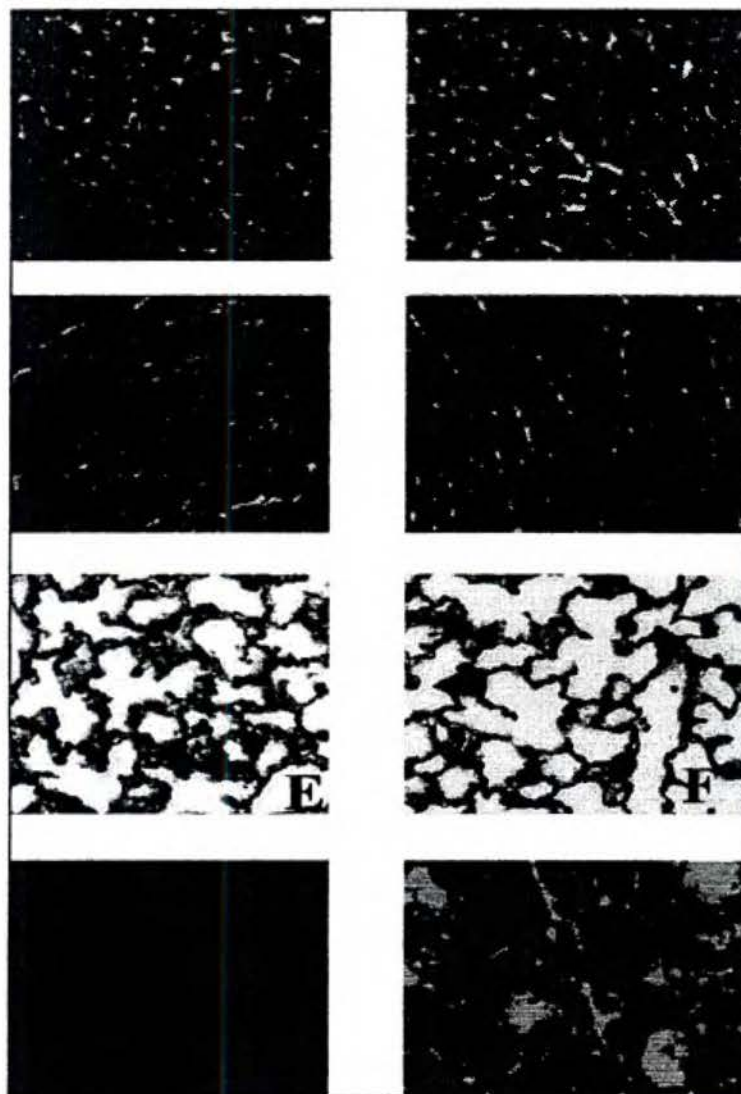


Figura 17. Análisis histológico de la toxicidad sistémica de la PLA₂ acídica.

En **A** y **B** se observa el efecto en hígado en ratones inyectados con
PLA₂ acídica (**A**) y en ratones inyectados con PBS (**B**)

En **C** y **D** se observa el efecto en corazón, PLA₂ acídica (**C**) y PBS (**D**)

En **E** y **F** se observa el efecto en pulmón, PLA₂ acídica (**E**) y PBS (**F**)

En **G** y **H** se observa el efecto en riñón, PLA₂ acídica (**G**) y PBS (**H**)

13. Actividad edematizante

En la figura 18 se observan los resultados del experimento para determinar la actividad edematizante de la PLA₂ ácida. Se observa que la PLA₂ ácida posee actividad edematizante, al compararla con la inyección con sólo PBS. El mayor porcentaje de edema se presentó a los 30 minutos.

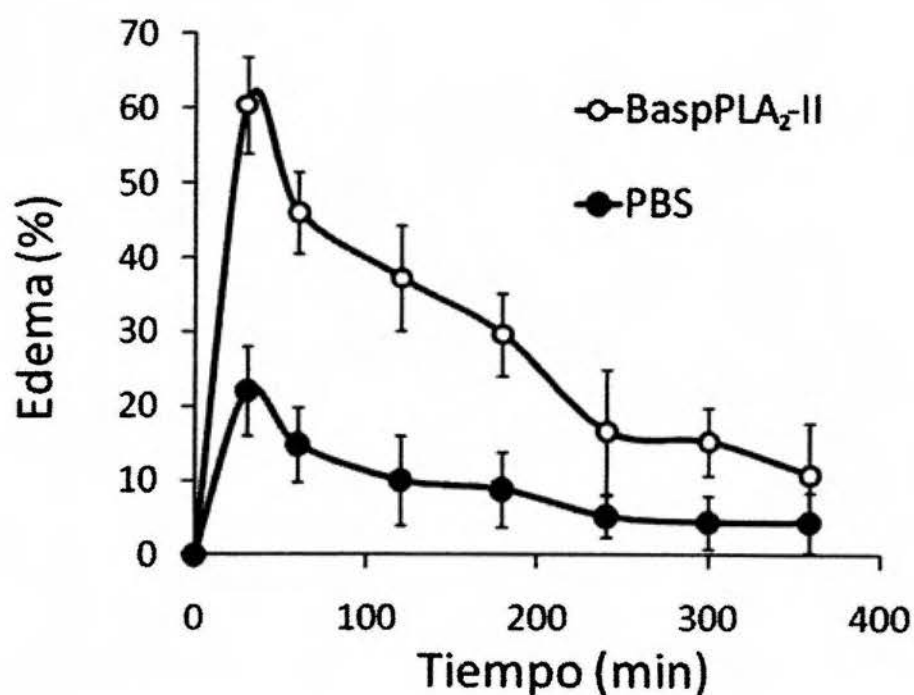


Figura 18. Actividad edematizante de BaspPLA₂-II en ratones inyectados con 10 µg de la PLA₂ ácida disueltos en 50 µl de PBS, frente a ratones inyectados solamente con 50 µl de PBS. Cada punto corresponde a la media ± D.S de 4 animales.

14. Actividad hipotensora

BaspPLA₂-II no presentó actividad hipotensora tanto para el ratón inyectado con 25 µg como para los ratones inyectados con 10 µg (Ver figura 19). El grupo de ratones inyectado con 4 µg de veneno de *B. asper* del Pacífico sí presentó hipotensión significativa a los 5 minutos de la inyección con respecto a los ratones inyectados con PBS ó con 10 µg de la PLA₂ ácida ($p < 0,05$ en ambos casos).

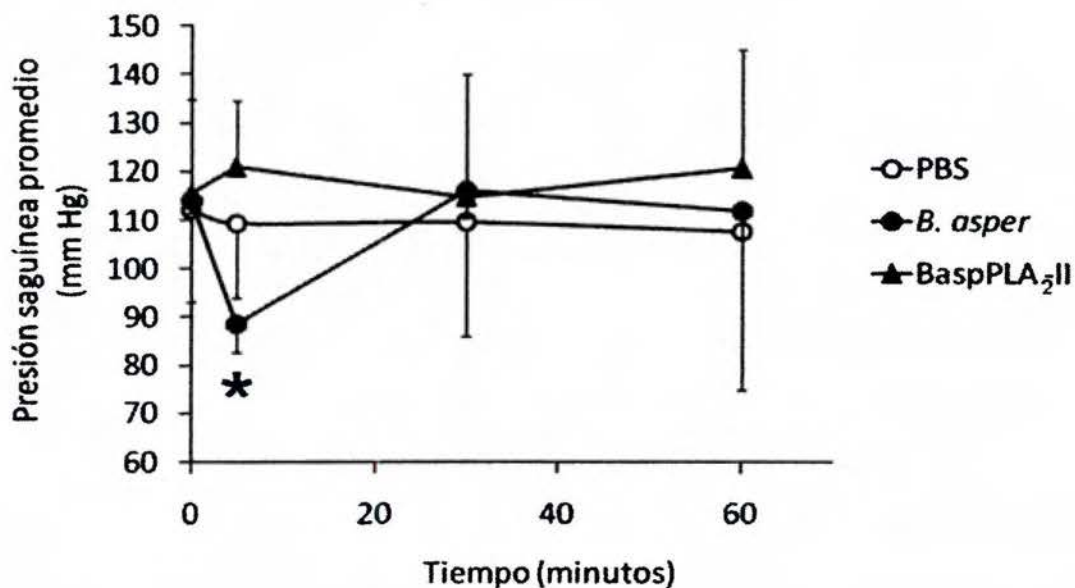


Figura 19. Medición de la presión arterial de un grupo de ratones inyectado de forma intravenosa con 10 µg de la PLA₂ ácida, otro con 4 µg del veneno completo de *B. asper* y otro con 100 µl de PBS. Se midió la presión arterial antes de la inyección (tiempo 0), a los 5 minutos, a los 30 minutos y a los 60 minutos. La presión arterial en cada punto corresponde al promedio de 5 ratones \pm S.D. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

15. Preparación de anticuerpos contra BaspPLA₂-II:

Después de inmunizar ambos conejos con la PLA₂ acídica, se evaluó la presencia de anticuerpos contra la PLA₂ en ambos conejos mediante una doble inmunodifusión en gel (Figura 20 A), un Western Blot (Figura 20 B) y un ELISA (Figura 20 C). Estos experimentos demostraron la presencia de anticuerpos contra la PLA₂ acídica. Además, en la Figura 20 C, se observan los resultados del ELISA para evaluar la reactividad cruzada entre BaspPLA₂-II y la Miotoxina I. Este ELISA muestra que la reactividad cruzada entre ambas enzimas es sumamente baja.

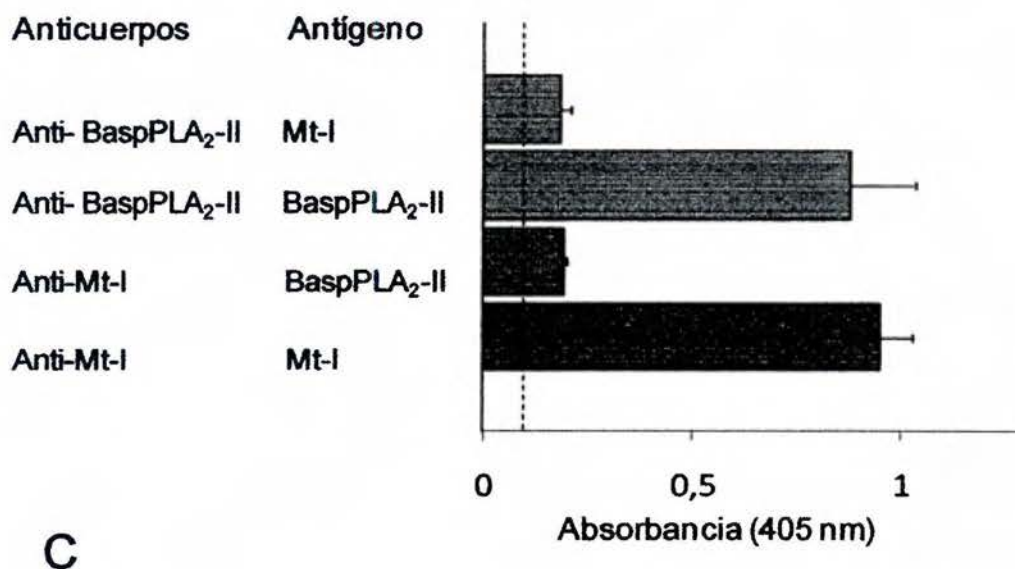
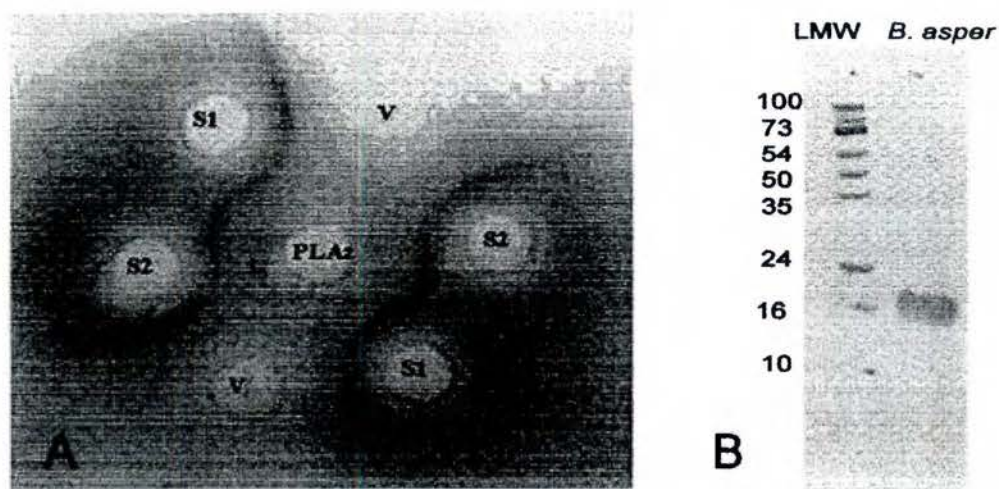


Figura 20. Presencia de anticuerpos contra BaspPLA₂-II. **A** Doble inmunodifusión para detectar la presencia de anticuerpos en el suero de conejos inmunizados (PLA₂: 30 ul de BaspPLA₂-II a 0,2 mg/ml. S1: 50 ul del suero del conejo 1. S2: 50 ul del suero del conejo 2. V: 30 ul de veneno de *B. asper* a 2 mg/ml). **B.** Western Blot para detectar la presencia de anticuerpos contra la PLA₂ ácida en el suero de los conejos inmunizados, usando 30 µg del veneno completo de *B. asper* del Pacífico. **C.** ELISA para evaluar la reactividad cruzada entre la Miotoxina I (Mt-I) y BaspPLA₂-II. (Dilución de los sueros: 1:900). La línea punteada muestra el valor de la absorbancia obtenido con suero normal de conejo.

