

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

**HIDRÓLISIS DEL FUCOIDÁN Y EVALUACIÓN DE SUS FRAGMENTOS EN
CUANTO A SU CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LA ACTIVIDAD DE
MIOTOXINAS DEL VENENO DE *Bothrops asper*.**

Karol Azofeifa Chinchilla

Tutor: Dr. Bruno Lomonte V.

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, 2007



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 04 de julio del año 2007 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **KAROL AZOFEIFA CHINCHILLA**, carné A10392, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRACTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA y el título profesional de DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. José Antonio Gene **PRESIDENTE**

Dr. Bruno Lomonte

Dr. José María Gutiérrez

Dra. Yamileth Angulo

Dra. Alexandra Rucavado

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **KAROL AZOFEIFA CHINCHILLA**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

La postulante **KAROL AZOFEIFA CHINCHILLA**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "Hidrólisis del fucoïdon y evaluación de su fragmentos en cuanto a su capacidad neutralizante de la actividad de miotoxinas del veneno de *bothrops asper*".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interroga a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 100

ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 12:20 p.m. horas.



Dr. José Antonio Gene
Presidente



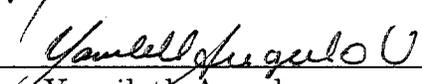
Dr. José María Gutiérrez



Dra. Alexandra Rucavado



Dr. Bruno Lomonte



Dra. Yamileth Angulo



Karol Azofeifa Chinchilla
Postulante

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la salud, sabiduría y fortaleza para concluir con este proyecto.

A Bruno Lomonte, por su dedicado esfuerzo, apoyo y guía durante la elaboración de la investigación. A Yamilet Angulo y José María Gutiérrez por sus recomendaciones y aportes a la investigación.

A mi familia por su esfuerzo, apoyo, comprensión y confianza durante toda la carrera.

INDICE GENERAL

HOJAS DE FIRMAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE ABREVIACIONES	vi
INTRODUCCIÓN	1
Ofidismo en Costa Rica	1
Venenos de las serpientes y sus efectos	2
Tratamiento del accidente ofídico	6
El fucoidán como inhibidor de la miotoxicidad causada por venenos de serpientes	6
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS	36

LISTA DE ABREVIACIONES

Miotoxina tipo fosfolipasa A₂ (PLA₂)
Ácido aspártico (Asp)
Lisina (Lys)
KiloDaltons (kDa)
Daltons (Da)
Mililitros (mL)
Minutos (min)
Centímetros (cm)
Horas (hr)
Molar (M)
Nanometros (nm)
Milímetros (mm)
Gramos (g)
Microlitros (μl)
Microgramos (μg)
Fragmento de fucoidán de alto peso molecular (F(H))
Fragmento de fucoidán de bajo peso molecular (F(L))
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
Miotoxina (Mt)
Ven (Veneno)

RESUMEN

El fucoidán es un inhibidor de la actividad de las miotoxinas de *Bothrops asper* y otras fosfolipasas A₂ miotóxicas relacionadas. Por medio de hidrólisis ácida de este polisacárido y su posterior separación por medio de filtración en gel en columna Sephadex G-100, se obtuvieron dos fragmentos de fucoidán: uno de peso molecular alto (FH) y otro de peso molecular bajo (FL) y ambos se compararon en cuanto a su capacidad neutralizante de la actividad citotóxica y miotóxica de la miotoxina II de *B. asper*, así como de la actividad miotóxica del veneno crudo de *B. asper*. En experimentos realizados en ratones se estableció una dosis eficaz 50 (DE₅₀) para el fragmento de alto peso molecular de 0.27 y de 0.88 para el fragmento de bajo peso molecular, a partir de lo cual se estimó que la fracción de alto peso molecular es aproximadamente 3 veces más potente que el fragmento de bajo peso molecular. Ambos fragmentos demostraron una capacidad significativa de disminuir la miotoxicidad de la miotoxina II de *B. asper*, cuando fueron administrados intramuscularmente en el mismo sitio de inoculación de la miotoxina, sin embargo no se observó diferencia significativa entre ambos fragmentos de fucoidán. Cuando los fragmentos se administraron vía intravenosa tras la inoculación intramuscular de la miotoxina ninguno de los dos fragmentos mostró capacidad de disminuir la miotoxicidad, y cuando se probaron tras la inoculación del veneno crudo de *B. asper*, solo el fragmento de alto peso molecular tuvo la capacidad de disminuir de manera significativa la miotoxicidad causada por el veneno. Los resultados indican que en este modelo experimental de mionecrosis inducida por un veneno botrópico o una miotoxina purificada, la utilización de una forma de fucoidán de menor peso molecular no presenta características ventajosas con respecto a formas de mayor peso molecular. A la vez, los resultados confirman que la administración rápida de fucoidán *in situ* puede reducir significativamente el daño muscular ocasionado por una miotoxina o por un veneno crudo, como ha sido descrito en estudios previos.

INTRODUCCIÓN

Ofidismo en Costa Rica

Costa Rica se encuentra en un área tropical, y gracias a esto existe una gran diversidad de flora y fauna distribuida por todo el territorio nacional. Las serpientes forman parte de esta biodiversidad; se encuentran alrededor de 135 especies, distribuidas en zonas muy diversas del país. Veintiuno de estas especies de serpientes son venenosas, y están agrupadas en tres familias: (a) la familia Hydrophiidae cuenta con una sola especie, la serpiente de mar, *Pelamis platurus*; (b) la familia Elapidae, incluye 4 especies comúnmente llamadas "corales", del género *Micrurus*; y (c) la familia Viperidae, que incluye 16 especies popularmente conocidas como "tobobas". Estas últimas son las que causan el mayor número de envenenamientos ofídicos en el país, dentro de las que se encuentran los géneros *Agkistrodon*, *Lachesis*, *Crotalus*, *Bothrops*, *Bothriechis*, *Porthidium*, *Atropoides* y *Cerrophidion* (Solórzano, 2004).

Las mordeduras por serpientes son más comunes en países tropicales y en vías de desarrollo, por lo cual existe un alto sub-registro en las estadísticas, el cual se atribuye a diferentes causas como la aplicación de tratamientos tradicionales y por consiguiente no acudir a los centros hospitalarios, también por muertes que se presentan en comunidades pequeñas y que no son reportadas adecuadamente (Gutiérrez et al., 2006). En Costa Rica ocurren aproximadamente 600 mordeduras de serpiente y 5 muertes atribuidas a estas por año, lo que representa una incidencia aproximada de 15.9 casos por 100 000 habitantes por año. En Centroamérica el número total de envenenamientos ofídicos anuales se estima entre 4500 y 5000. En Costa Rica ha existido un abordaje integral del accidente ofídico desde hace varias décadas y además el suero antiofídico tiene un abastecimiento adecuado, lo cual ha permitido disminuir la mortalidad a través de los años, y actualmente se mantiene una tasa de letalidad inferior al 1%. En otros países de Centroamérica, se estima que la mortalidad por los envenenamientos de serpientes es mayor. En cuanto al sitio anatómico de la mordedura, el 50% de los casos ocurren en los pies y el 30% en extremidades superiores (Gutiérrez et al., 1999).

La especie que causa la mayor cantidad de accidentes ofídicos en Costa Rica es la *Bothrops asper*, conocida popularmente como "terciopelo". Aproximadamente un 50% de los casos reportados son debidos a esta especie, distribuída prácticamente en todo el país. El grupo más afectado son los hombres jóvenes, agricultores, lo que hace que las mordeduras de serpientes sean una enfermedad ocupacional. Los niños son otro grupo que comúnmente es afectado (Gutiérrez et al., 1999, 2006). Se han observado variaciones estacionales en la incidencia de mordeduras de serpientes, lo cual se atribuye a cambios climáticos, especialmente en cuanto a lluvias y temperatura, lo cual a su vez se relaciona también con los ciclos de la actividad agrícola. La incidencia de envenenamientos se incrementa en la temporada lluviosa (Gutiérrez et al., 1999, 2006). De todos los casos reportados por año, menos del 1% son causados por serpientes del grupo de las "corales" (Gutiérrez et al., 1999). Por otra parte, la serpiente de mar no representa un peligro para la población, pues por su anatomía y localización es muy difícil que cause una mordedura.

Venenos de las serpientes y sus efectos

Los venenos de animales cumplen diferentes funciones en la naturaleza. En el caso de los venenos de las serpientes, son importantes para su alimentación, ya que son utilizados para inmovilizar a la presa e iniciar su digestión. También pueden ser importantes como parte de un comportamiento defensivo contra posibles depredadores. En las serpientes, los venenos son producidos en glándulas especializadas, con células de tipo epitelial que vierten su secreción en canalículos que desembocan en un receptáculo o lumen en donde son almacenados hasta su expulsión. El lumen se continúa por un conducto que desemboca en el canal del colmillo inoculador (Bolaños, 1984).

Las serpientes de la familia Viperidae pueden causar un cuadro de lesión muy grave en el sitio de la mordedura, con dolor fuerte, edema, hemorragia y necrosis de tejido. Esto puede dejar en los pacientes secuelas permanentes, e incluso la amputación del miembro afectado, en los casos muy graves. Además, estos venenos generan un cuadro clínico sistémico que puede llevar a la muerte, que incluye efectos como alteraciones en la

coagulación sanguínea, hemorragias internas, hemólisis intravascular, daño renal, y todo esto puede llevar a un choque cardiovascular o a un fallo renal grave (Otero et al., 2002). Los efectos sistémicos se manifiestan pocas horas después de que ocurrió la mordedura, por lo que, con un tratamiento adecuado y a tiempo, se pueden controlar. Sin embargo, los efectos locales inician pocos minutos después de la mordedura, por lo que el daño tisular es más difícil de prevenir. Cuando la persona afectada llega al centro médico para recibir tratamiento, probablemente ya parte del tejido en el sitio de la mordedura va a estar lesionado (Chaves et al., 1996).