16. Estudios Inmunoquímicos

En la Figura 21 A se observa el título de anticuerpos contra la PLA₂ ácida en el suero antiofídico polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado y se compara con el título contra la Miotoxina I de *B. asper* usando el mismo suero antiofídico. Se observa que ambos títulos son muy similares. En las figuras 21B y 21C se observa el resultado de la neutralización de la actividad enzimática de la PLA₂ ácida por suero antiofídico polivalente y por el suero anti-PLA₂ ácida producido en conejo por la vía subcutánea. Se obtuvo tanto por el método de Dole como por el método colorimétrico que el Suero Antiofídico Polivalente neutralizó parcialmente la actividad enzimática de BasPPLA₂-II, mientras que el suero anti-BaspPLA₂-II no neutralizó esta actividad.

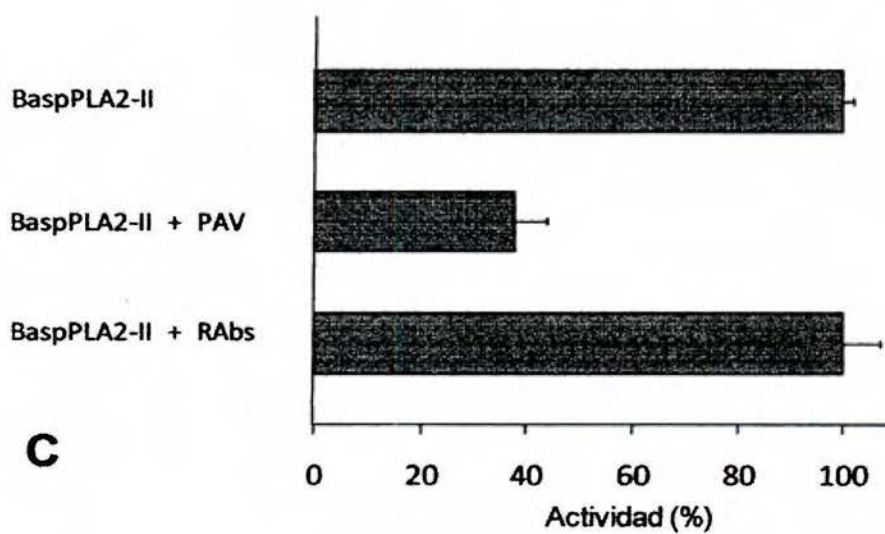
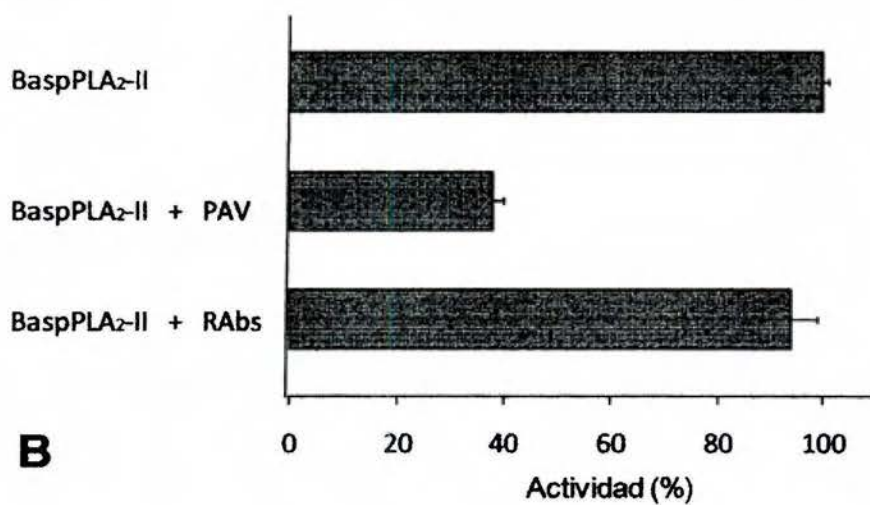
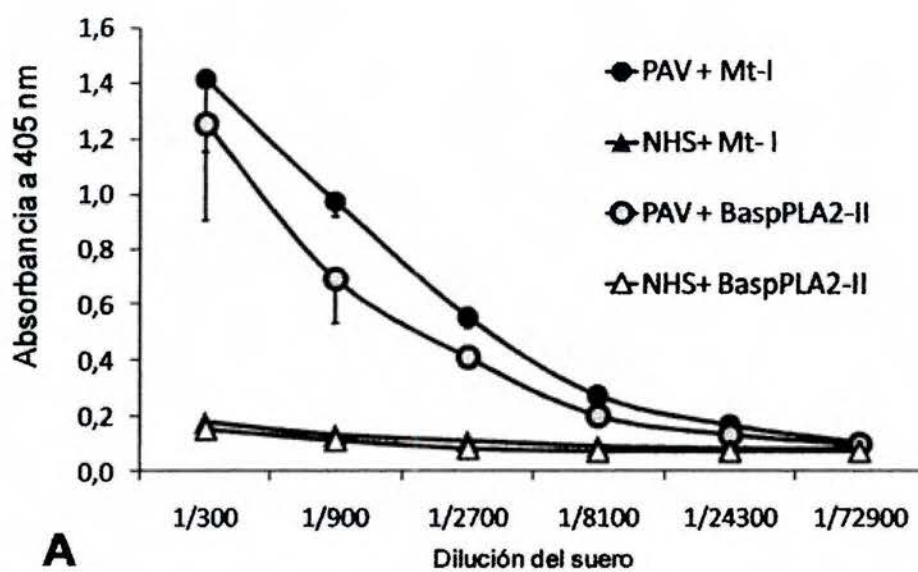


Figura 21. ELISA con el título de anticuerpos contra la PLA₂ ácida y contra la Miotoxina I (Mt-I) de *B. asper* en el Suero Antiofidico Polivalente del Instituto Clodomiro Picado (Nota: las barras de error son muy pequeñas en algunos puntos y por eso no se observan). NHS= suero normal equino. PAV=Suero Antiofidico Polivalente. Los puntos representan a la media \pm D.S. de triplicados. La neutralización de la actividad enzimática de la PLA₂ ácida por suero antiofidico polivalente y por el suero anti-BaspPLA₂-II producido en conejo se observa con el método colorimétrico (B) y titrimétrico (C).

Discusión

En el presente trabajo se logró realizar por primera vez la caracterización bioquímica y toxicológica completa de una PLA₂ ácida de *B. asper* de la región del Pacífico. De acuerdo con la caracterización estructural de la proteína, BaspPLA₂-II coincide con el pico 12 del proteoma del veneno de *B. asper*, según lo reportado previamente por Alape-Girón *et al.* En el 2008. El pI obtenido (4,9) indica que se trata de una proteína ácida. De la misma manera, la masa molecular obtenida (14,212 ± 6 Da) por espectrometría de masas por ionización en electrospray indica que se trata muy probablemente de la misma fosfolipasa del pico 12 del proteoma del veneno. Esto se confirmó una vez que se obtuvo la secuencia completa de la proteína. De acuerdo con los datos del proteoma del veneno de *B. asper* de la región del Océano Pacífico (Alape-Girón *et al.*, 2008), esta PLA₂ corresponde al 6,3% de todas las proteínas del veneno.

La PLA₂ purificada no es ninguna de las que fueron purificadas por Alagón *et al.*, en el año 1980, debido a que el número de residuos de aminoácidos y la masa molecular no coincide. Tampoco se trata de la PLA₂ ácida purificada por Pinto en el 2000, debido a que tiene una secuencia N-terminal diferente.

La PLA₂ ácida aislada es una enzima de 124 aminoácidos. Esta enzima pertenece al grupo IIA de las fosfolipasas y además tiene un residuo de Asp en la posición 49, lo cual la ubica dentro de las fosfolipasas catalíticamente activas. Este hallazgo concuerda con lo observado en las fosfolipasas ácidas purificadas a partir de venenos de serpientes, pues todas son Asp 49.

La actividad catalítica de la fosfolipasa ácida es mayor si se compara con la actividad catalítica de las fosfolipasas básicas de *B. asper* del Pacífico. Esto también ocurre con otras fosfolipasas ácidas de venenos de otras serpientes. En general, las fosfolipasas ácidas tienen una gran actividad catalítica en comparación con las básicas,

por lo tanto lo que se observa con BaspPLA₂-II concuerda con lo reportado previamente por otros autores (Rosenberg, 1986; Santos-Filho *et al.*, 2008).

La secuencia obtenida muestra una gran homología con otras fosfolipasas ácidas aisladas de venenos de serpientes, de acuerdo con el programa Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST*). Las fosfolipasas ácidas con mayor homología son P81243 de *Bothrops jararaca* (86% de identidad), Q8QG87 de *Bothrops insularis* (85% de identidad) y Q8ASY1 de *Bothrops jararacussu* (81%). De las secuencias con mayor homología, sólo la P81243 de *B. jararaca* presenta 124 aminoácidos (las demás presentan 122 aminoácidos). Esto se debe a las inserciones en los residuos 67 y 68. Las 3 proteínas con mayor identidad presentan inhibición de la agregación plaquetaria (P81243 y Q8ASY1), miotoxicidad (Q8QG87) y efecto hipotensor (Q8ASY1).

BaspPLA₂-II no presentó actividad miotóxica *in vivo*, tanto por medición de CK liberada como por observación de cortes histológicos. Esto concuerda con lo observado en la mayoría de las PLA₂s ácidas purificadas de venenos de serpientes. Estos hallazgos indican que la actividad catalítica de la enzima no es suficiente para generar la miotoxicidad. Por lo tanto, en las PLA₂s ácidas, la miotoxicidad depende más de características estructurales que de su actividad catalítica, o al menos una mezcla de ambas. En cuanto al veneno de *B. asper* de la región del Pacífico, la miotoxicidad parecería que sólo se debe a las PLA₂s básicas, a menos que otras PLA₂s ácidas diferentes a BaspPLA₂-II (la mayoritaria en el veneno de *B. asper* de la vertiente del Océano Pacífico), de acuerdo con lo que se reporta en el trabajo de Alape-Girón *et al.* (2008) también generen miotoxicidad. La ausencia de citotoxicidad *in vitro* de la PLA₂ ácida concuerda con la falta de miotoxicidad *in vivo*. La PLA₂ ácida de *B. asper* tampoco presentó actividad anti-agregante plaquetaria, ni actividad hipotensora. Es importante determinar en el futuro si los componentes del veneno de *B. asper* que producen el efecto hipotensor son otras fosfolipasas ácidas o si son proteínas o péptidos de otras familias. Es importante mencionar que el proteoma del veneno de *B. asper* de la Región del Pacífico y de la Región del Caribe (Alape-Girón *et al.*, 2008) indica que no hay péptidos potenciadores de bradikina, los cuales son importantes

mediadores de la inflamación en el veneno de otras especies de *Bothrops* (Hayashi y Camargo, 2005).

La ausencia de actividad letal en la PLA₂ hasta una dosis de 5,9 µg/g también concuerda con lo que se ha reportado en la literatura para otras PLA₂s acídicas, las cuales presentan una baja actividad letal, e indica que esta fosfolipasa acídica no es la que fue purificada previamente por Ferlan y Gubenšek en 1978. La PLA₂ acídica de *B. asper* tampoco presentó actividad anticoagulante. Esta actividad se presenta en bastantes PLA₂s acídicas de venenos de serpientes (Cuadro 1), por lo que era posible que se encontrara en esta PLA₂ acídica de *B. asper*. Sin embargo, no tiene esta actividad.

La importancia de tener la secuencia completa de BaspPLA₂-II y que además esta enzima no presente las actividades tóxicas mencionadas previamente, radica en que podría ayudar a determinar cuáles aminoácidos son claves para las actividades tóxicas al comparar la secuencia con otras PLA₂s que sí sean tóxicas. La comparación de secuencias parciales de aminoácidos entre BaspPLA₂-II y otra PLA₂ acídica aislada del veneno de *B. asper* de Panamá (que va a ser llamada BaspPLA₂-I, según una comunicación personal de A.M. Soares, Universidad de São Paulo, Brasil) puso de manifiesto varias diferencias estructurales. Por lo tanto, las diferentes isoformas de PLA₂ acídicas que están presentes en el veneno de *B. asper* pueden variar en la expresión de los efectos tóxicos.

Según los datos obtenidos, la PLA₂ acídica es una enzima con alta actividad enzimática pero muy poco tóxica. Es uno de los componentes aislados de *B. asper* que presentan la menor cantidad de actividades tóxicas. Por lo tanto, su papel en la fisiopatología provocada por el envenenamiento ofídico probablemente es de relevancia marginal. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esta enzima tiene un papel fundamentalmente digestivo: hidrólisis de fosfolípidos para convertirlos en ácidos grasos y lisofosfolípidos. Además, esta enzima “no tóxica” podría tener acciones tóxicas

aún desconocidas en presas que no sean los roedores. Ya que se sabe que los especímenes de recién nacidos y juveniles de *B. asper* se alimentan de presas ectotérmicas como ranas y lagartijas (Sasa *et al.*, 2009), sería pertinente evaluar el perfil de toxicidad de BaspPLA₂-II en estas presas.

El análisis de toxicidad sistémica de BaspPLA₂-II mostró que esta enzima no presenta toxicidad sistémica. En la literatura, los primeros en reportar un efecto tóxico sistémico por una fosfolipasa ácida fueron Nisembom *et al.* (1986), que demostraron que una fosfolipasa ácida de *Bothrops alternatus* causó daño severo en corazón, pulmones, hígado y riñón. Sin embargo, la PLA₂ ácida de *B. asper* no presentó toxicidad sistémica.

La actividad edematizante que presentó la PLA₂ ácida, concuerda con lo obtenido previamente con PLA₂s ácidas de otros venenos (Cuadro 1), las cuales también presentaron actividad edematizante con bajas concentraciones. El mayor porcentaje de edema se observó a los 30 minutos y posteriormente decreció gradualmente hasta desaparecer a las 5 horas.

El mecanismo mediante el cual las PLA₂s activas catalíticamente generan edema podría ser explicado por la hidrólisis de fosfolípidos, debido probablemente a la liberación de precursores de distintos eicosanoides y factores activadores de plaquetas. La liberación de aminas por mastocitos también se propuso como un mecanismo posible de la inducción de edema por PLA₂s (Landucci *et al.*, 2000; y Santos-Filho *et al.*, 2008).

Los estudios inmunoquímicos muestran que el suero antiofídico polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado tiene anticuerpos contra la fosfolipasa ácida, con un título muy parecido al que tiene contra la miotoxina I de *Bothrops asper*. Estos estudios también muestran que la reactividad cruzada entre estas dos fosfolipasas es muy baja, indicando que ambas constituyen grupos antigénicos distintos. Los

anticuerpos del suero antiofídico neutralizaron parcialmente la actividad enzimática de la enzima. Sin embargo, esta enzima es muy poco tóxica por lo que su neutralización completa por un suero antiofídico no sería fundamental para evitar el daño ocasionado por el envenenamiento ofídico con *B. asper* del Pacífico.

Los anticuerpos obtenidos al inmunizar los 2 conejos con la PLA₂ sí reconocen esta enzima, de acuerdo con el ELISA, el Western Blot y la doble inmunodifusión en gel. Sin embargo no lograron neutralizar la actividad catalítica de esta enzima, de acuerdo con lo obtenido tanto por el método colorimétrico de Araújo como por el método de Dole. Probablemente se debe a que estos anticuerpos reconocen epitopos que no se encuentran en el sitio activo y además la unión de los anticuerpos a la enzima no interfiere con la unión de la enzima a su sustrato.

En conclusión, la proteína aislada en este trabajo es una PLA₂ ácida monomérica que presenta muy poca toxicidad en ratones, por lo que probablemente cumple funciones digestivas en el veneno de *B. asper*. Su secuencia de aminoácidos completa es de un gran valor para futuros estudios que busquen encontrar determinantes moleculares de actividades tóxicas de fosfolipasas ácidas, mediante la comparación de secuencias.

Referencias

- Alagón AC, Molinar RR, Possani LD, Fletcher PL Jr, Cronan JE Jr, Julia JZ, 1980. Venom from the snake *Bothrops asper* Garman. Purification and characterization of three phospholipases A₂. *Biochem J.* 185:695-704.
- Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ, 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res.* 7:3556-71.
- Andrião-Escarso SH, Soares AM, Fontes MR, Fuly AL, Corrêa FM, Rosa JC, Greene LJ, Giglio JR, 2002. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol.* 64:723-32
- Angulo Y, Lomonte B, 2009. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon.* 54:949-57.
- Aragón F, Gubensek F, 1981. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon.* 19: 797-805.
- Arni RK, Ward RJ, 1996. Phospholipase A₂: a structural review. 34:827-41.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J. y Schwede T, 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology lternat. *Bioinformatics.* 22:195-201.

- Bolaños, R, 1982. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. Rev. Cost. Cienc. Méd. 3: 165–184.
- Campbell JA y Lamar W, 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates: Ithaca, NY, and London.
- Chippaux JP, 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull World Health Organ. 76:515-24.
- Cogo JC, Lilla S, Souza GH, Hyslop S, de Nucci G, 2006. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). Biochimie 12:1947-59.
- Daniele JJ, Bianco ID, Fidelio GD, 1995. Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. Arch Biochem Biophys. 318:65-70.
- De Albuquerque Modesto JC, Spencer PJ, Fritzen M, Valença RC, Oliva ML, da Silva MB, Chudzinski-Tavassi AM, Guarnieri MC, 2006. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. Biochem Pharmacol. 72:377-84.
- De Araújo AL, Radvanyi F y Bon C, 1994. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. Toxicon. 32:1069-81.
- Dole, V.P. 1956. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. J. Clin. Invest. 35:150-154.

- Ferlan, I., Gubenšek, F, 1978. Phospholipases of *Bothrops asper* venom. *Period. Biol.* 80: 31-36.
- Finney DJ, 1971. Statistical logic in the monitoring of reactions to therapeutic drugs. *Methods Inf Med.* 10: 237-45.
- Fernández P, Gutiérrez JM, 2008. Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993-2006). *Toxicon* . 52:530-3.
- França F, Málaque C, 2003. Acidente Botrópico. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Iternates*. Pp. 72-86.
- Fuly AL, Calil-Elias S, Zingali RB, Guimarães JA, Melo PA, 2000. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon*. 38:961-72.
- Fuly AL, de Miranda AL, Zingali RB, Guimarães JA, 2002. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem Pharmacol.* 63:1589-97.
- Gutiérrez, J.M. y Lomonte, B, 1997. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. En: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, Chichester, pp. 321-352.
- Gutiérrez, JM., Chaves, F y Bolaños, R, 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28: 341-351.

- Gutiérrez JM, Theakston RD, Warrell DA, 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PloS Med.* 3:150.
- Hayashi MA y Camargo AC, 2005. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon.* 45:1163-70.
- Jiménez-Porras J, 1964. Venom proteins of the Fer-de-Lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon.* 2:155-158
- Ketelhut DF, de Mello MH, Veronese EL, Esmeraldino LE, Murakami MT, Arni RK, Giglio JR, Cintra AC, Sampaio SV, 2003. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie.* 10:983-91.
- Kini RM, 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon.* 42:827-40.
- Liu X, Pan H, Yang G, Wu X, Zhou, 1999. Cloning, expression and biochemical characterization of a basic-acidic hybrid phospholipase A₂-II from *Agkistrodon halys pallas*. *Biochim Biophys Acta.* 1431:157-65.
- Lomonte B., Gutiérrez J.M., Rojas G. y Calderón L, 1991. Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. *Toxicon* 29: 695-702
- Lomonte B, Moreno E, Gutiérrez JM., 1987. Detection of proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxin in crotaline snake venoms. *Toxicon* 25: 947-955.

- Lomonte B, Angulo Y, Calderón L, 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*. 42:885-901.
- Magro AJ, Murakami MT, Marcussi S, Soares AM, Arni RK, Fontes MR, 2004. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem Biophys Res Commun*. 323: 24-31.
- Murakami M. T., Gabdoulkhakov A., Genov N., Cintra A.C.O., Betzel C. y Arni R.K, 2006. Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states. *Biochimie* 88:543-549.
- Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC, 1986. Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops iternates* (víbora de la cruz) venom. *Toxicon*. 24:807-17.
- Nonato MC, Garratt RC, Mascarenhas YP, Jesus WD, Assakura MT, Serrano SM, Oliva G, 2001. Crystallization and preliminary crystallographic studies of a phospholipase A₂ from the venom of the Brazilian snake *Bothrops moojeni*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 57:599-601.
- Ouchterlony y Nilsson, 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 19.1-19.44

- Pinto A, 2000. Identificación, asilamiento y caracterización parcial de componentes que inhiben la agregación plaquetaria a partir del veneno de *Bothrops asper* (terciopelo). Trabajo final de graduación.
- Roberto PG, Kashima S, Marcussi S, Pereira JO, Astolfi-Filho S, Nomizo A, Giglio JR, Fontes MR, Soares AM, França SC, 2004. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein J.* 23:273-85.
- Rodrigues RS, Izidoro LF, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Selistre-de-Araújo HS, Giglio JR, Fuly AL, Soares AM, Rodrigues VM, 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon.* 50:153-65.
- Rosenberg, D, 1986. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons, En: J.B. Harris (Ed.), *Natural Toxins Animal, Plant and Microbial*. Oxford Science Publications, Oxford, pp. 129-174.
- Santos-Filho NA, Silveira LB, Oliveira CZ, Bernardes CP, Menaldo DL, Fuly AL, Arantes EC, Sampaio SV, Mamede CC, Beletti ME, de Oliveira F, Soares AM, 2008. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I(2) inductor phospholipase A(2) isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon.* 52:908-17.
- Sasa M, Wasko, D y Lamar W, 2009. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon.* 54:904-922.

- Sasa M y Vázquez S, 2003. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon*. 41:19-22.
- Serrano SM, Reichl AP, Mentele R, Auerswald EA, Santoro ML, Sampaio CA, Camargo AC, Assakura MT, 1999. A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch Biochem Biophys*. 367:26-32.
- Schaloske RH, Dennis EA, 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 1761:1246-59.
- Siddiqi AR, Zaidi ZH, Jörnvall H, 1991. Purification and characterization of two highly different group II phospholipase A₂ isozymes from a single viperid (*Eristocophis macmahoni*) venom. *Eur J Biochem*. 201:675-9.
- Tsai IH, Wang YM, Chen YH, Tu AT, 2003. Geographic variations, cloning, and functional analyses of the venom acidic phospholipases A₂ of *Crotalus viridis viridis*. *Arch Biochem Biophys*. 411:289-96.
- Wang Y, Cui G, Zhao M, Yang J, Wang C, Giese RW, Peng S, 2008. Bioassay-directed purification of an acidic phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys pallas* venom. *Toxicon*. 51: 1131-9.
- Wang XQ, Yang J, Gui LL, Lin ZJ, Chen YC, Zhou YC, 1996. Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*. 255: 669-76.

Apéndices

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION
COMITÉ INSTITUCIONAL DEL CUIDO Y USO DE ANIMALES

Viernes 12 de febrero de 2010
CICUA-02-10

Dr. Julián Fernández
Instituto Clodomiro Picado
Facultad de Microbiología

Estimado señor:

En la sesión número 105 del Comité Institucional del Cuido de Animales (CICUA), del viernes 12 de febrero se conoció su propuesta de proyecto de investigación: "Aislamiento y caracterización bioquímica y toxicológica de una fosfolipasa ácida del veneno de *Bothrops asper*".

La misma se evaluó y se aprobó sin restricciones.

Atentamente,



Dra. Liliana Pazos
Coordinadora
CICUA

Cc: Dra. Julieta Carranza, Unidad de Gestión de la Investigación VI
Archivo



Research paper

Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization[☆]

Julián Fernández^a, José María Gutiérrez^a, Yamileth Angulo^a, Libia Sanz^b,
Paula Juárez^b, Juan J. Calvete^b, Bruno Lomonte^{a,*}

^aInstituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

^bInstituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2009

Accepted 8 December 2009

Available online 22 December 2009

Keywords:

Bothrops asper

Phospholipase A₂

BaspPLA₂-II

Snake venom

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂) are major components of snake venoms, exerting a variety of relevant toxic actions such as neurotoxicity and myotoxicity, among others. Since the majority of toxic PLA₂s are basic proteins, acidic isoforms and their possible roles in venoms are less understood. In this study, an acidic enzyme (BaspPLA₂-II) was isolated from the venom of *Bothrops asper* (Pacific region of Costa Rica) and characterized. BaspPLA₂-II is monomeric, with a mass of 14,212 ± 6 Da and a pI of 4.9. Its complete sequence of 124 amino acids was deduced through cDNA and protein sequencing, showing that it belongs to the Asp49 group of catalytically active enzymes. *In vivo* and *in vitro* assays demonstrated that BaspPLA₂-II, in contrast to the basic Asp49 counterparts present in the same venom, lacks myotoxic, cytotoxic, and anticoagulant activities. BaspPLA₂-II also differed from other acidic PLA₂s described in *Bothrops* spp. venoms, as it did not show hypotensive and anti-platelet aggregation activities. Furthermore, this enzyme was not lethal to mice at intravenous doses up to 100 µg (5.9 µg/g), indicating its lack of neurotoxic activity. The only toxic effect recorded *in vivo* was a moderate induction of local edema. Therefore, the toxicological characteristics of BaspPLA₂-II suggest that it does not play a key role in the pathophysiology of envenomings by *B. asper*, and that its purpose might be restricted to digestive functions. Immunochemical analyses using antibodies raised against BaspPLA₂-II revealed that acidic and basic PLA₂s form two different antigenic groups in *B. asper* venom.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The snake *Bothrops asper* is responsible for most cases of envenomings in the Central American region [1,2]. Its venom contains proteins that belong to at least eight families: serine proteinases, disintegrins, metalloproteinases, L-amino acid oxidases, cysteine-rich secretory proteins, DC fragments, C-type lectin-like proteins, and phospholipases A₂ (PLA₂s) [3]. PLA₂s are ubiquitous enzymes that catalyze the hydrolysis of the C2 ester bond of 3-*sn*-phosphoglycerides, producing lysophospholipids and free fatty acids in a calcium-dependent reaction [4]. In snake venoms, PLA₂s have acquired during evolution the ability to exert different toxic activities *in vivo*, most notably neurotoxicity and myotoxicity [5–7]. The PLA₂ superfamily includes five types of enzymes (secreted PLA₂s, cytosolic PLA₂s, calcium-independent PLA₂s, lysosomal PLA₂s, and platelet-activating factor acetylhydrolases), classified within fifteen

groups [8]. Snake venom PLA₂s are among the secreted PLA₂s, and those from *B. asper*, in similarity to PLA₂s of all viperids, belong to the subgroup IIA. Proteins of this subgroup can be further subdivided into two types: Asp49 PLA₂s, which are catalytically active, and PLA₂ homologues, which possess most commonly a Lys49 residue and do not have catalytic activity [9,10].