Los venenos de serpientes están constituidos por diferentes péptidos y proteínas tóxicas entre las que se encuentran miotoxinas, hemorraginas, toxinas coagulantes, nefrotoxinas y neurotoxinas. Estas toxinas pueden provocar severos daños a tejidos y órganos, e importantes alteraciones sistémicas que incluso pueden llevar a la muerte al paciente (Gutiérrez et al., 1999). La severidad de los envenenamientos por mordeduras de serpientes es muy variable y depende de varios factores como la cantidad de veneno inoculado (*B. asper* generalmente inyecta mayores volúmenes de veneno que las otras serpientes, por lo tanto esta especie provoca cuadros clínicos de mayor riesgo), el sitio anatómico de la mordedura (las más cercanas al tronco y a la cabeza son más peligrosas, en comparación con las mordeduras en extremidades), el peso y la talla de la persona afectada, así como su estado fisiológico general (en niños las mordeduras por serpientes tienden a complicarse con más frecuencia, esto en parte debido al reducido volumen de distribución, que permite al veneno actuar con mayor rapidez a nivel sistémico) (Gutiérrez et al., 1999).

Las miotoxinas son componentes de los venenos que inducen daño irreversible a las fibras del músculo esquelético; son muy abundantes en los venenos de serpientes y pueden causar tanto daños locales en el sitio de inoculación, como daños a nivel sistémico (Gutiérrez y Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003). Hidrolasas como las metaloproteinasas, las fosfolipasas A₂ y posiblemente las hialuronidasas son las principales responsables del daño tisular local observado en los envenenamientos por mordeduras de serpientes (Gutiérrez et al., 2006). Los efectos locales inician en pocos minutos y se caracterizan por dolor, edema, hemorragia, y mionecrosis. La hemorragia se produce por la acción de las

hemorraginas, las cuales son metaloproteinasas dependientes de zinc que degradan los componentes de la lámina basal de los capilares y vénulas, causando que los mismos se colapsen y se produzca extravasación de líquidos y células. Esto contribuye a la necrosis tisular, ya que afecta la perfusión sanguínea, originando isquemia. El edema es de origen multifactorial: por una parte los venenos afectan directamente el endotelio, originando la exudación del plasma; por otro lado, estos venenos liberan una serie de mediadores a partir de precursores endógenos, como histamina, kininas, prostaglandinas y anafilotoxinas C3a y C5a. El edema también contribuye a la isquemia (Gutiérrez et al., 1999).

La necrosis del tejido muscular es una de las más importantes complicaciones médicas por mordeduras de serpientes, especialmente cuando dichos accidentes no son atendidos rápidamente y pasan más de dos horas desde la mordedura hasta el ingreso al centro médico. Esta complicación puede llevar a la pérdida irreversible de masa muscular, amputación del miembro afectado o pérdida de la movilidad (Otero et al., 2002). La mionecrosis se desencadena tanto por la isquemia que se genera a nivel local, como por la acción directa de las miotoxinas de los venenos (Gutiérrez et al., 1999). Las miotoxinas de los venenos de serpientes se han clasificado de manera general en 3 grupos: (a) las miotoxinas pequeñas, las cuales no poseen actividad enzimática y están constituidas por una cadena peptídica de 42-45 aminoácidos; (b) las cardiotoxinas, que tampoco poseen actividad enzimática y son cadenas de proteínas de aproximadamente 60 aminoácidos; y (c) las fosfolipasas A₂ (PLA₂), las cuales representan el grupo más grande y el cual se subdivide en miotoxinas neurotóxicas y no neurotóxicas. Las PLA₂ neurotóxicas se encuentran en los venenos de serpientes de la familia Elapidae y son responsables de los efectos especialmente sistémicos que causan. Las PLA₂ no neurotóxicas son componentes frecuentemente encontrados en los venenos de serpientes de la familia Viperidae y aunque tienen una actividad letal baja, por las altas concentraciones en las que se encuentran en los venenos, estas miotoxinas son las responsables principales en el daño muscular local en los accidentes ofídicos (Lomonte et al., 2003).

Las miotoxinas PLA₂ no neurotóxicas se subdividen en 2 grupos. El primero se caracteriza por proteínas que poseen actividad enzimática y se conocen como el grupo de

PLA₂ tipo Asp49. Estas toxinas catalizan la hidrólisis de la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos, en una reacción dependiente de calcio que genera ácidos grasos y lisofosfolípidos. El segundo grupo es el de las PLA₂ tipo Lys49, las cuales carecen de actividad enzimática, pero igualmente causan la destrucción del músculo esquelético y el consecuente aumento en la actividad creatina quinasa en plasma (Lomonte et al., 2003; Gutiérrez y Ownby, 2003).

Las miotoxinas PLA₂ afectan la integridad de las membranas celulares, tanto por mecanismos catalíticos, como por mecanismos independientes de actividad enzimática. En general estas miotoxinas provocan un influjo importante de calcio, lo cual inicia una serie de eventos degenerativos para las células, como hipercontracción y activación de enzimas dependientes de calcio, lo que culmina con un daño celular irreversible. Paralelamente a la mionecrosis se desarrolla un proceso inflamatorio, con la consecuente liberación de sustancias quimiotácticas que provoca la llegada de células inflamatorias, especialmente neutrófilos y macrófagos, las cuales remueven los restos necróticos y preparan al tejido para la regeneración muscular (Gutiérrez y Ownby, 2003).

Las hidrolasas de los venenos de serpientes son homólogas a enzimas endógenas de mamíferos. La industria farmacéutica ha desarrollado una gran cantidad de inhibidores para estas enzimas de los mamíferos, ya que participan en diferentes procesos patológicos. Estos inhibidores pueden representar una oportunidad para prevenir el daño tisular local en los envenenamientos por mordeduras de serpientes. Las características que brindan ventajas a estos inhibidores son que usualmente son de bajo peso molecular, lo que les permite difundir mejor en los tejidos, y el hecho de que estos inhibidores son efectivos contra una gran cantidad de metaloproteinasas y PLA₂ de venenos de diferentes especies, ya que muchos de ellos actúan en sitios de las enzimas que son altamente conservados (Gutiérrez et al., 2006).

Tratamiento del accidente ofídico

La terapia para el envenenamiento por mordeduras de serpientes se basa en el suministro de suero antiofídico al paciente, por la vía intravenosa. Este producto, también llamado antiveneno, está compuesto por anticuerpos de origen equino capaces de neutralizar las distintas toxinas presentes en los venenos de las serpientes. Los antivenenos son altamente eficaces en la neutralización de las toxinas responsables de los efectos sistémicos, tales como las coagulopatías y disturbios hemodinámicos. Sin embargo, su principal limitación es la baja eficacia para controlar el daño local a los tejidos, debido a la rapidez con la cual se desarrollan la hemorragia y la mionecrosis (Gutiérrez et al., 2006).

En Costa Rica se utilizan dos tipos de sueros antiofídicos: el suero polivalente, que se utiliza para las mordeduras por "tobobas", y el suero anticoral, utilizado para las mordeduras por "corales" (Chaves et al., 1996; Gutiérrez et al., 1999). Además del antiveneno apropiado, se suministran antibióticos al paciente para prevenir complicaciones por infecciones bacterianas, toxoide tetánico y todo el soporte médico necesario. Si se presentan reacciones adversas al antiveneno, se trata al paciente con adrenalina, antihistamínicos o corticosteroides, según las características de la reacción. La hipovolemia se corrige por medio de la administración de expansores de plasma, y en casos de daño renal se puede recurrir a diálisis o hemoperfusión. El daño renal causado por la mioglobina o la hemoglobina liberadas por rhabdomiolisis, o hemólisis intravascular, respectivamente, puede ser prevenido por rehidratación (Gutiérrez et al., 2006).

El fucoidán como inhibidor de la miotoxicidad causada por venenos de serpientes

El fucoidán es un polisacárido sulfatado, con abundantes cargas negativas, que se extrae del alga marina *Fucus vesiculosus*. Se han demostrado diferentes efectos biológicos del fucoidán en mamíferos, entre los que se encuentran su acción inhibitoria en la actividad citotóxica (*in vitro*) y miotóxica (*in vivo*) de las miotoxinas PLA₂ aisladas de venenos de serpientes, así como su poder de reducir la mionecrosis causada por el veneno de *B. asper* cuando se administra rápidamente fucoidán en el sitio de la lesión, en modelos

experimentales en ratón (Angulo y Lomonte, 2003).

La miotoxina II de *B. asper* es una PLA₂ tipo Lys49 que se asocia con membranas celulares de una manera dependiente de la carga, gracias a sus propiedades básicas. Las cargas negativas sobre la membrana facilitan la asociación (Lomonte et al., 2003). Al tener el fucoidán abundantes cargas negativas, se favorece su unión con la miotoxina y en consecuencia su inhibición. Este tipo de inhibición también se ha demostrado con la heparina, la cual por sus abundantes cargas negativas, es capaz de inhibir la actividad miotóxica de diferentes venenos de serpientes, no sólo por uniones electrostáticas no específicas, sino también por algunas interacciones específicas (Lomonte, 1994).

La acción neutralizante del fucoidán se ha probado *in vitro* utilizando células de músculo esquelético. Los resultados obtenidos indican que este compuesto es capaz de inhibir la actividad citotóxica de las miotoxinas I, II, III y IV de *B. asper*; las miotoxinas I y II de *Cerrophidion godmani*, miotoxinas I y II de *Atropoides nummifer*, y la miotoxina I de *Bothriechis schlegelii*. La capacidad inhibitoria del fucoidán varía según la miotoxina probada, sin embargo para todas se redujo en al menos el 50-65% la actividad citotóxica e incluso algunas miotoxinas se inhiben completamente cuando se probaron en una relación molar de 1:1 (fucoidan/miotoxina). También se ha probado el efecto inhibitorio *in vitro* del fucoidán en función del tiempo, y se obtuvo que desde los 5 minutos de incubación del fucoidán con la toxina a temperatura ambiente, se alcanzó la inhibición, sugiriendo la rápida formación de complejos macromoleculares entre el fucoidán y las miotoxinas. A pesar de la capacidad inhibitoria de la citotoxicidad de las miotoxinas PLA₂, el fucoidán no afecta la actividad enzimática de las miotoxinas PLA₂ tipo Asp49 (Angulo y Lomonte, 2003).