Both acidic and basic PLA₂s can be found in snake venoms, in variable proportions depending on the species. Nevertheless, the basic isoforms appear to have acquired the highest toxicity, especially in the case of neurotoxic and myotoxic enzymes [11,12]. To date, all acidic PLA₂s purified from viperid venoms present an Asp residue at position 49. These acidic isoforms usually have a higher catalytic activity than basic PLA₂s upon conventional substrates *in vitro* [11,13,14]. In spite of this, many acidic PLA₂s are not lethal or show a weak lethal potency in mice [15–17].

Toxic effects induced by acidic PLA₂s from *Bothrops* species were demonstrated in early studies by Nisenbom et al. [18], who isolated an enzyme from *Bothrops alternatus* causing severe tissue damage in the liver, kidneys, lungs and heart of mice. More recent studies have shown that acidic PLA₂s from *Bothrops* spp. venoms may express other toxic actions *in vivo*, such as myotoxicity and

[☆] UniProt Knowledgebase accession number of BaspPLA₂-II is P86389.

* Corresponding author. Tel.: +506 22290344.

E-mail address: bruno.lomonte@ucr.ac.cr (B. Lomonte).

hypotensive activity, as well *in vitro*, such as neuromuscular blockade and inhibition of platelet aggregation [14,17,19–23]. In the case of *B. asper*, Ferlan and Gubenšek [24] purified an acidic enzyme from the venom of specimens from Costa Rica, PLA₂ I, which showed a lethal intravenous potency of 2 µg/g in mice. Alagón et al. [25] characterized three acidic isoforms from the venom of *B. asper* from Mexico, named PLA₂ 1, PLA₂ 2 and PLA₂ 3. This multiplicity of acidic PLA₂ isoforms in the venoms of *B. asper* from the Pacific and Caribbean regions of Costa Rica has also been evidenced by isoelectrofocusing techniques [26], and more recently confirmed using a proteomic approach [3].

The potential toxic activities of acidic PLA₂s of *B. asper* venom have not yet been identified, and therefore their possible roles in the pathophysiology of envenoming are still unknown. In the present work, an acidic PLA₂ from *B. asper* venom (BaspPLA₂-II) was isolated and thoroughly characterized, to gain insights into its possible biological roles and relevance in the pathophysiology of envenomings by *B. asper*.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of BaspPLA₂-II

Crude venom was obtained from more than twenty specimens of *B. asper* from the Pacific region of Costa Rica, kept at the serpentarium of Instituto Clodomiro Picado. The venom was pooled, centrifuged to remove debris, lyophilized, and stored at –20 °C. Batches of 500 mg of venom were dissolved in 6 ml of 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0, and applied to a CM-Sephadex C25 column (20 × 2 cm) equilibrated with the same buffer. Protein elution was monitored at 280 nm using an Econo-system chromatograph (Bio-Rad), at 0.4 ml/min. The unbound fraction was collected and applied to a DEAE-Sepharose column (23 × 3 cm), which was eluted at 0.5 ml/min with a linear gradient of ammonium acetate, from 0.1 to 1.0 M, at pH 7.0. Fractions were assayed for PLA₂ activity as described below, and freeze-dried. The fraction with highest activity was subjected to reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a semi-preparative C8 column (Vydac, 250 × 10 mm, 5 µm particle size), monitored at 280 nm on an Agilent 1100 chromatograph. The protein was dissolved in 1 ml of buffer A (0.1% trifluoroacetic acid [TFA], 5% acetonitrile, 95% water), injected, and eluted at 1 ml/min with a linear gradient from 0 to 70% buffer B (0.1% TFA, 95% acetonitrile, 5% water) in 55 min. The main peak was collected, dried by vacuum centrifugation, dissolved in 1 ml of 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 5.0, and finally applied to a CM-Sephadex column (1 × 5 cm) equilibrated with the same buffer, to remove traces of a contaminant. The unbound fraction was collected, freeze-dried, and stored at –20 °C. Homogeneity of the final preparation was evaluated by sodium dodecylsulphate-polyacrylamide (15%) gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing and non-reducing conditions, followed by Coomassie blue R-250 staining. In some experiments, two basic PLA₂s from *B. asper* venom were included for comparative purposes: myotoxin I is a catalytically active Asp49 enzyme [27], whereas myotoxin II is a catalytically inactive Lys49 homologue [28].

2.2. Isoelectric point and molecular mass determinations

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of BaspPLA₂-II was performed on a Multiphor II (Amersham Bioscience) apparatus. For the first dimension, 5 µg of enzyme were loaded onto a 7 cm IPG Immobililine® Dry Strip of pH range 3–10, and focused at 200 V for 1 min, followed by 3500 V for 120 min. Second dimension was run on 12% SDS-PAGE and stained by Coomassie.

The experimentally observed pI was compared with the theoretically predicted value based on the amino acid sequence, using the Compute pI/MW tool at the EXPASY Proteomics Server (www.expasy.ch/tools). The molecular mass of BaspPLA₂-II was determined by electrospray ionization (ESI-MS) on a QTrap 2000 instrument (Applied Biosystems).

2.3. Amino acid sequence

The N-terminal sequence of BaspPLA₂-II was obtained directly by automated Edman sequencing on a Procise Instruments Sequencer (Applied Biosystems). Then, protein fragments were generated with cyanogen bromide and separated by RP-HPLC using an Ettan LC system (Amersham) with a C18 column (250 × 4 mm, 5 µm particle size) eluted at a flow rate of 1 ml/min with a linear gradient of 0.1% TFA in water (buffer A) or in acetonitrile (buffer B): 5% B for 10 min, followed by 5–15% B over 20 min, 15–45% B for 120 min, and 45–70% B over 20 min. Detection of peptides was monitored at 215 nm, and the main fragments recovered were subjected to Edman sequencing. Additional internal peptides of BaspPLA₂-II were sequenced by tandem MS. Protein bands were excised from Coomassie-stained, reduced 15% gels (SDS-PAGE) and subjected to automated reduction with dithiothreitol, alkylation with iodoacetamide, and digestion with sequencing grade bovine pancreatic trypsin (Roche) using a Progest Digestion Station (Genomic Solutions), following manufacturer's instructions. A total of 0.65 µl of the tryptic peptide mixtures (total volume of 20 µl) was spotted onto a MALDI-TOF sample holder, mixed with an equal volume of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile containing 0.1% TFA, dried, and analyzed with a Voyager-DE Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems), operated in delayed extraction and reflector modes. For peptide sequencing, the protein digest mixture was loaded in a nanospray capillary column and subjected to ESI-MS analysis on a QTrap 2000 instrument equipped with a nanospray source (Protona). Doubly- or triply-charged ions of selected peptides from the MALDI-TOF mass fingerprint spectra were analyzed in Enhanced Resolution MS mode, and the monoisotopic ions were fragmented using the Enhanced Product Ion tool with Q0 trapping. Enhanced Resolution was performed at 250 amu/s across the entire mass range. Settings for MS/MS experiments were as follows: Q1, unit resolution; Q1-to-Q2 collision energy, 30–40 eV; Q3 entry barrier, 8 V; LIT (linear ion trap) Q3 fill time, 250 ms; and Q3 scan rate, 1000 amu/s. CID spectra were interpreted manually or using a licensed version of MASCOT (www.matrixscience.com) against a private database containing 927 viperid protein sequences deposited in the Swiss-Prot/TrEMBL database, plus the previously assigned peptide ion sequences from snake venom projects carried out in the laboratory of J.J. Calvete. MS/MS mass tolerance was set to ± 0.6 Da. Carbamidomethylcysteine and oxidation of methionine were fixed and variable modifications, respectively.

2.4. cDNA cloning and nucleotide sequencing

The complete sequence of BaspPLA₂-II was deduced from the cloning and nucleotide sequencing of its cDNA. Total RNA was extracted from the venom glands of *B. asper* (Pacific Region) using specifications of the RNeasy Protect Mini kit (Qiagen). BaspPLA₂-II specific mRNA underwent reverse transcription to obtain cDNA with a FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion) using a rapid amplification of 3' cDNA ends polymerase chain reaction (3' RACE-PCR). According to the kit specifications, the entire mRNA was first transformed into cDNA using an OligodT with the following adapter sequence: 5'-GCCAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGCT12VN-3'. From the cDNA obtained, BaspPLA₂-II sequence was amplified using

a gene specific primer for the enzyme. This primer was designed on the basis of the N-terminal sequence data. The primer 5'-TGGCAATTCGGGCAAATGATG-3' corresponds to the N-terminal portion WQFGQMM of the protein. The 3' RACE Outer Primer had the sequence 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT-3', and the 3' RACE Inner Primer had the sequence 5'-CGCGGATCCGAATTAATACGACTACTATAGG-3'. The 3' RACE-PCR was conducted using the M-MLV reverse transcriptase (Promega). The reaction occurred under the following conditions: 5 min at 65 °C and then 1 h at 42 °C. For the second part of the reaction a touchdown PCR was carried out from 60 to 50 °C. The touchdown 60/50 PCR protocol included an initial denaturation step at 95 °C for 10 min followed by 4 cycles of denaturation (30 s at 94 °C), annealing (30 s at 60 °C), and extension (30 s at 72 °C); 21 cycles starting with the above conditions and, in subsequent cycles, decreasing the annealing temperature by 0.5 °C (reaching 50 °C in cycle 21); 10 cycles of denaturation (30 s at 94 °C), annealing (30 s at 50 °C), and extension (30 s at 72 °C); and a final extension for 10 min at 72 °C. Products were identified on 2% agarose gel electrophoresis, searching for bands of approximately 0.4 kb. The cDNA obtained was treated with the ExoSAP-IT[®] kit (Affymetrix) for 15 min at 37 °C and 15 min at 80 °C to remove all contaminants. Then, dA tails were added to the cDNA for 30 min at 72 °C. Subsequently, the cDNA was cloned into the pGEM[®]-T vector (Promega) overnight at 4 °C. Once the cDNA was ligated to the vector, *Escherichia coli* strain DH5 α (Novagen) were transformed by electroporation. A PCR was used to detect the presence of the vector with BaspPLA₂-II sequence in the colonies. Transformed bacteria were incubated overnight at 37 °C, and then the vector was extracted with the Wizard plus Minipreps DNA purification system (Promega) DNA extraction kit. Final nucleotide sequencing was performed with an Applied Biosystems model 377 instrument, using primers T7 and SP6.

2.5. Molecular modeling

Homology modeling using the Swiss-Model server (<http://swissmodel.expasy.org>) was utilized to predict the three-dimensional structure of BaspPLA₂-II using the acidic PLA₂ from *Bothrops jararacussu* (PDB code 1ZL7) as a template, which has a sequence identity of 81%, and has been crystallized and resolved at 1.6 Å [29]. Superposition of model and template structures, and r.m.s.d. calculations were performed with Swiss-PdbViewer [30] and DS ViewerPro (Accelrys).

2.6. Phospholipase A₂ activity

Enzymatic activity of BaspPLA₂-II was determined by the colorimetric method of de Araujo and Radvanyi [31], with phenol red as a pH indicator, upon micelles of 0.4% v/v Triton X-100 and 0.25% w/v *sn*-3-phosphatidylcholine as substrate. Twenty microliters of a solution of enzyme, containing 500, 250, 125, or 62.5 ng, in water, were added to 1 ml of substrate in a thermo-regulated cuvette at 30 °C. After a stabilization period of 20 s, the decrease in absorbance at 558 nm was monitored continuously for 1 min. One unit of PLA₂ activity was defined as the change of 0.001 in absorbance per min. Results obtained with this method were additionally confirmed by means of the titrimetric assay of Dole [32] using egg yolk phospholipids, as described [33], and expressed as $\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{min}$ of enzyme activity.

2.7. Anticoagulant activity

Citrated (3.8% v/v) human plasma was obtained from the blood of healthy volunteers. Aliquots of 0.2 ml were dispensed into glass tubes and incubated in a water bath for 5 min at 37 °C. Then, 50 μl of

a BaspPLA₂-II solution in phosphate-buffered saline (PBS; 0.12 M NaCl, 0.04 M sodium phosphate, pH 7.2) containing 40 μg of enzyme were added, and further incubated for 10 min at 37 °C. Control tubes contained plasma incubated with PBS only. Finally, 50 μl of 0.25 M CaCl₂ was added to all tubes and the clotting time was determined, in duplicate assays.