El fucoidán también se ha probado *in vivo*, en modelos murinos, y se ha demostrado su capacidad inhibitoria de las mismas miotoxinas PLA₂ probadas *in vitro*. Además se ha probado la capacidad de inhibir la actividad miotóxica del veneno completo de *B. asper* en modelos experimentales, donde el daño muscular fue estimado por el aumento de los niveles de creatina quinasa plasmática. Se obtuvieron inhibiciones de 70-95% para las

miotoxinas PLA₂, y para el veneno completo de *B. asper* se obtuvo una reducción del 50% en los niveles de creatina quinasa en comparación con los ratones que sólo recibieron el veneno. Al aumentar la dosis de fucoidán administrada *in situ*, sin embargo, la protección no aumentó del 50% (Angulo y Lomonte, 2003).

Los estudios anteriormente citados fueron realizados con fucoidán natural, comercialmente obtenido, que posee un peso molecular relativamente alto (135 kDa en promedio). Su alto peso molecular podría ser un factor que limite su distribución y difusión en los tejidos (Angulo y Lomonte, 2003). Ante la importancia de tratar de disminuir el daño local causado por las miotoxinas PLA₂ de los venenos de serpientes en las personas afectadas, probar la acción inhibitoria de fragmentos de fucoidán de diferente peso molecular, con una posible mayor distribución en los tejidos, podría guiar la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para disminuir las secuelas por necrosis muscular en las mordeduras de serpientes.

El fucoidán crudo ya ha sido hidrolizado en medio ácido para reducir su heterogeneidad en cuanto a peso molecular y viscosidad, y para probar las fracciones en cuanto a su actividad anticoagulante (Colliec et al., 1994). Otras actividades atribuidas al fucoidán son la de reducir la proliferación de las células del músculo liso en ratas, e inhibir algunos virus envueltos como Herpes Simplex, Citomegalovirus, Virus de la Estomatitis Vesicular, Virus de la Inmunodeficiencia Humana, lo cual se atribuye a la inhibición de la adsorción del virus a la célula huésped, entre otras (Deux et al., 2002; Baba et al., 1988).

El fucoidán tiene las ventajas de poseer bajo costo, es de fácil obtención y amplia distribución, y es estable químicamente, lo cual permitiría su uso potencial en los accidentes ofídicos, ya que se podría aplicar en el sitio de la mordedura de una manera lo más inmediata posible, para disminuir así la necrosis muscular mientras se recibe la atención médica adecuada. En el presente trabajo se generó una fracción de fucoidán de bajo peso molecular mediante hidrólisis química, con el fin de probar comparativamente sus propiedades neutralizantes sobre una miotoxina purificada y sobre el veneno crudo de *B. asper*, mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*.

El antiveneno polivalente convencional algunas veces es inefectivo en la neutralización de la necrosis del tejido y hemorragias que ocurren en el envenenamiento por *B. asper*, por lo tanto el suplemento de los antivenenos con factores como antihemorraginas e inhibidores de las PLA₂ podrían aumentar el potencial de neutralización durante la terapia del accidente ofídico (Lizano et al, 1997).

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar y comparar la capacidad de dos fragmentos de fucoidán en la neutralización de la actividad miotóxica (*in vivo*) y citotóxica (*in vitro*) de la miotoxina II y el veneno de *Bothrops asper*.

Objetivos específicos:

1. Hidrolizar el fucoidán y separarlo en dos fracciones, de peso molecular alto y bajo.
2. Evaluar la capacidad de cada fracción del fucoidán en la neutralización de la actividad citotóxica de la miotoxina II del veneno de *B. asper*, en cultivos celulares.
3. Evaluar la capacidad de cada fracción del fucoidán en la neutralización de la actividad miotóxica de la miotoxina II *in vivo*, mediante experimentos con preincubación.
4. Comparar la capacidad de cada fracción del fucoidán en la inhibición de la miotoxicidad causada la miotoxina II *in vivo*, mediante la administración independiente por vía intramuscular, *in situ*.
5. Comparar la capacidad de cada fracción del fucoidán en la inhibición de la miotoxicidad causada por la miotoxina II *in vivo*, mediante la administración independiente intravenosa.
6. Evaluar la capacidad de cada fracción del fucoidán en la inhibición de la actividad miotóxica del veneno crudo de *B. asper in vivo*, mediante la administración independiente por vía intramuscular, *in situ*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de una fracción de fucoidán de alto peso molecular

El fucoidán sin digerir (Sigma-Aldrich, EUA) se separó por medio de filtración en gel, utilizando dos columnas de Sephadex G-100 acopladas en serie (22 x 2,5 cm cada una), a una velocidad de flujo de 0.15 mL/min. El solvente utilizado fue PBS (NaCl 0.12M, fosfato de sodio 0.04M, pH 7.2) y la elución del fucoidán se detectó a 280 nm. Se recolectó la fracción correspondiente al primer pico de absorción y se cambió su solvente a agua por medio de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa de exclusión, para finalmente liofilizarlo. Esta fracción de fucoidán de alto peso molecular se denominó F(H).

2. Hidrólisis del fucoidán y obtención de una fracción de bajo peso molecular

Se realizó una hidrólisis del fucoidán con ácido sulfúrico 2 N a 60 °C por diferentes tiempos (60 min, 3 hr, 6 hr y 24 hr), siguiendo el método descrito por Collic et al. (1994). Posteriormente a la digestión ácida, se neutralizó el pH con NaOH. Los productos de la digestión se separaron por medio de filtración en gel, utilizando la misma columna y condiciones descritas en la sección anterior. Con base en los perfiles de elución obtenidos para cada tiempo de digestión ácida, se seleccionó el menor tiempo en el cual se obtuvo la mayor hidrólisis, para procesar un nuevo lote de fucoidán. Luego de recolectar la fracción de bajo peso molecular, se cambió su solvente por agua mediante ultrafiltración en una membrana de 1 kDa, y se liofilizó. Esta fracción de fucoidán de bajo peso molecular se denominó F(L).

3. Estimación del peso molecular de los fragmentos de fucoidan.

Se realizaron distintas corridas cromatográficas en un HPLC Agilent 1100, utilizando una columna Zorbax GF-250 (Agilent Technologies) de 4,6 X 250 mm, y PBS pH 7,2 como fase móvil. Para las muestras se utilizó un volumen de 20 µl, a un flujo de 0,8 ml/min. Cada corrida tuvo un tiempo de 6 minutos y el detector utilizó una longitud de

onda de 280 nm.

Para la preparación de la curva de calibración se utilizaron cuatro marcadores de peso molecular: ovoalbúmina(43.000 Da), albúmina sérica bovina(67.000 Da), catalasa (232.000 Da) y tiroglobulina(669.000 Da). Estos marcadores se corrieron por duplicado y posteriormente con los tiempos de retención se construyó la curva de calibración. Tanto al fucoidán crudo, como a sus fragmentos, se les realizó la cromatografía bajo las mismas condiciones que a los marcadores, para así obtener una estimación de su peso molecular a partir de la curva de calibración.

4. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper* en cultivos celulares.

Se utilizó cultivos celulares de la línea de mioblastos de ratón C2C12 (ATCC CRL-1772) en placas de 96 hoyos, para evaluar la neutralización de la actividad citotóxica de la miotoxina II (Lomonte et al., 1999). Se incubó las fracciones de fucoidán F(H) y F(L) con la toxina, en diferentes proporciones, por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo de las placas (DME con 15% v/v de suero fetal bovino) y se transfirieron alícuotas de 100 μ L de las mezclas de toxina y F(H) o F(L), respectivamente, de forma tal que cada hoyo recibiera una dosis de reto de 20 μ g de la toxina en DME al 1% de suero fetal. Como controles se utilizó células inoculadas con toxina sola, F(H) o F(L) solos, en DME 1%. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. Los valores de 0 y 100% de citotoxicidad se obtuvieron agregando a los cultivos medio solo, y medio con 0.1% v/v de Triton X-100, respectivamente. Las células se incubaron por 3 hr a 37°C, en una atmósfera húmeda con 7% de CO₂ y posteriormente se tomó una alícuota del sobrenadante para determinar la actividad de deshidrogenasa láctica por un método cinético a 340 nm (LDH-UV kit, Wiener Laboratories).

5. Evaluación de las fracciones fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper* in vivo, mediante preincubación

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de 18-20 g de peso corporal, los cuales se inocularon intramuscularmente en el gastronemio con 75 μg de miotoxina II de *B. asper* sola o preincubada con cada fracción de fucoidán, en diferentes proporciones peso/peso, por 30 min a temperatura ambiente. Se utilizaron 4 ratones por cada grupo. Un grupo control se inyectó con 100 μL de PBS solo. A las 2 hr de la inoculación se tomaron muestras de sangre de la cola de los ratones en capilares heparinizados y se determinó la actividad de creatina kinasa en el plasma por medio de un ensayo cinético a 340 nm (CK-NAC UV, Wiener). La actividad de esta enzima se expresó como U/ml, en donde una unidad corresponde a la fosforilación de 1 nmol de creatina por minuto a 25°C. Los experimentos de miotoxicidad en ratones cuentan con la aprobación del Comité Institucional para el Cuido y Utilización de Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica.

6. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper* in vivo, mediante administración local independiente

Se utilizaron ratones CD-1 de 18-20 g de peso, los cuales se inocularon intramuscularmente en el gastronemio con 75 μg (en 50 μl) de miotoxina II de *B. asper*, e inmediatamente después se inocularon también intramuscularmente en el mismo músculo con 100 μg de la fracción de fucoidán F(H), o con 300 μg de la fracción F(L), en volúmenes de 50 μL . Se utilizaron 10 ratones por cada grupo. Como grupos control, se inocularon ratones con dos inyecciones consecutivas de 50 μL de PBS solo y otros con una inyección de 50 μL (75 μg) de la miotoxina II seguida de 50 μL de PBS. A las 2 hr de la inoculación se tomaron muestras de sangre para la determinación de creatina kinasa, como se describió en la sección anterior.

7. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper in vivo*, mediante administración intravenosa independiente

Se utilizaron ratones CD-1 de 18-20 g de peso, los cuales se inocularon intramuscularmente en el gastronemio con 75 µg (en 100 µl) de miotoxina II, e inmediatamente después se inocularon por la vía intravenosa, en la vena caudal, con 500 µg de la fracción de fucoidán F(H) o con 1500 µg de la fracción F(L), en volúmenes de 300 µL. Se inocularon 5 ratones por cada grupo. Como grupos control, se inocularon ratones con dos inyecciones de PBS, una de 100 µl intramuscular y otra intravenosa de 300 µl, y otros con una inyección intramuscular de 100 µL (75 µg) de miotoxina II, y otra intravenosa de 300 µL de PBS. A las 2 hr de la inoculación se tomaron muestras de sangre para la determinación de creatina kinasa, como se describió anteriormente.

8. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la actividad miotóxica del veneno crudo de *B. asper in vivo*, mediante administración local independiente

Se utilizaron ratones CD-1 de 18-20 g de peso, los cuales se inocularon intramuscularmente en el gastronemio con 50 µg del veneno crudo de *B. asper*, e inmediatamente después se inocularon también intramuscularmente en el mismo músculo con 100 µg de la fracción de fucoidán F(H) o con 300 µg de la fracción F(L), en volúmenes de 50 µL. Se utilizaron 10 ratones por cada grupo. Como grupos control, se inocularon ratones con dos inyecciones consecutivas de 50 µL de PBS, y otros con una inyección de 50 µL (50 µg) del veneno crudo de *B. asper*, y otra de 50 µL de PBS. A las 2 hr de la inoculación se tomaron muestras de sangre para la determinación de creatina kinasa, como se describió anteriormente.

9. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron por medio de la prueba *t* de Student, con un nivel de 95% de confianza.

RESULTADOS

1. Obtención de una fracción de fucoidán de alto peso molecular, F(H)

Al fraccionar el fucoidán por medio de la columna de filtración en gel con Sephadex G-100, se obtuvieron dos fracciones, como se muestra en la figura 1. Se recogió la fracción correspondiente al primer pico (volumen de exclusión), la cual corresponde a los fragmentos de fucoidán de alto peso molecular, F(H).

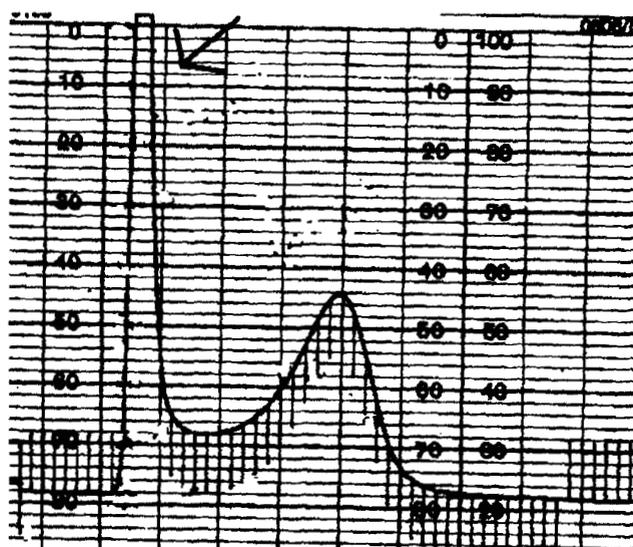


Figura 1: Filtración en gel del fucoidán en columna de Sephadex G-100. La flecha señala el pico correspondiente a los fragmentos de fucoidán de alto peso molecular, F(H).

2. Obtención de una fracción de fucoidán de bajo peso molecular, F(L)

Al tratar de hidrolizar el fucoidán a diferentes tiempos, se obtuvo un patrón muy similar en la filtración en gel en la columna Sephadex G-100, tanto para la muestra sin hidrolizar (digestión: 0 minutos), como para las muestras digeridas por 60 min, 3 hr y 6 hr (Figura 2). En cambio, cuando la digestión se efectuó por 24 hr, la hidrólisis se evidenció por un cambio significativo en el patrón cromatográfico, observándose una disminución casi completa del pico correspondiente al alto peso molecular, y un desplazamiento del segundo pico hacia la región de menor peso molecular. La fracción correspondiente a este

pico se recolectó para obtener los fragmentos de bajo peso molecular, F(L), como se indica en la Figura 2.

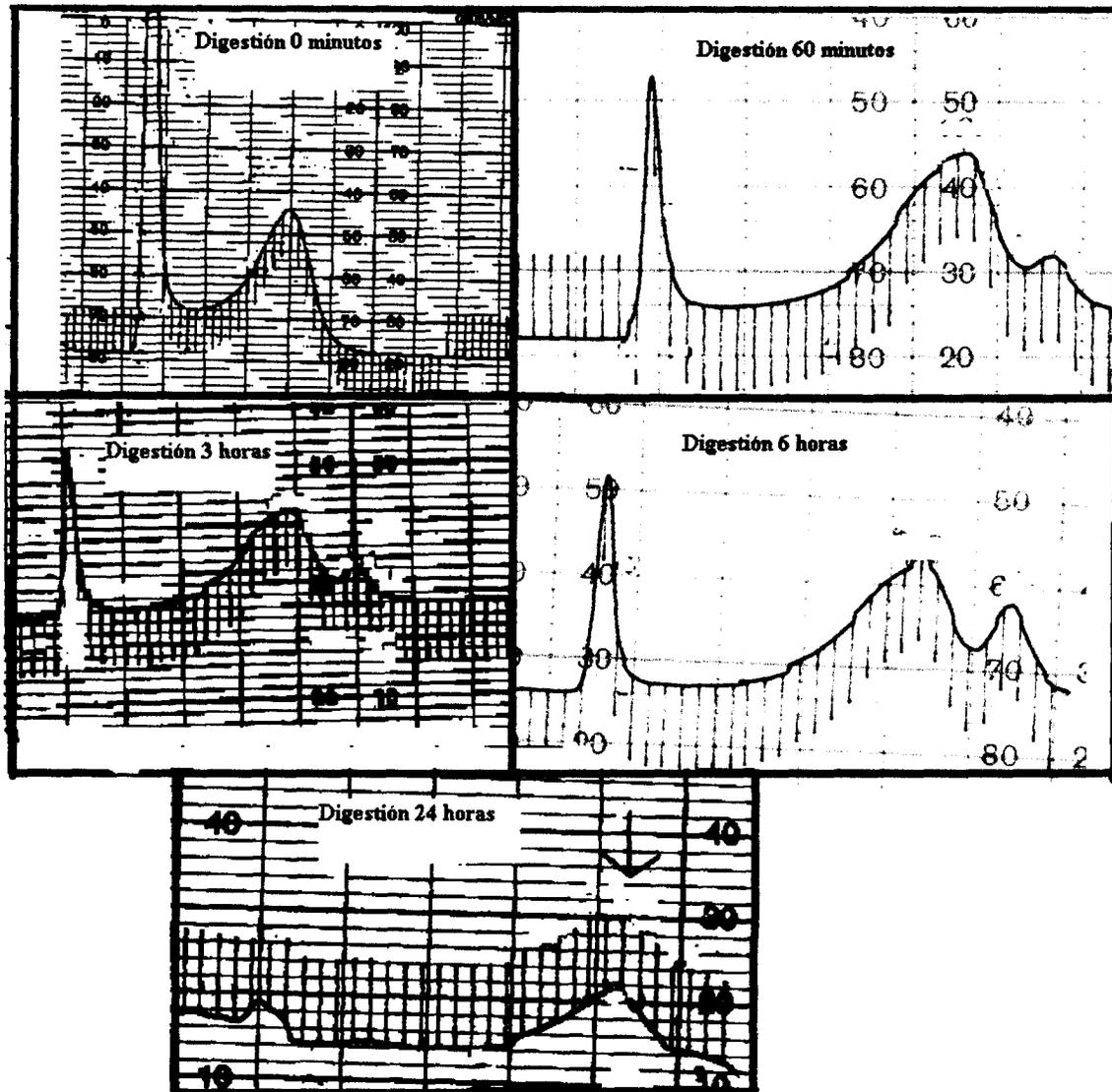


Figura 2: Filtración en gel del fucoidán digerido por diferentes tiempos, en columna Sephadex G-100. La flecha señala el pico correspondiente a los fragmentos de fucoidán de bajo peso molecular, F(L).

3. Estimación del peso molecular de los fragmentos de fucoidán

Al realizar la corrida cromatográfica para los marcadores de peso molecular por duplicado, se obtuvo una alta reproducibilidad entre ambas corridas. Al realizar la curva de

calibración se obtuvo una correlación de 0,975 (Figura 5).