2.8. Anti-platelet aggregating activity

Fresh platelet-rich human plasma was prepared by centrifugation of citrated blood from healthy volunteers, at 135 g for 15 min. Aliquots of 450 μl of this preparation were incubated with BaspPLA₂-II at final concentrations up to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ plasma, for 5 min at 37 °C. Then, platelet aggregation was initiated by adding 5 μl of 0.1 mM ADP and monitored through the increase in the light transmittance using a model 530-VS aggregometer (Chrono-Log Corporation). Platelet-poor plasma (450 μl), obtained after centrifugation at 1500 g for 15 min, was used as a blank. Platelet-rich plasma incubated with 50 μl of ADP alone served as a positive control for aggregation. Assays were performed in duplicate.

2.9. Cytotoxic activity

The cytotoxic activity of BaspPLA₂-II on C2C12 skeletal muscle cell cultures was determined as described [34]. Doses up to 40 μg of the enzyme were diluted in assay medium (Dulbecco's modified Eagle Medium supplemented with 1% fetal bovine serum) and added to cells growing in 96-well plates, in a volume of 100 $\mu\text{l}/\text{well}$. Control wells consisted of medium alone (0% toxicity), or 0.1% Triton X-100 in medium (100% toxicity). After 3 h at 37 °C, 40 μl of the supernatant were taken to determine the activity of lactic dehydrogenase released by damaged cells, using a kinetic assay (LDH-P Mono, Biocon Diagnostik). Assays were performed in duplicate.

2.10. Lethal activity

To evaluate the lethal activity of BaspPLA₂-II, four CD-1 mice (16–18 g body weight) received an intravenous injection of 100 μg of enzyme, dissolved in 100 μl of PBS. As a control, two mice were injected similarly with 100 μl of PBS alone. Animals were observed up to 24 h after injection to record deaths. All animal experiments were approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the University of Costa Rica (CICUA).

2.11. Myotoxic activity

A group of five mice (18–20 g) received an intramuscular injection of 50 μg of BaspPLA₂-II, dissolved in 50 μl of PBS, in their right gastrocnemius. A control group received an identical injection of PBS alone. After 3 h, a tail blood sample was collected into heparinized capillaries, centrifuged, and a plasma aliquot of 4 μl was utilized to determine the activity of creatine kinase (CK; E.C. 2.7.3.2) using a kinetic assay (CK-Nac, Biocon Diagnostik). Enzyme activity was expressed in U/L. Myotoxicity was also assessed by histological evaluation. Twenty-four hour after BaspPLA₂-II injection mice were sacrificed by inhalation of carbon dioxide, and samples of their right gastrocnemius were obtained, fixed in 3.7% formalin, and processed for hematoxylin–eosin staining of paraffin-embedded sections.

2.12. Histological evaluation of systemic toxicity

For histological assessment of the systemic toxicity of BaspPLA₂-II, two mice (16–18 g) received an intravenous injection of 100 μg of

the enzyme, dissolved in 100 μ l of PBS. As a control, two mice were injected identically with PBS alone. Animals were euthanized by carbon dioxide inhalation 24 h after injection, and samples of liver, lungs, heart, and kidneys were obtained. Tissues were fixed and processed as described above.

2.13. Edema-forming activity

A group of four mice (18–20 g) received an injection of 10 μ g of BaspPLA₂-II, dissolved in 50 μ l of PBS, in the footpad. As a control, another group received an identical injection of PBS alone. Footpad thickness was measured with a low-pressure spring caliper (Oditest) before and at various intervals after injection (30, 60, 120, 180, 240, 300, and 360 min). Edema was expressed as the percentage increase in thickness relative to readings obtained before injection.

2.14. Hypotensive activity

A non-invasive blood pressure monitoring system (CODA[®], Kent Scientific Corporation) was utilized to evaluate the hypotensive activity of BaspPLA₂-II in a group of five mice (18–20 g). Blood pressure was determined before, and at 5 and 30 min after the intravenous injection of 10 μ g of BaspPLA₂-II, dissolved in 100 μ l PBS. As a positive control, another group of mice received 4 μ g of crude *B. asper* venom i.v., in 100 μ l of PBS. A negative control group received an i.v. injection of 100 μ l of PBS alone.

2.15. Preparation of rabbit antibodies against BaspPLA₂-II

Antibodies to BaspPLA₂-II were prepared by immunization of two rabbits with the purified enzyme, either intramuscularly or subcutaneously. An initial dose of 100 μ g, emulsified in complete Freund's adjuvant, was followed by booster doses of 50 μ g in incomplete adjuvant, at weeks 5 and 10. Rabbits were bled at week 12 and their sera were separated, aliquoted, and stored at –20 °C.

2.16. Immunochemical analyses

Rabbit antibodies raised against BaspPLA₂-II, together with previously obtained rabbit antibodies to *B. asper* myotoxin I [35], and the equine polyvalent (Crotalinae) antivenom produced at Instituto Clodomiro Picado [36] were utilized to analyze the immunochemical relationships between the acidic and basic PLA₂s of *B. asper*. Antibody characterization was performed by double immunodiffusion in gel, enzyme-immunoassay (EIA), and immunoblotting. Immunodiffusion was carried out in 1% agarose-PBS gels, loading 30 μ l/well of undiluted sera, enzymes (0.2 mg/ml) or crude venom (2 mg/ml), and read after 24 h. For the EIA, 0.2 μ g/well of enzymes (BaspPLA₂-II or myotoxin I) were adsorbed onto microplates as described [37]. After washing and blocking excess free sites with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA), varying dilutions of antisera were added to triplicate wells and incubated for 1 h. After five washings with FALC buffer (Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, ZnCl₂ 20 μ M, MgCl₂ 1 mM, pH 7.4), bound antibodies were detected with either anti-horse IgG or anti-rabbit IgG–alkaline phosphatase conjugates (1:5000) and *p*-nitrophenylphosphate as substrate. Absorbances were recorded on a Multiskan RC microplate reader (Labsystems) at 405 nm. Normal sera of the corresponding animal species were utilized as negative controls. For immunoblotting, 30 μ g of crude *B. asper* venom were separated by SDS-PAGE (15%) under reducing conditions, followed by electrotransfer to nitrocellulose in a Bio-Rad cell at 150 mA during 90 min. To assess transfer efficiency, membranes were previsualized by reversible Ponceau-S Red staining. Then, membranes were blocked in 1% BSA–PBS for 30 min, and incubated for 90 min with 1:1000 dilutions of antisera,

or the corresponding normal sera for each species. After washing four times with PBS containing 0.1% BSA and 0.05% Tween-20, the membranes were incubated with the appropriate anti-IgG–alkaline phosphatase conjugates (1:2000) during 90 min. Membranes were finally washed four times, and color development was performed with the BCIP/NBT substrate (Chemicon).

2.17. Neutralization of BaspPLA₂-II enzymatic activity by rabbit and equine antibodies

BaspPLA₂-II was preincubated for 30 min at 37 °C with rabbit antiserum or equine antivenom, at ratios of 0.5, 1, 2, and 4 ml serum/mg enzyme. Then, aliquots containing 0.25 μ g or 15 μ g of enzyme were assayed for PLA₂ activity, as described above, using the colorimetric or the titrimetric assays, respectively. Controls included identical enzyme aliquots incubated with PBS alone, or with normal sera from the corresponding species. Assays were performed in duplicate.

2.18. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.D. The significance of differences between the means of two experimental groups was analyzed by Student's *t*-test, where a *p* value <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Isolation and biochemical properties of BaspPLA₂-II

To ensure the removal of basic PLA₂s and PLA₂ homologues of *B. asper* venom, the first chromatographic step was performed in CM-Sephadex at pH 7.0 (Fig. 1A), where such components were retained. The unbound material was subsequently resolved into several peaks by the DEAE-Sephadex step, where the highest PLA₂ activity eluted in fraction D1 (Fig. 1B). The subsequent RP-HPLC separation of this fraction (Fig. 1C) eliminated most contaminants, but traces of a procoagulant venom component still remained, only detectable by its clotting activity upon human plasma (data not shown). This minor contaminant, most likely a thrombin-like serine proteinase [38], was successfully removed from BaspPLA₂-II by a final fractionation step on CM-Sephadex at pH 5.0, where it was retained by the chromatographic support.

Electrophoretic analyses of BaspPLA₂-II by SDS-PAGE showed that this enzyme migrates as a monomer of approximately 15–16 kDa, both under reducing and non-reducing conditions (Fig. 1D), consistent with the molecular mass of 14,212 \pm 6 Da determined by ESI-MS. Experimental assessment of the pI of this enzyme by 2D electrophoresis resulted in an estimated value of 4.9, close to the theoretical pI value of 5.05 predicted on the basis of its complete sequence.

The amino acid sequence of BaspPLA₂-II was obtained by a combination of Edman degradation, tandem mass spectrometry, and nucleotide sequencing of its cloned cDNA. It is composed of 124 amino acid residues, containing the conserved Asp49 of catalytically active enzymes (Fig. 2). The calculated isotope-averaged molecular mass for the amino acid sequence shown in Fig. 2 (14,179.97) is about 32 \pm 6 Da lower than the experimentally determined mass, suggesting that the protein may contain modified residues. In line with this assumption, the C-terminal peptide was sequenced by MS/MS analysis of the doubly-charged peptidic ion at *m/z* 576.6 as NCQE(129)SEPC. The sequences of the b5 and y5 daughter ions were interpreted as NCQE(D-oMe) and (D-oMe)SEPC, respectively, indicating that Asp120 was *o*-methylated. The remaining 16 Da difference between experimental and calculated

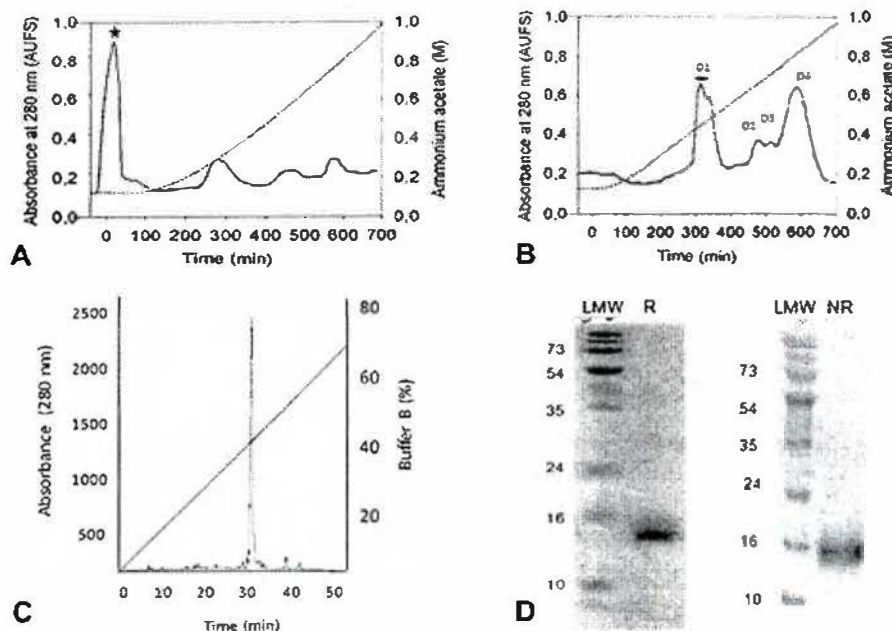


Fig. 1. Isolation of BaspPLA₂-II. (A) Fractionation of crude *B. asper* venom on CM-Sephadex at pH 7.0, eluted with ammonium acetate (0.1–1.0 M), as described in Materials and Methods. The unbound fraction (star) was subjected to separation on DEAE-Sepharose (B) using an identical gradient as in (A). Fraction D1 (thick horizontal line) was further purified by RP-HPLC on a semi-preparative C8 column (C), eluted with a 5–70% acetonitrile gradient over 55 min. (D) SDS-PAGE (15%) analysis of BaspPLA₂-II under reduced (R) and non-reduced (NR) conditions. LMW: low molecular weight markers, as indicated at the left, in kDa.

masses may correspond to oxidation of one of the 5 methionine residues of the protein.

The PLA₂ activity of BaspPLA₂-II was confirmed, as shown in Fig. 3. In comparison to myotoxin I, a basic Asp49 isoform from *B. asper* venom, this acidic enzyme was slightly more active in hydrolyzing phosphatidylcholine micelles.

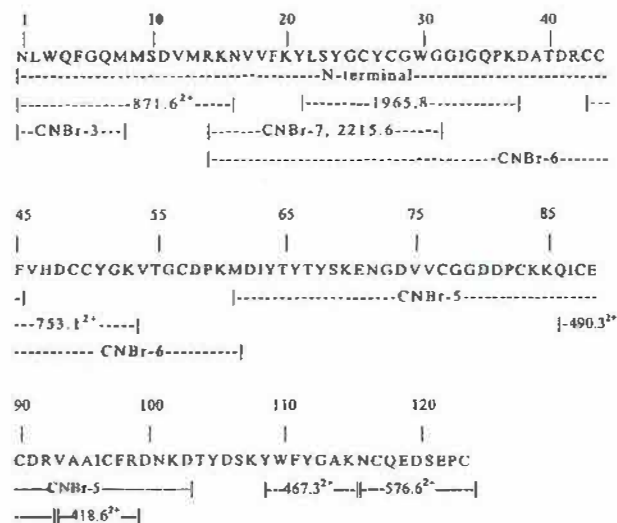


Fig. 2. Amino acid sequence of BaspPLA₂-II. The first 44 amino acid residues were determined by direct Edman degradation sequencing from the N-terminus. Overlapping peptides were generated by protein cleavage with CNBr. Other internal fragments, obtained after trypsin digestion, were sequenced *de novo* by ESI-MS/MS. Molecular mass values of the fragments are indicated.