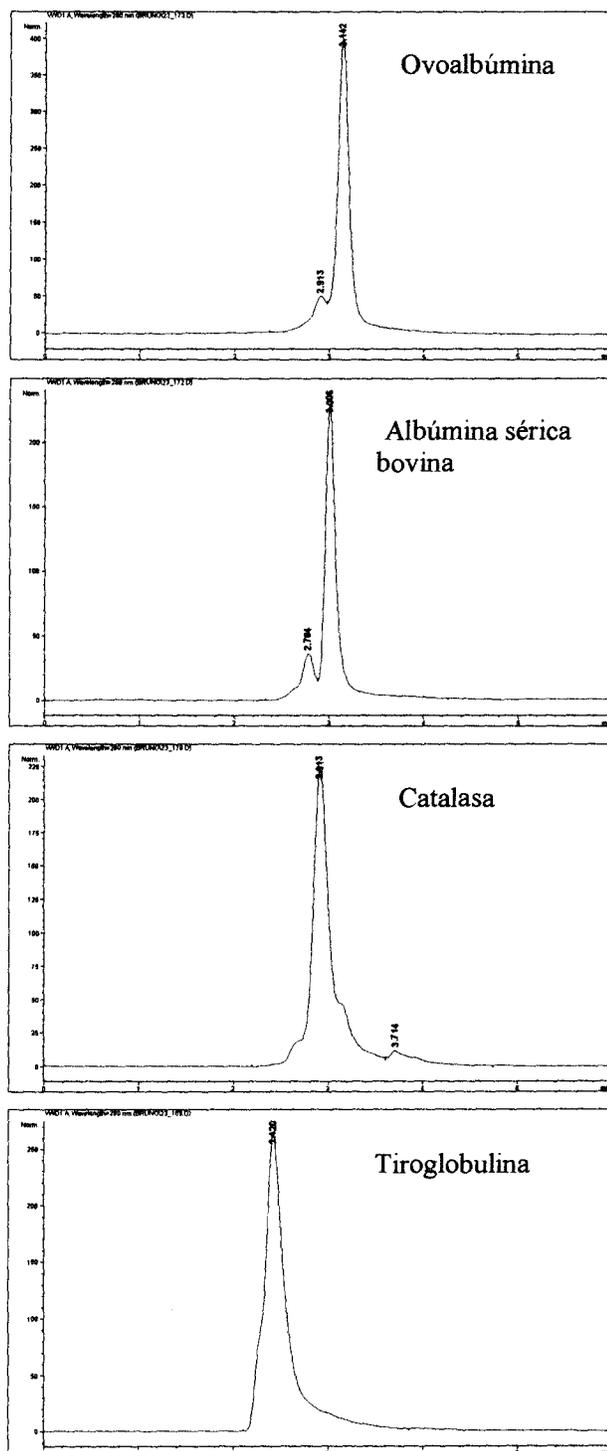


Figura 3: Cromatografías de los marcadores moleculares en HPLC, columna Zorbax GF-250, con un monitoreo a 280 nm.

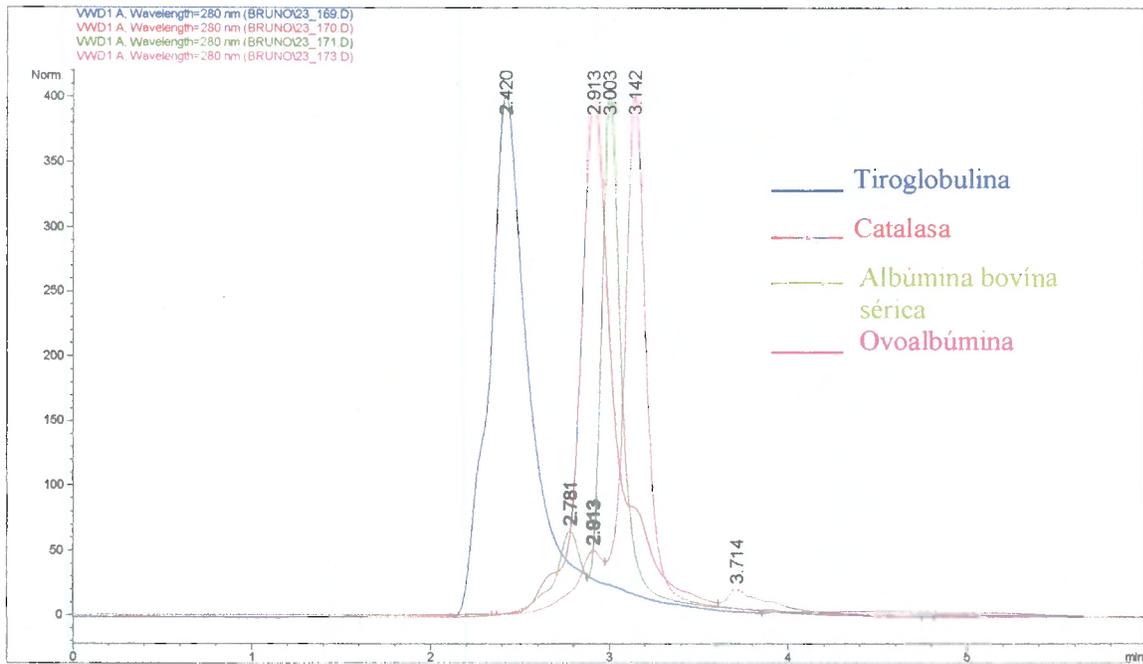


Figura 4: Sobreposición de los cromatogramas de los marcadores de peso molecular en HPLC, columna Zorbax GF-250, con un monitoreo a 280 nm.

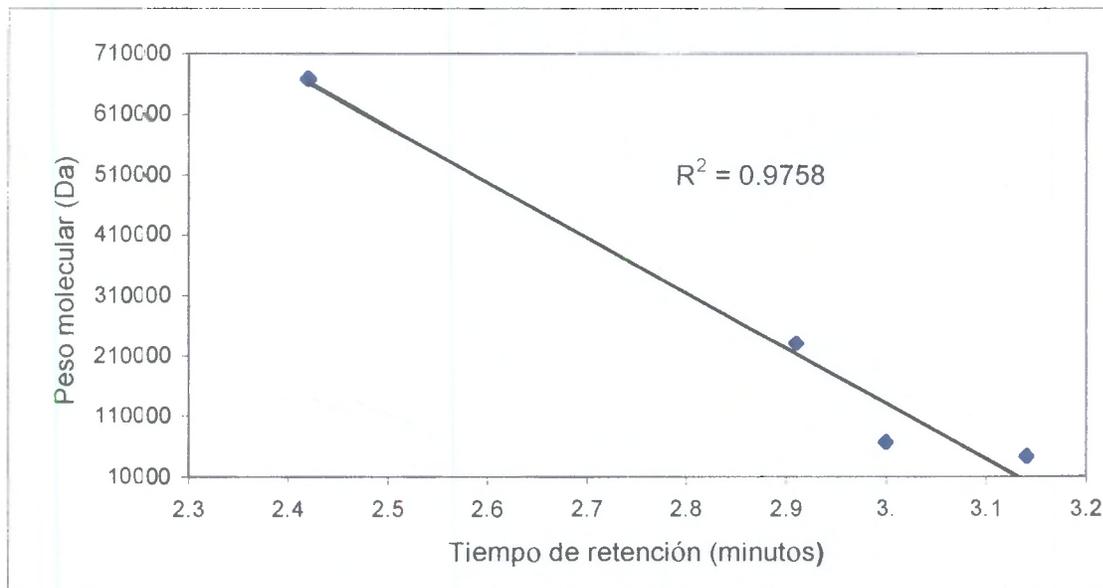


Figura 5: Curva de calibración de los marcadores de peso molecular ovoalbúmina, albúmina sérica bovina, catalasa y tiroglobulina, según el tiempo de retención en HPLC, columna Zorbax GF-250, con un monitoreo a 280 nm.

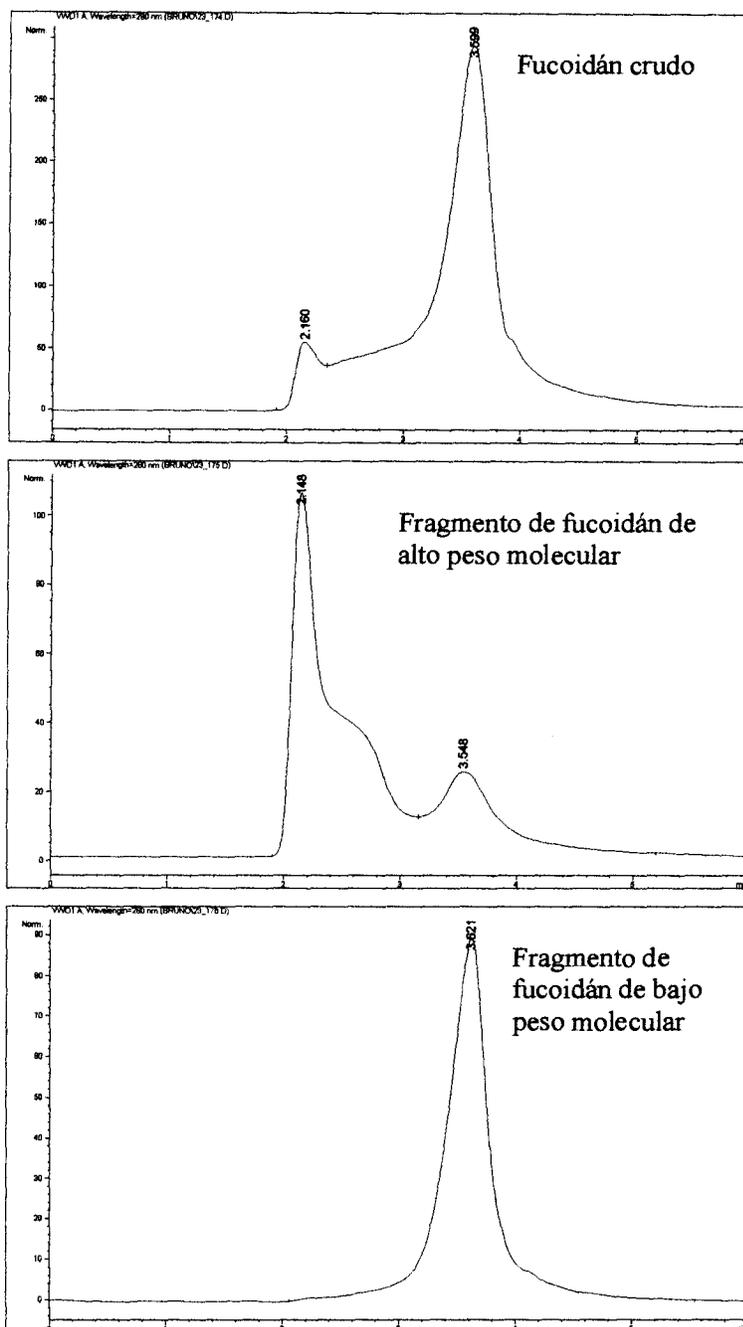


Figura 6: Cromatogramas del fucoidán crudo y sus fragmentos, obtenidos en HPLC, columna Zorbax GF-250, con un monitoreo a 280 nm.

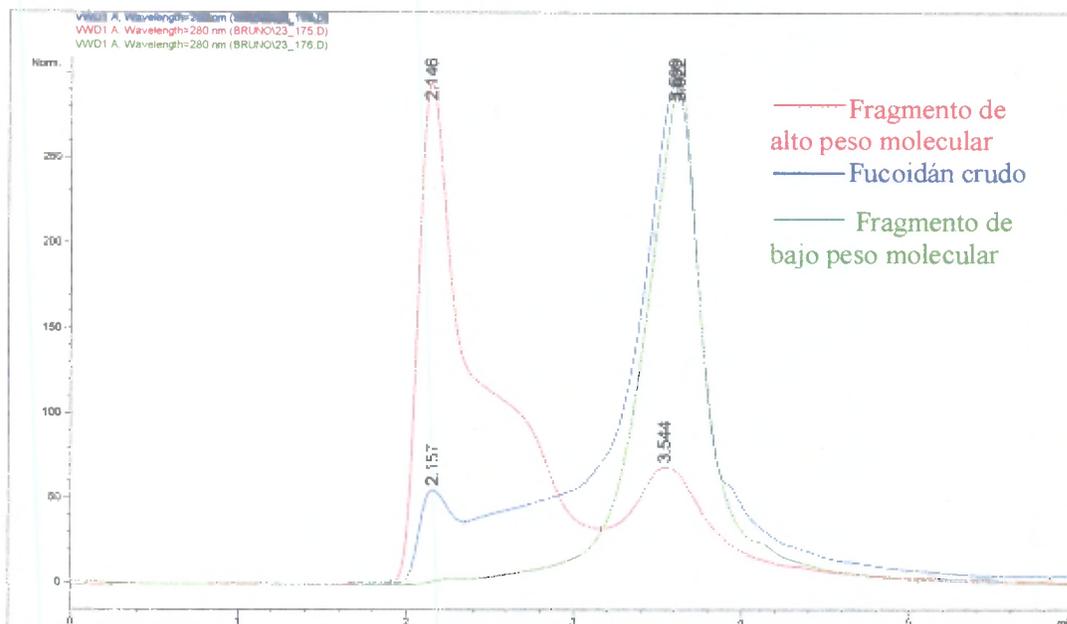


Figura 7: Superposición de los cromatogramas de el fucoidán crudo y los fragmentos de fucoidán, según la corrida en HPLC, columna Zorbax GF-250, con un monitoreo a 280 nm.

El fucoidán crudo presentó dos picos de elución. El primero representa una pequeña fracción del material y al extrapolarlo en la curva de calibración, correspondería a un peso molecular de alrededor de 2 millones Da. El segundo pico contiene la mayor cantidad del material y extrapola a un peso molecular de 9.900 Da. El fragmento de fucoidán de alto peso molecular, también presentó dos picos de elución, donde el primero representa alrededor del 75% del fragmento y presenta un peso molecular aproximado de 2 millones Da, el segundo pico constituye el otro 25% de la fracción y presenta un peso molecular aproximado de 11.700 Da. Por último el fragmento de bajo peso molecular presenta una mayor uniformidad, pues solo se observa un pico de elución, el cual corresponde a un peso molecular de 9.300 Da.

4. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper* en cultivos celulares

Al probar la capacidad inhibitoria de cada fragmento de fucoidán sobre la actividad citotóxica de la miotoxina II de *B. asper*, mediante preincubación, se obtuvo que la máxima

neutralización con la fracción F(H) se presentó al utilizar una relación de fucoidán/miotoxina de 0.2, mientras que no se obtuvo disminución en la citotoxicidad con una relación de 0.02. En cuanto a la fracción F(L), se obtuvo una neutralización menos eficiente, pues se necesitó una relación fucoidán/miotoxina de 6 para obtener la máxima neutralización, y cuando se utilizó una relación de 0.2 no se obtuvo disminución de la citotoxicidad, como se observa en la Figura 8. Los fragmentos de fucoidán por sí solos no ejercieron ninguna acción citotóxica, con valores de deshidrogenasa láctica iguales a los de los hoyos control con medio de cultivo.

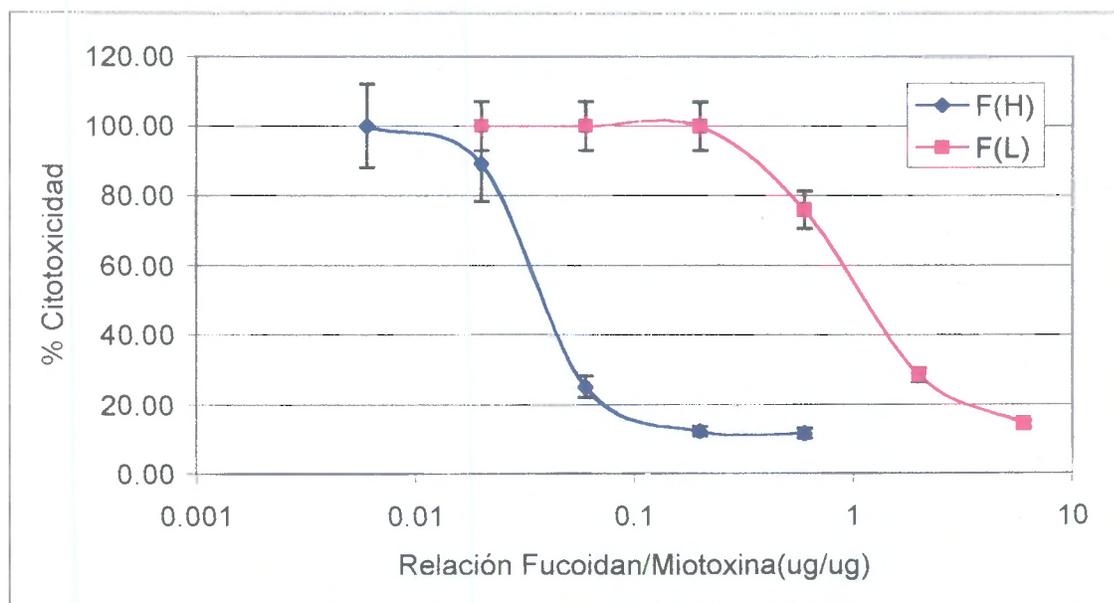


Figura 8: Neutralización de la actividad citotóxica de la miotoxina II de *B. asper* sobre cultivos de mioblastos C2C12, mediante la preincubación con fracciones de fucoidán de alto [F(H)] y bajo [F(L)] peso molecular. La dosis de toxina aplicada a los cultivos corresponde a 20 μ g, y la escala horizontal indica la relación fucoidán:miotoxina utilizada en la preincubación. Cada punto representa el promedio de 2 determinaciones \pm DE.

5. Evaluación de las fracciones fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper in vivo*, mediante preincubación

Al probar la capacidad neutralizante de la miotoxina II por los fragmentos de fucoidán, se obtuvieron resultados congruentes con los obtenidos *in vitro*, pues la fracción

de alto peso molecular presentó una mayor capacidad de neutralización, en comparación con la fracción de bajo peso molecular (Figura 9). Con una relación de fucoidán/miotoxina de 1.12 de cada fracción se logró una neutralización máxima de la toxina, sin embargo la fracción F(L) cuando se utilizó una relación de 0.56 ya no disminuyó la miototoxicidad, con respecto a la miotoxina sola (100% de miototoxicidad), mientras que la fracción F(H) aún con una relación fucoidán/miotoxina de 0.28 presentó una disminución del 60% en la miototoxicidad. A partir de los datos obtenidos, se calculó la dosis eficaz 50 (DE₅₀), en cuanto a la relación fucoidán/miotoxina(μg/μg) la cual fue de 0.27 para la fracción F(H) y de 0.88 para la fracción F(L), esto demuestra que la fracción de alto peso molecular es aproximadamente 3 veces más potente que la de bajo peso molecular, por lo cual en los siguientes experimentos se utilizó la fracción F(L) en una concentración 3 veces mayor con respecto a la fracción F(H).