Comparison of BaspPLA₂-II with similar proteins in the Swiss-Prot database showed that its primary structure is closely related to several group IIA acidic PLA₂s of crotaline species, mostly to the enzymes isolated from *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis*, and *B. jararacussu* (Fig. 4). Multiple sequence alignment evidenced that only BaspPLA₂-II and the *B. jararaca* P81243 enzyme present 124 amino acids within this group of proteins, all others having 122, or 123 in the case of *Gloydius ussuriensis* (Q7LZU4). This difference is caused by the insertion of two residues, Thr67 and Tyr68, in both BaspPLA₂-II and the *B. jararaca* PLA₂ (Fig. 4). A phylogenetic tree

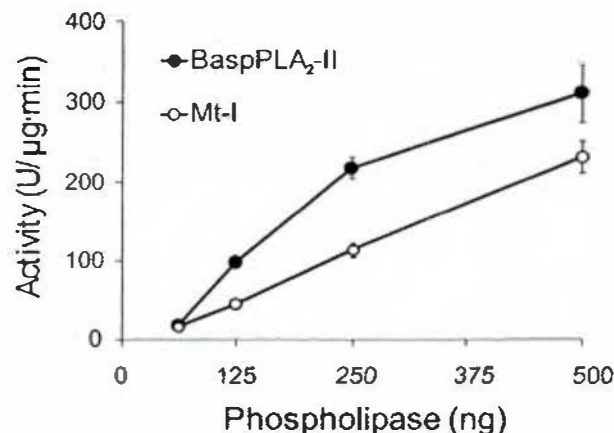


Fig. 3. Phospholipase A₂ activity of BaspPLA₂-II and myotoxin I (Mt-I) from *B. asper* venom upon phosphatidylcholine micelles, determined by the phenol red assay, as described in Materials and Methods. (●) BaspPLA₂-II; (○) myotoxin I. Each point represents mean ± SD of duplicates.

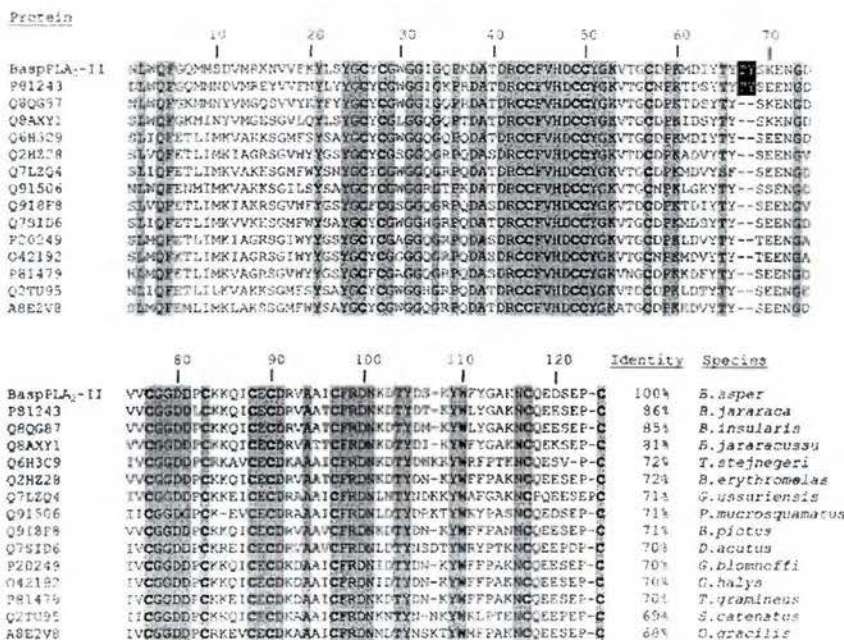


Fig. 4. Multiple sequence alignment of BaspPLA₂-II with related proteins in crotaline snake venoms. Protein codes correspond to the UniProtKB database at the ExPASy Proteomics Server. Alignments and percent identity calculations were performed with ClustalW [57]. Identical positions are shaded in gray, and cysteine residues are shown in boldface. A black background highlights the insertion of two amino acids at positions 69 and 70, only present in BaspPLA₂-II and the PLA₂ (P81243) of *B. jararaca*.

constructed with 15 acidic PLA₂s confirmed the close evolutionary relationship of BaspPLA₂-II with the enzymes of *B. jararaca*, *B. insularis*, and *B. jararacussu* from South America (Fig. 5), whereas the acidic PLA₂s from other South American *Bothrops*, such as *B. erythromelas* and *B. pictus*, were more distant from the clade of BaspPLA₂-II. On the other hand, the basic PLA₂ myotoxin I (P20474) from *B. asper* venom was markedly distant from BaspPLA₂-II in the cladogram, serving as an outgroup (Fig. 5), and confirming the divergent evolutionary pathways of acidic and basic PLA₂s even within the venom of a single viperid species.

A three-dimensional model of BaspPLA₂-II was built using as template the crystal structure of *B. jararacussu* acidic PLA₂. Both structures were superimposed, as shown in Fig. 6, resulting in average r.m.s.d. value for α -carbon backbones of 1.27 Å. The main structural deviation between the BaspPLA₂-II model and its template protein was predicted to occur immediately before the

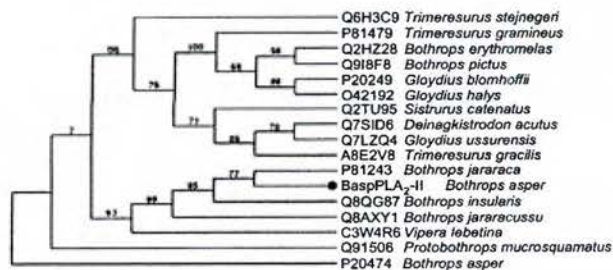


Fig. 5. Phylogenetic relationships of BaspPLA₂-II with other phospholipases A₂ from snake venoms. Protein codes are as described in Fig. 4. The cladogram was constructed using the maximum likelihood method implemented in the PhyML program at www.phylogeny.fr [58], and graphically represented with TreeDyn. Support values for branches are indicated as percentages. In addition to all proteins aligned in Fig. 4, a basic PLA₂ from *Bothrops asper* (P20474; myotoxin I), and an acidic PLA₂ from a non-crotaline viperid (*Vipera lebetina*; C3W4R6) were included as outgroups.

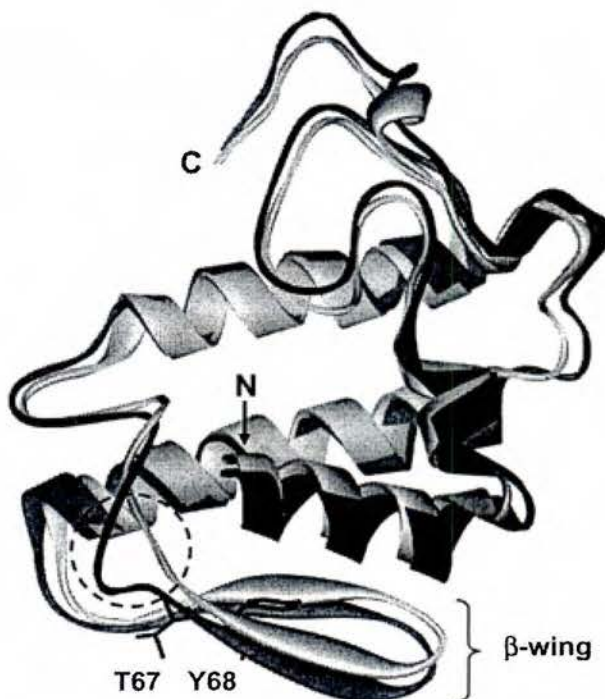


Fig. 6. Three-dimensional model of BaspPLA₂-II (dark gray), superimposed on the crystal structure of *B. jararacussu* acidic PLA₂ (PDB code 1ZL7; light gray), in ribbon representation. N- and C-termini are labeled. Amino acid side chains of T67 and Y68 of BaspPLA₂-II are shown in dark gray. The dashed circle highlights the large deviation in segment 62–65, immediately before the β -wing region, which bulges out in comparison to the structure of the template protein.

" β -wing" region, where residues 62–65 bulge out, probably due to the insertion of the additional Thr67 and Tyr68 (see alignments of Fig. 4) within the constraints of the relatively rigid scaffold of PLA₂s.

3.2. Biological activities of BaspPLA₂-II *in vitro* and *in vivo*

BaspPLA₂-II did not exert anticoagulant effect upon human plasma *in vitro*, up to a concentration of 100 μ g/ml. The mean time for clot formation in plasma incubated with this enzyme was 230 ± 34 s, while plasma incubated with PBS clotted after 217 ± 21 s ($p > 0.05$). Under the same conditions, myotoxin I prolonged the clotting time of plasma to 2400 ± 50 s ($p < 0.05$). BaspPLA₂-II also lacked anti-aggregating activity for ADP-stimulated human platelets, up to a concentration of 10 μ g/ml of enzyme. Similarly, this enzyme did not lyse skeletal muscle C2C12 myoblasts in culture, in contrast to the basic Lys49 myotoxin II used as a control (Fig. 7A). Exposure of these cells to BaspPLA₂-II, up to 40 μ g/well (400 μ g/ml) for 3 h, did not induce morphological alterations nor LDH release to the supernatants.

In vivo, the i.m. injection of BaspPLA₂-II (50 μ g) did not increase plasma CK levels after 3 h (Fig. 7B), indicating its lack of myotoxic activity. This was also confirmed by histological evaluation of the injected gastrocnemius muscle, obtained after 24 h, which showed a normal tissue morphology (Fig. 7C and D). Similarly to observations made on skeletal muscle, the histological evaluation of other tissues, including liver, lungs, heart, and kidneys, after the i.v. injection of 100 μ g of BaspPLA₂-II, indicated in all cases a normal morphology, similar to the corresponding tissues of control mice receiving a PBS injection (not shown). In addition, BaspPLA₂-II was not lethal to mice by the i.v. route, up to a dose of 100 μ g (5.6–6.2 μ g/g). No changes in the blood pressure of mice were recorded after the i.v. injection of this enzyme (10 μ g), whereas injection of the crude venom (4 μ g) under identical conditions caused a rapid and transient drop in this parameter (Fig. 8). One mouse was also injected with 25 μ g of BaspPLA₂-II, and there were no changes in blood pressure (data not shown). The only toxic effect induced by BaspPLA₂-II was a transient induction of local edema in the mouse footpad assay (Fig. 9).

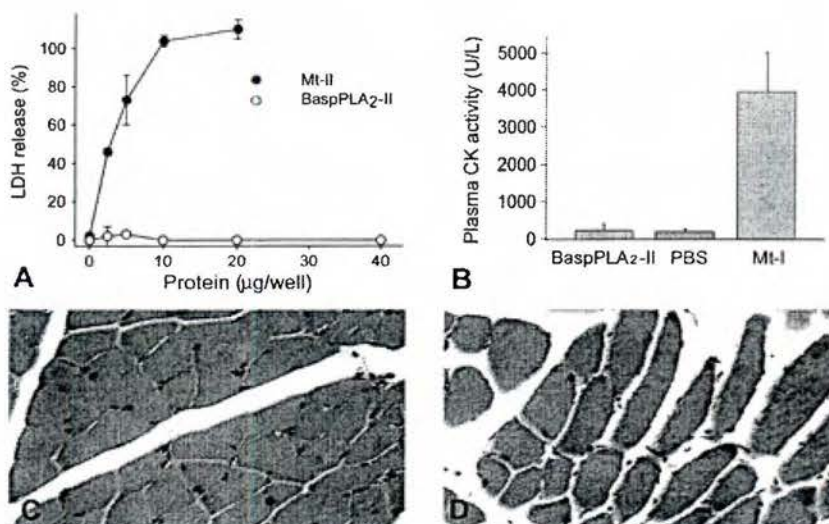


Fig. 7. Lack of muscle damaging activity of BaspPLA₂-II. (A) Cytotoxicity was evaluated upon cultured C2C12 skeletal muscle cells, exposed to BaspPLA₂-II or to *B. asper* myotoxin II as a control. Lactic dehydrogenase (LDH) release was determined after 3 h. Each point represents mean \pm SD of duplicate assays. (B) Myotoxic activity was evaluated by determining plasma creatine kinase (CK) activity 3 h after i.m. injection of BaspPLA₂-II (50 μ g/ μ l) or *B. asper* myotoxin I (50 μ g/ μ l) or PBS (50 μ l) as controls. (C) Histologic evaluation of hematoxylin–eosin stained sections of gastrocnemius muscle 24 h after the i.m. injection of BaspPLA₂-II (50 μ g/50 μ l) or (D) PBS (50 μ l).

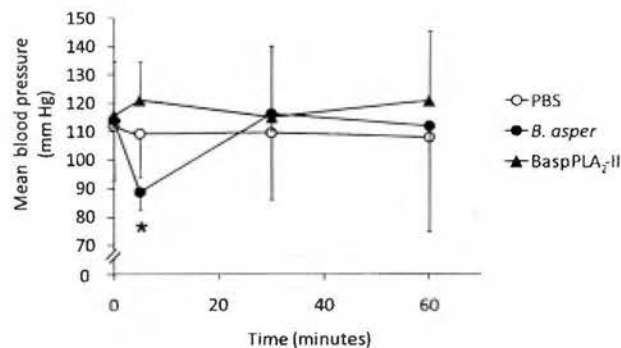


Fig. 8. Lack of hypotensive effect of BaspPLA₂-II. Mean blood pressure of mice was recorded before (0 min) and after (5 and 30 min) the i.v. injection of this enzyme (10 μ g), crude *B. asper* venom (4 μ g), or PBS alone, under identical conditions. Points represent mean \pm SD of five animals per group. The asterisk indicates a statistically significant ($p < 0.05$) difference.

3.3. Immunochemical analyses of BaspPLA₂-II

Rabbits immunized with BaspPLA₂-II by i.m. or by s.c. routes, respectively, produced an antibody response to the enzyme, as shown by the ability of their sera to form a precipitin line against both the purified BaspPLA₂-II or crude *B. asper* venom by gel immunodiffusion (Fig. 10A). The sera of these two rabbits had similar titers by EIA (data not shown). These rabbit antibodies recognized a single band of 15–16 kDa in crude *B. asper* venom subjected to immunoblotting analysis (Fig. 10B), corresponding to the expected migration of the enzyme, and further supporting the homogeneity of the immunizing preparation as well as the monospecificity of the antiserum. By EIA, rabbit antibodies to BaspPLA₂-II recognized the homologous antigen, but not the basic PLA₂ myotoxin I, resulting in a signal close to that of non-immune sera (Fig. 10C). Reciprocally, rabbit antibodies to myotoxin I readily recognized this basic protein in the EIA, but did not cross-react with the acidic BaspPLA₂-II (Fig. 10C). On the other hand, the equine

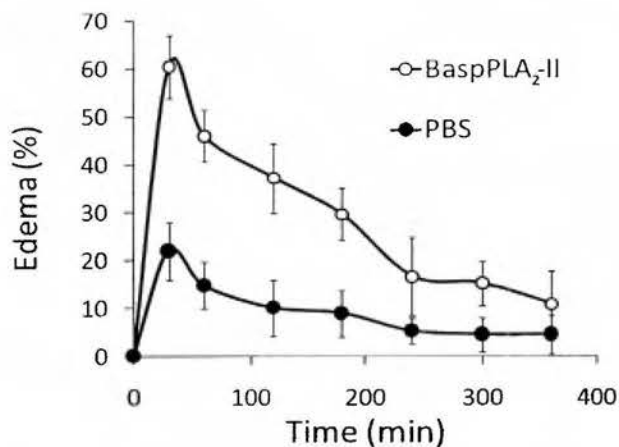


Fig. 9. Edema-forming activity of BaspPLA₂-II. Footpad thickness was determined before and after injection of the enzyme (10 µg dissolved in 50 µl PBS), and edema was expressed as the percentage increase relative to readings obtained before injection. (○) BaspPLA₂-II; (●) PBS control. Each point represents mean ± SD of four animals.

polyvalent antivenom produced at Instituto Clodomiro Picado clearly recognized BaspPLA₂-II by EIA, resulting in a titration curve comparable to that corresponding to antibodies against myotoxin I (Fig. 11A). However, as shown in Fig. 11B and C, when the ability of equine and rabbit antibodies to neutralize the enzymatic activity of BaspPLA₂-II was tested in preincubation assays, neutralization was only partial in the case of the polyvalent antivenom, whereas inhibition by the rabbit serum was null, even at a very high serum/enzyme ratio (4 ml/mg).

4. Discussion

The first complete biochemical and toxicological characterization of an acidic PLA₂ from the venom of *B. asper*, here named BaspPLA₂-II, is reported. This enzyme is monomeric, with a pI of 4.9 and a molecular mass of 14,212 ± 6 Da. According to its structural characteristics, this protein corresponds to the fraction described as peak 12 in the venom proteome of *B. asper* (Pacific region of Costa Rica), which matches its molecular mass, N-terminal and internal peptide sequences, and pI on 2-D gel electrophoresis [3]. On this basis, and considering the quantitative data generated by the

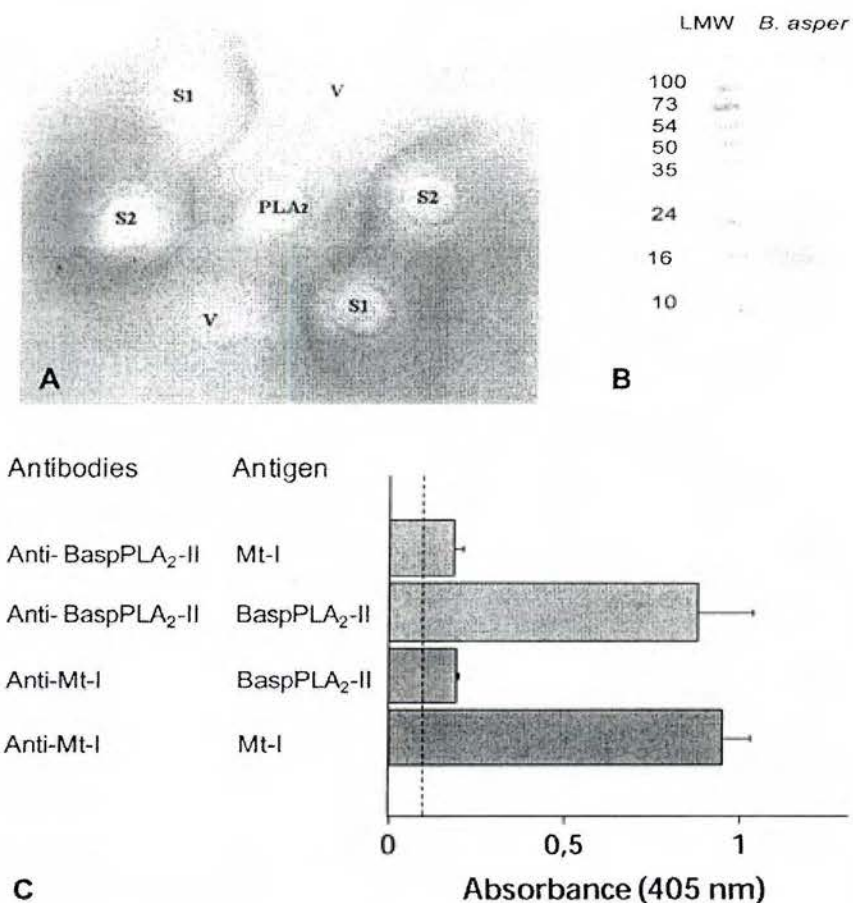


Fig. 10. (A) Gel immunodiffusion of rabbit antibodies to BaspPLA₂-II. Immune sera from two rabbits (S1, S2) precipitated BaspPLA₂-II, both in purified form (PLA₂) or in the crude *B. asper* venom (V), as identified by the fused precipitin lines. (B) Immunoblotting analysis of the rabbit serum to BaspPLA₂-II. Crude *B. asper* venom (30 µg, reduced) was subjected to SDS-PAGE (15%), transferred to nitrocellulose, and probed with the rabbit antibodies as described in Materials and Methods. (C) Antigenic comparison of BaspPLA₂-II and *B. asper* myotoxin I (Mt-I) by enzyme-immunoassay. Both antigens were adsorbed to microplates and probed with rabbit antibodies against BaspPLA₂-II or Mt-I, respectively. The dashed line represents the absorbance value of non-immune rabbit sera.

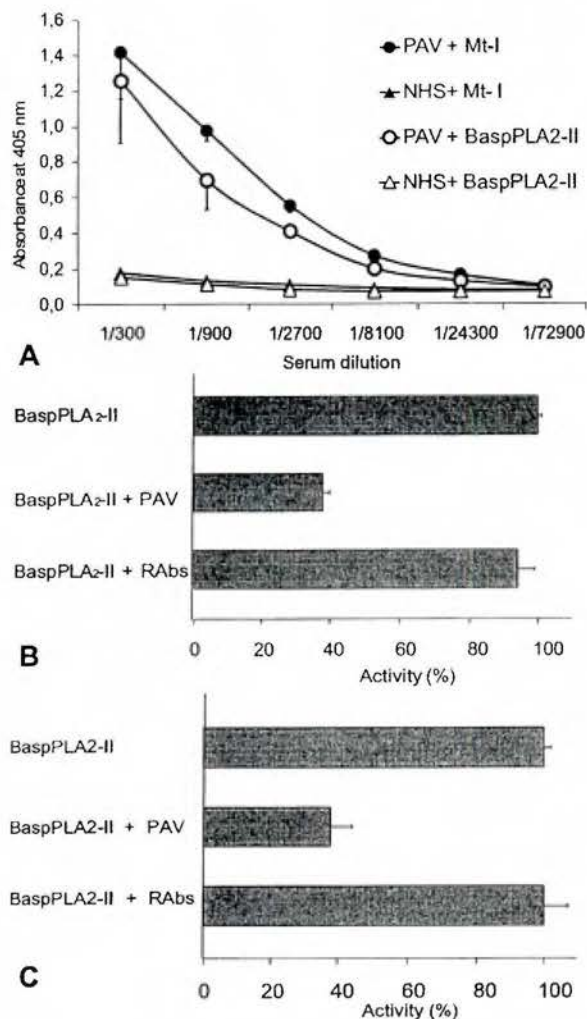


Fig. 11. Titration of antibodies to BaspPLA₂-II or to *B. asper* myotoxin I (Mt-I) in the equine polyvalent (Crotalinae) antivenom from Instituto Clodomiro Picado (PAV), determined by EIA (A). NHS: normal horse serum. Points represent mean \pm SD of triplicate wells. Neutralization of PLA₂ activity of BaspPLA₂-II by polyvalent antivenom or rabbit immune serum (RAbs), determined by the phenol red (B) or titrimetric (C) assays. Bars represent mean \pm SD of duplicates.

proteomic analysis of this venom, it is estimated that BaspPLA₂-II represents 6.3% of its proteins [3,39].

BaspPLA₂-II is composed of 124 amino acids, presenting Asp49 and the characteristic pattern of half-Cys residues of group IIA PLA₂s [8]. These findings place BaspPLA₂-II within the catalytically active enzymes, consistent with all acidic PLA₂s purified from viperid snake venoms, where Asp49 appears so far to be an absolutely conserved position. The phospholipolytic activity of BaspPLA₂-II was confirmed using phosphatidylcholine micelles as substrate, and shown to be slightly higher than the activity of myotoxin I, a basic PLA₂ of the same venom. In general, snake venom acidic PLA₂s tend to be more active in catalysis than basic isoforms, in spite of the stronger toxicity of the latter [11,13,14].

The primary structure of BaspPLA₂-II presents high identity values in comparison to other acidic enzymes within the genus *Bothrops*, particularly P81243 from *B. jararaca* [19], Q8QG87 from *B. insularis* [40], and Q8AXY1 from *B. jararacussu* [17]. Of these, only

the PLA₂ from *B. jararaca* shares with BaspPLA₂-II the feature of having 124 amino acids (as opposed to the pattern of 122 residues of most of these enzymes), caused by two insertions at positions 67 and 68. Interestingly, the three proteins with highest similarity to BaspPLA₂-II express some toxic activities, such as inhibition of platelet aggregation (P81243 and Q8AXY1), myotoxicity (Q8QG87), and hypotensive effect (Q8AXY1), whereas the toxicological characterization of BaspPLA₂-II, here presented, evidenced none of these actions. Negative results were obtained for anticoagulant, anti-platelet aggregation, cytotoxic, myotoxic, hypotensive, and lethal effects of BaspPLA₂-II. The growing structural information on acidic PLA₂s that differ in their toxic activities, or even lack toxicity, may become of value to address the complex structure–function relationships that govern this highly diverse group of snake venom proteins. The elucidation of an increasing number of venom proteomes, or venomes, has revealed that PLA₂s constitute percentages as large as 30–60% in some species [39,41], strongly arguing for their relevance in such secretions. In the case of BaspPLA₂-II, with the exception of a transient, moderate edema-inducing effect, the observed lack of toxic activities implies that its contribution to the overall physiopathology of envenomings by *B. asper* is probably of marginal relevance. Rather, the present results suggest that this enzyme could play mainly a digestive function in this venom, by contributing to the hydrolysis of phospholipids of the prey, a hypothesis that would need to be addressed. Alternatively, this “non-toxic” enzyme could have yet unknown toxic actions upon the physiology of prey other than rodents. Since it is known that neonate and juvenile specimens of *B. asper* feed on ectothermic prey, i.e. frogs and lizards [42], it would be relevant to assess the toxic profile of BaspPLA₂-II in these prey.

The induction of edema by BaspPLA₂-II is consistent with reports of this activity being expressed by a number of acidic PLA₂s from snake venoms [14,16,17,20–22,40,43,44]. Mechanisms that underlie this effect have been attributed to phospholipid hydrolysis, resulting in the release of precursors of eicosanoids and platelet-activating factor, or to the degranulation of mast cells, with subsequent release of vasoactive amines [14,45,46].