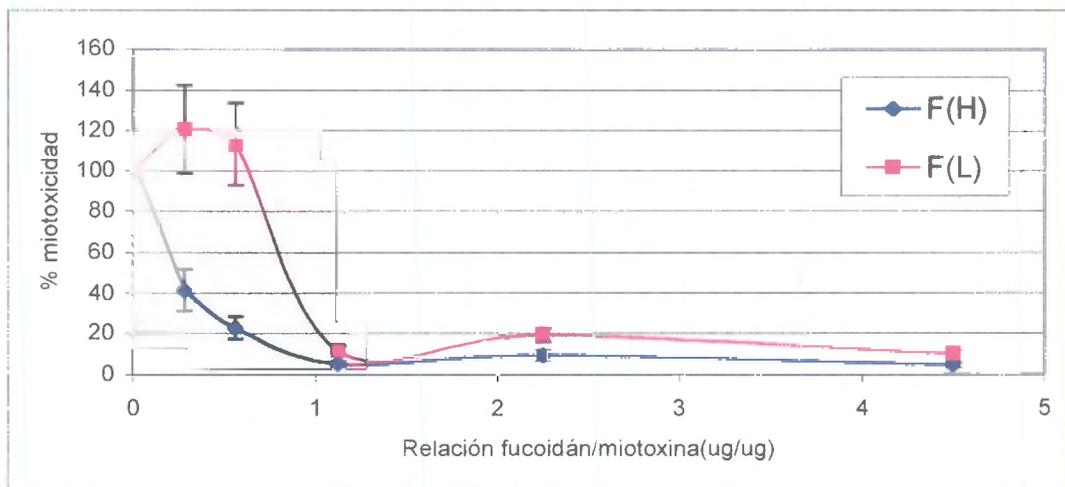


Figura 9: Neutralización de la actividad miotóxica de la miotoxina II de *B. asper* por las fracciones de fucoidán de alto [F(H)] y bajo [F(L)] peso molecular, mediante preincubación. La dosis de toxina aplicada a los ratones corresponde a 75 μg y la escala horizontal indica la relación fucoidán/miotoxina utilizada en la preincubación. Cada punto representa el promedio de 4 determinaciones ± DE.

6. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper* *in vivo*, mediante administración local independiente

Cuando se inocularon los fragmentos de fucoidán localmente, de manera independiente a la inoculación de la miotoxina, se obtuvo una disminución de la miotoxicidad cercana al 50% para ambos fragmentos (la fracción F(L) se utilizó en una proporción tres veces mayor a la F(H)). No se observó una diferencia significativa en cuanto a la capacidad inhibitoria de la toxina entre ambos fragmentos a las concentraciones utilizadas (Figura 10), aunque cada uno de ellos presentó una inhibición significativa con respecto al daño muscular inducido por la miotoxina sola ($p < 0,05$).

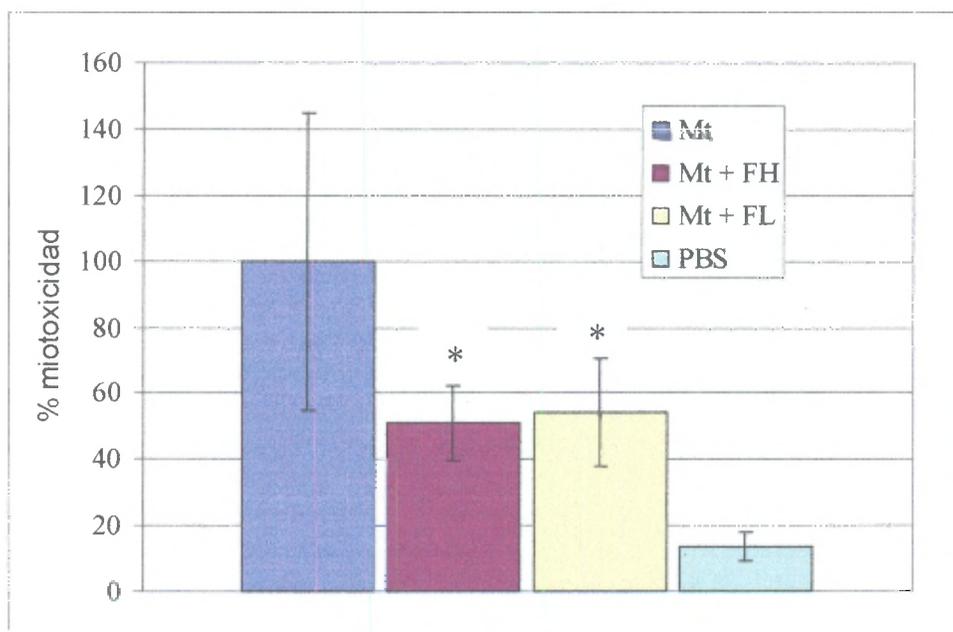


Figura 10: Inhibición de la actividad miotóxica *in vivo* de la miotoxina II de *B. asper* por administración intramuscular independiente de las fracciones de fucoidán de alto[F(H)] y bajo [F(L)] peso molecular. La dosis de toxina aplicada a los ratones corresponde a 75ug y la cantidad de cada fracción fue de 100 ug de F(H) y 300ug de F(L). Cada columna representa el promedio de 10 determinaciones \pm DE. * $p < 0,05$ cuando se compara con el promedio de la miotoxina sola.

7. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la miotoxina II de *B. asper* *in vivo*, mediante administración intravenosa independiente

Al probar la capacidad neutralizante de la miotoxina II por los fragmentos de fucoidán administrados independientemente por la vía intravenosa, tras la inoculación intramuscular de la toxina, no se observó disminución en la miotoxicidad (Figura 11). Ninguna de las dos fracciones tuvo la capacidad de neutralizar la miotoxina por esta vía, esto a pesar de utilizar una dosis 5 veces mayor a la utilizada en los experimentos de administración intramuscular *in situ*.

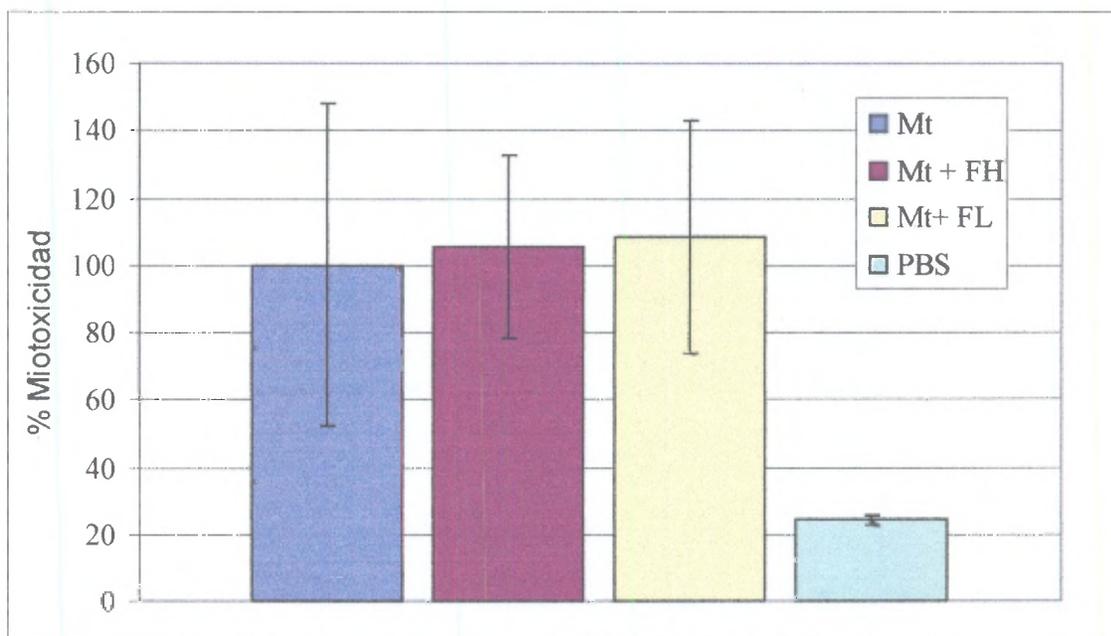


Figura 11: Inhibición de la actividad mitotóxica *in vivo* de la miotoxina II de *B. asper* por medio de la administración intravenosa de las fracciones de fucoidán de alto[F(H)] y bajo [F(L)] peso molecular. La dosis de toxina aplicada a los ratones corresponde a 75 μg y la cantidad de cada fracción fue de 500 μg de F(H) y 1500 μg de F(L). Cada columna representa el promedio de 5 determinaciones \pm DE. No se observó inhibición ($p > 0.05$)

8. Evaluación de las fracciones de fucoidán en la neutralización de la actividad miotóxica del veneno crudo de *B. asper* *in vivo*, mediante administración local independiente

Al examinar la capacidad inhibitoria de los fragmentos de fucoidán sobre el veneno crudo de la serpiente *B. asper*, tras la aplicación intramuscular *in situ*, se obtuvo una disminución significativa en la miotoxicidad cuando se aplicó la fracción F(H). Sin embargo, no se obtuvo una disminución estadísticamente significativa al utilizar la fracción F(L). Al comparar ambos fragmentos entre sí, se obtuvo una diferencia significativa en su capacidad de inhibición de la miotoxicidad causada por el veneno (Figura 12).