BaspPLA₂-II was devoid of myotoxic activity *in vivo*, as determined by the lack of plasma CK increase and by histological observation. This result was in agreement with the absence of cytolytic action upon C2C12 cells, known to represent a good correlate for myotoxicity in the case of group IIA PLA₂s [34]. These findings are consistent with observations in most of the acidic PLA₂s purified from snake venoms, which generally lack myotoxicity. However, some recently isolated acidic PLA₂s display myotoxicity *in vivo* [14,20,21,40,47]. Although it is clear that the catalytic activity of PLA₂s is not a sufficient requirement to generate myotoxicity *per se*, the structural determinants of such differences in myotoxicity among acidic enzymes are unknown, and their identification poses a challenging question.

The fact that BaspPLA₂-II was not lethal up to a dose of 5.9 μ g/g, and the lack of systemic toxicity to major organs, is also in line with literature reports for several acidic PLA₂s which display a very low or no lethal activity. It also indicates that BaspPLA₂-II does not correspond to the acidic PLA₂ isolated from *B. asper* venom by Ferlan and Gubenšek [24], which had a lethal intravenous activity of 2 μ g/g. A comparison of partial amino acid sequences between BaspPLA₂-II and another acidic PLA₂ isolated from the venom of *B. asper* from Panamá (to be named BaspPLA₂-I, personal communication of A.M. Soares, University of São Paulo, Brasil) revealed several structural differences. Therefore, the different acidic PLA₂ isoforms that are present in *B. asper* venom may vary in the expression of toxic effects.

BaspPLA₂-II did not present anticoagulant activity, an effect which has been reported for a number of acidic PLA₂s from viperid

snake venoms [20,22]. Moreover, anti-platelet aggregating activity and hypotensive effect were also absent in BaspPLA₂-II, again at variance with other acidic PLA₂s [14,17,19–23,48–50]. It will be important to determine in future studies if the hypotensive effect of whole *B. asper* venom is induced by other acidic PLA₂ isoforms or by proteins/peptides from other families. Interestingly, the proteomic analyses of *B. asper* venoms from both versants of Costa Rica (Caribbean and Pacific) indicate the absence of bradykinin-potentiating peptides [3], known as important mediators of hypotension in other *Bothrops* species [51].

Immunochemical analyses with antibodies raised against BaspPLA₂-II revealed that this acidic enzyme differs antigenically from the basic PLA₂s in *B. asper* venom. This conclusion was also supported by the reciprocal analyses using antibodies to myotoxin I, which did not recognize BaspPLA₂-II. The antigenic divergence between snake venom PLA₂s from elapids and viperids has been demonstrated in previous studies [52,53]. However, the present results offer a first evidence of antigenic divergence among acidic and basic PLA₂s within viperids, in this case, within the venom of a single species. Thus, despite a sequence identity of 52% between *B. asper* myotoxin I and BaspPLA₂-II, antibodies against each of the two were not cross-reactive.

Interestingly, despite the clear presence of antibodies to BaspPLA₂-II in both its homologous rabbit serum and in the equine polyvalent antivenom, their ability to neutralize its catalytic activity was poor. This suggests the possibility that BaspPLA₂-II may induce antibodies towards immunodominant non-neutralizing epitopes, in sharp contrast with the case of basic PLA₂s of this venom, which are well neutralized by antibodies from various sources [35,54–56]. Nevertheless, the lack of major toxic activities of BaspPLA₂-II, as shown in the present study, predicts that its poor neutralization by antivenoms should not be of concern from a therapeutic point of view.

In conclusion, the newly characterized protein BaspPLA₂-II is a monomeric, acidic PLA₂ from *B. asper* (Pacific versant of Costa Rica) venom which, due to its lack of major toxic actions reported for this type of proteins, probably has a marginal role in envenomings by this snake species. This enzyme might play a digestive function. The elucidation of its complete primary structure, here reported, will be of value in future comparative studies attempting to identify the molecular determinants of toxic activities by some acidic PLA₂s in crotaline venoms.

Acknowledgements

Financial support to this study by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (Madrid, Spain), the CRUSA-CSIC Program, CONARE, and Vicerrectoría de Investigación (Universidad de Costa Rica, project 741-A9-506) is gratefully acknowledged. We also thank Dr Teresa Escalante, Dr Mahmood Sasa, and the staff of Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA-UCR) for their valuable help in various aspects of this study. This work was performed in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree of J. Fernández at the University of Costa Rica.

References

- [1] J.M. Gutiérrez, Clinical toxicology of snakebite in Central America. in: J. Meier, J. White (Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, Boca Raton, 1995, pp. 645–665.
- [2] M. Sasa, S. Vázquez, Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990–2000. *Toxicon* 41 (2003) 19–22.
- [3] A. Alape-Girón, L. Sanz, J. Escolano, M. Flores-Díaz, M. Madrigal, M. Sasa, J.J. Calvete, Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3556–3571.
- [4] D.L. Scott, S.P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.H. Geib, P.B. Sigler, Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 250 (1990) 1541–1546.
- [5] R.M. Kini, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 42 (2003) 827–840.
- [6] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. in: R.M. Kini (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, Chichester, 1997, pp. 321–352.
- [7] C. Montecucco, J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2897–2912.
- [8] R.H. Schaloske, E.A. Dennis, The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1246–1259.
- [9] B. Lomonte, Y. Angulo, L. Calderón, An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42 (2003) 885–901.
- [10] B. Lomonte, Y. Angulo, M. Sasa, J.M. Gutiérrez, The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein Pept. Lett.* 16 (2009) 860–876.
- [11] P. Rosenberg, The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. in: J.B. Harris (Ed.), *Natural Toxins Animal, Plant and Microbial*. Oxford Science Publications, Oxford, 1986, pp. 129–174.
- [12] I. Krizaj, J. Siigur, M. Samel, V. Cotic, F. Gubenšek, Isolation, partial characterization, and complete amino acid sequence of the toxic phospholipase A₂ from the venom of the common viper, *Vipera berus berus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1157 (1993) 81–85.
- [13] P. Rosenberg, Phospholipases. in: W.T. Shier, D. Mebs (Eds.), *Handbook of Toxicology*. Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 67–277.
- [14] N.A. Santos-Filho, L.B. Silveira, C.Z. Oliveira, C.P. Bernardes, D.L. Menaldo, A.L. Fuly, E.C. Arantes, S.V. Sampaio, C.C. Mamede, M.E. Beletti, F. de Oliveira, A.M. Soares, A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 52 (2008) 908–917.
- [15] A.L. de Araújo, F. Radvanyi, C. Bon, Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. *Toxicon* 32 (1994) 1069–1081.
- [16] J.J. Daniele, I.D. Bianco, G.D. Fidelio, Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 318 (1995) 65–70.
- [17] S.H. Andrião-Escarso, A.M. Soares, M.R. Fontes, A.L. Fuly, F.M. Corrêa, J.C. Rosa, L.J. Greene, J.R. Giglio, Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 723–732.
- [18] H.E. Nisenbom, J.C. Perazzo, A.J. Monserrat, J.C. Vidal, Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. *Toxicon* 24 (1986) 807–817.
- [19] S.M. Serrano, A.P. Reichl, R. Mentele, E.A. Auerswald, M.L. Santoro, C.A. Sampaio, A.C. Camargo, M.T. Assakura, A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (1999) 26–32.
- [20] D.F. Ketelhut, M.H. de Mello, E.L. Veronese, L.E. Esmeraldino, M.T. Murakami, R.K. Arni, J.R. Giglio, A.C. Cintra, S.V. Sampaio, Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 10 (2003) 983–991.
- [21] R.S. Rodrigues, L.F. Izidoro, S.S. Teixeira, L.B. Silveira, A. Hamaguchi, M.I. Homsí-Brandeburgo, H.S. Selistre-de-Araújo, J.R. Giglio, A.L. Fuly, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 50 (2007) 153–165.
- [22] P.G. Roberto, S. Kashima, S. Marcussi, J.O. Pereira, S. Astolfi-Filho, A. Nomizo, J.R. Giglio, M.R. Fontes, A.M. Soares, S.C. França, Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein J.* 23 (2004) 273–285.
- [23] J.C. de Albuquerque Modesto, P.J. Spencer, M. Fritzen, R.C. Valença, M.L. Oliiva, M.B. da Silva, A.M. Chudzinski-Tavass, M.C. Guarnieri, BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inducer of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 377–384.
- [24] I. Ferlan, F. Gubenšek, Phospholipases of *Bothrops asper* venom. *Period. Biol.* 80 (1978) 31–36.
- [25] A.C. Alagón, R.R. Molinar, L.D. Possani, P.L. Fletcher, J.E. Cronan, J.Z. Julia, Venom from the snake *Bothrops asper* Garman. Purification and characterization of three phospholipases A₂. *Biochem. J.* 185 (1980) 695–704.
- [26] E. Moreno, A. Alape, M. Sánchez, J.M. Gutiérrez, A new method for the detection of phospholipase A₂ variants: identification of isoforms in the venoms of newborn and adult *Bothrops asper* (terciopelo) snakes. *Toxicon* 26 (1988) 363–371.
- [27] J.M. Gutiérrez, C.L. Ownby, G.V. Odell, Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22 (1984) 115–128.
- [28] B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27 (1989) 725–733.

- [29] M.T. Murakami, A. Gabdoulkhalov, N. Genov, A.C.O. Cintra, C. Betzel, R.K. Arni, Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states. *Biochimie* 88 (2006) 543–549.
- [30] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.
- [31] A.L. de Araújo, F. Radvanyi, Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25 (1987) 1181–1188.
- [32] V.P. Dole, A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.* 35 (1956) 150–154.
- [33] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, F. Chaves, E. Moreno, L. Cerdas, Pharmacological activities of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C (1986) 159–164.
- [34] B. Lomonte, Y. Angulo, S. Rufini, W. Cho, J.R. Giglio, M. Ohno, J.J. Daniele, P. Geoghegan, J.M. Gutiérrez, Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon* 37 (1999) 145–158.
- [35] B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, E. Moreno, L. Cerdas, Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 25 (1987) 443–449.
- [36] Y. Angulo, R. Estrada, J.M. Gutiérrez, Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. *Toxicon* 35 (1997) 81–90.
- [37] B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, G. Rojas, L. Calderón, Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. *Toxicon* 29 (1991) 695–702.
- [38] A.V. Pérez, A. Rucavado, L. Sanz, J.J. Calvete, J.M. Gutiérrez, Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41 (2008) 12–17.
- [39] J.J. Calvete, P. Juárez, L. Sanz, Snake venomomics. Strategy and applications. *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1405–1414.
- [40] J.C. Cogo, S. Lilla, G.H. Souza, S. Hyslop, G. de Nucci, Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Biochimie* 12 (2006) 1947–1959.
- [41] J.J. Calvete, L. Sanz, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, Venomomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 583 (2009) 1736–1743.
- [42] M. Sasa, D.K. Wasko, W.W. Lamar, Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon* 54 (2009) 904–922.
- [43] A.L. Fuly, A.L. de Miranda, R.B. Zingali, J.A. Guimarães, Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 1589–1597.
- [44] I.H. Tsai, Y.M. Wang, Y.H. Chen, A.T. Tu, Geographic variations, cloning, and functional analyses of the venom acidic phospholipases A₂ of *Crotalus viridis viridis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 411 (2003) 289–296.
- [45] E.C. Landucci, R.C. de Castro, M. Toyama, J.R. Giglio, S. Marangoni, G. De Nucci, E. Antunes, Inflammatory oedema induced by the Lys49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 1289–1294.
- [46] C. Teixeira, Y. Cury, V. Moreira, G. Picolo, F. Chaves, Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 54 (2009) 988–997.
- [47] A.L. Fuly, S. Calil-Elias, R.B. Zingali, J.A. Guimarães, P.A. Melo, Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (bush-master) snake venom. *Toxicon* 38 (2000) 961–972.
- [48] X. Liu, H. Pan, G. Yang, X. Wu, G. Zhou, Cloning, expression and biochemical characterization of a basic-acidic hybrid phospholipase A₂-II from *Agkistrodon halys pallas*. *Biochim. Biophys. Acta* 1431 (1999) 157–165.
- [49] A.J. Magro, M.T. Murakami, S. Marcussi, A.M. Soares, R.K. Arni, M.R. Fontes, Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 (2004) 24–31.
- [50] Y. Wang, G. Cui, M. Zhao, J. Yang, C. Wang, R.W. Giese, S. Peng, Bioassay-directed purification of an acidic phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys pallas* venom. *Toxicon* 51 (2008) 1131–1139.
- [51] M.A. Hayashi, A.C. Camargo, The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 45 (2005) 1163–1170.
- [52] A. Ménez, Molecular immunology of snake toxins. *Pharmacol. Ther.* 30 (1985) 91–113.
- [53] J.L. Middlebrook, I.I. Kaiser, Immunological relationships of phospholipase A₂ neurotoxins from snake venoms. *Toxicon* 27 (1989) 965–977.
- [54] B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, E. Mata, Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 23 (1985) 807–813.
- [55] B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, E. Carmona, M.E. Rovira, Equine antibodies to *Bothrops asper* myotoxin II: isolation from polyvalent antivenom and neutralizing ability. *Toxicon* 28 (1990) 379–384.
- [56] B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, M. Ramírez, C. Díaz, Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. *Toxicon* 30 (1992) 239–245.
- [57] D. Higgins, J. Thompson, T. Gibson, J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [58] A. Dereeper, V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J.M. Claverie, O. Gascuel, Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36 (web server issue) (2008) W465–W469.