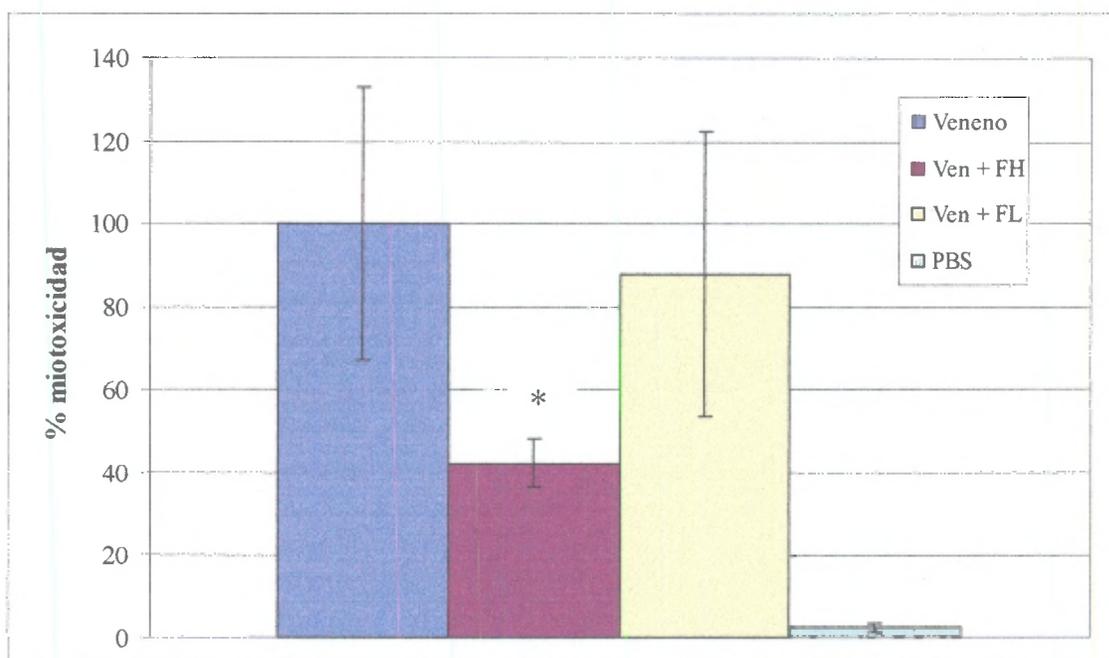


Figura 12: Inhibición de la miotoxicidad *in vivo* causada por el veneno crudo de *B. asper*, tras la inoculación *in situ* de las fracciones de fucoidán de alto [F(H)] y bajo [F(L)] peso molecular. La dosis de veneno aplicada a los ratones corresponde a 50 μg y la cantidad de cada fracción fue de 100 μg de F(H) y 300 μg de F(L). Cada columna representa el promedio de 10 determinaciones \pm DE. * $p < 0.05$ cuando se compara con los valores del grupo inoculado con veneno solo o con veneno más la fracción de bajo peso molecular.

DISCUSIÓN

En este estudio se compara la capacidad de dos fragmentos de fucoidán, uno de alto peso molecular y otro de bajo peso molecular para neutralizar las actividades mitotóxica y citotóxica de la mitoxina II y del veneno crudo de *B. asper*. Inicialmente se realizó una separación de los componentes del fucoidán crudo para así concentrar la fracción de alto peso molecular, ya que el material crudo representa una mezcla de fracciones de diferentes pesos moleculares. Esto se realizó por medio de filtración en gel en una columna de Sephadex G-100, sin embargo al realizar la corrida cromatográfica en HPLC, se pudo observar como este fragmento no presenta la homogeneidad que parecía tener en los cromatogramas de filtración en gel.

Por medio de la cromatografía líquida de alta resolución, se estimó el peso molecular de este fragmento, presentando una fracción con un peso molecular bastante elevado (2 millones Da) y otra fracción minoritaria de un peso molecular de 11.700 Da. Debe notarse que la estimación del peso molecular del pico correspondiente al F(H), en 2 millones Da, es una extrapolación de la curva de calibración, por lo que no necesariamente es un valor exacto. Según el fabricante de la columna cromatográfica utilizada, la determinación del peso molecular de sustancias muy grandes, mayores al marcador de tiroglobulina (669.000 Da), es inexacta por la pérdida de linealidad del sistema (Dicker, 2004).

Por otra parte, la fracción de bajo peso molecular se podría deber al rompimiento del fragmento durante su almacenamiento en congelación, ya que esto implica que el fragmento se someta a ciclos de congelación-descongelación durante el avance del estudio. Una explicación alternativa, también factible, sería que el paso de purificación por filtración en gel que se utilizó para obtener el F(H), no haya eliminado por completo la presencia de cadenas de fucoidán de menor peso molecular que se traslapan entre los picos. Aún así, considerando que la preparación F(H) contiene aproximadamente un 75% del componente de 2 millones de Da, es razonable asumir que este alto peso molecular influyó

de manera significativa en los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de este fragmento de neutralizar las miotoxinas, en comparación con el fragmento de bajo peso molecular.

Para la obtención del fragmento de bajo peso molecular se realizó una hidrólisis ácida del fucoidán crudo y se obtuvo un fragmento bastante homogéneo con un peso molecular estimado de 9.300 Da. La hidrólisis ácida del fucoidán ya se ha realizado en otros estudios, bajo otras condiciones y se demostró que las propiedades físicas y químicas del extracto ácido se conservaban con respecto al fucoidán original, a pesar de esto, la actividad anticoagulante que presentó el extracto de la hidrólisis fue menor a la actividad anticoagulante del fucoidán original o crudo, además el fragmento presentó un mayor contenido de fucosa y sulfatos y un menor contenido de ácido urónico y proteínas que el fucoidán crudo (Colliec et al., 1994; Mabeau et al., 1990). Sin embargo en el presente estudio, al modificar las condiciones de la hidrólisis, la conservación en su totalidad de las propiedades del fragmento en comparación con el fucoidán crudo no se puede asegurar.

Con el avance en los estudios de los venenos de las serpientes y sus miotoxinas, se han encontrado características importantes que ayudan en la búsqueda de adecuados inhibidores de dichas toxinas. Con respecto a las miotoxinas, se ha obtenido evidencia que indica que la región C-terminal de las variantes homólogas de fosfolipasa A₂ Lys49, presenta una combinación de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos, lo cual constituye un determinante para su actividad miotóxica. Por lo tanto moléculas aniónicas como el fucoidán y por consiguiente sus fragmentos tienen la capacidad de unirse a este sitio tóxico (Lomonte et al., 1994; Angulo-y Lomonte, 2003).

Al probar los fragmentos de fucoidán en cultivos celulares con el fin de conocer su capacidad neutralizante de la miotoxina II de *B. asper*, se comprobó como al igual que el fucoidán original, ambos fragmentos conservan la capacidad neutralizante. El fragmento de alto peso molecular mostró una mayor capacidad neutralizante, lo cual se puede atribuir a que este fragmento solo requirió una separación cromatográfica de entre los componentes del fucoidán original, mientras el fragmento de bajo peso molecular al pasar por el proceso

de hidrólisis ácida pudo sufrir modificaciones químicas que afectaran sus cargas negativas y por ende su capacidad neutralizante. Alternativamente, también es posible que el menor peso molecular de las cadenas polisacáridas de la fracción F(L) incida negativamente sobre su avidez por las miotoxinas, al presentar un menor número de sitios de unión hacia estas, en comparación con las largas cadenas de la fracción F(H), de las cuales se esperaría una mayor multivalencia y avidez.

Tanto en los experimentos de neutralización *in vitro* como *in vivo* donde se realizaron incubaciones previas del fucoidán con la miotoxina, se obtuvieron resultados evidentes sobre la capacidad neutralizante de los fragmentos, lo cual indica que al entrar en contacto la miotoxina con estos inhibidores, se da la unión y formación de complejos que disminuye la actividad de la miotoxina. Al probar la misma capacidad neutralizante por los fragmentos *in vivo* pero sin la preincubación, sino al administrar independientemente el inhibidor vía intramuscular, en el mismo sitio de aplicación de la toxina, el rendimiento de la neutralización disminuyó a pesar de utilizar una mayor cantidad de los inhibidores con respecto a los experimentos de preincubación. Esto es esperable, pues *in vivo* diferentes moléculas pueden interferir con la unión inhibidor-miotoxina, además de que los fragmentos pueden unirse a otras proteínas básicas del organismo, y el compartimento en el cual se debe de dar la unión inhibidor-miotoxina es más amplio, dificultando el encuentro de ambos y la formación de los complejos. A pesar de esto, ambos fragmentos al ser administrados intramuscularmente posterior a la inoculación de la miotoxina, mostraron una significativa capacidad de disminuir el daño muscular.

El mecanismo de inhibición del fucoidán contra las miotoxinas PLA₂ parece ser la rápida formación de complejos, probablemente mediante interacciones electrostáticas multivalentes entre los sulfatos aniónicos del polisacárido y los numerosos residuos catiónicos de las toxinas, las cuales tienen puntos isoeléctricos básicos (Angulo y Lomonte, 2003). Sin embargo, la capacidad de neutralización de la miotoxina por los fragmentos de fucoidán no está directamente relacionada solo con la cantidad de sulfatos aniónicos en cada fragmento, pues en estudios con otros inhibidores polisulfatados se ha visto como esta relación no se mantiene, ya que las uniones a la miotoxina II del condroitín sulfato y el

dermatán sulfato son más débiles que la unión de la miotoxina a heparán sulfato, a pesar de que este es menos sulfatado, lo cual indica que existen otras interacciones específicas además de las mediadas por los sulfatos y sus cargas negativas (Lomonte et al., 1994).

La formación de complejos reversibles entre el fucoidán y las miotoxinas se ha evidenciado por ensayos de turbidimetría, donde la propiedad de dispersar la luz de las mezclas fucoidán/miotoxina varía de acuerdo con las proporciones relativas de los dos compuestos interactuantes (Angulo y Lomonte 2003). Esta capacidad de formación de complejos macromoleculares también se ha demostrado para otro inhibidor con características similares al fucoidán como lo es la heparina. La heparina es un glicosaminoglicano sulfatado compuesto por unidades de ácido hexurónico (ácido glucurónico o ácido idurónico) y glucosamina, sus sustituyentes de sulfatos son principalmente grupos N-sulfatos o O-sulfatos (Kjellén y Lindahl, 1991). Por medio de turbidimetría se ha evidenciado la formación de complejos entre la heparina y la miotoxina II, lo cual se considera evidencia de una interacción multivalente que involucra al menos dos sitios de unión de la heparina a la proteína. Como la miotoxina puede encontrarse como un dímero, al menos se necesita un sitio de unión en cada monómero (Lomonte et al., 1994). Es posible que entre los fragmentos de fucoidán y la miotoxina de la misma manera ocurran interacciones multivalentes.

El MAb-3 es un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón con la capacidad de neutralizar la miotoxicidad y actividad citolítica de la miotoxina II. Sin embargo estudios realizados con este anticuerpo junto con la heparina, han sugerido que ambos inhibidores reconocen diferentes sitios en la toxina, lo cual indica que existen al menos dos mecanismos moleculares para la neutralización de la citotoxicidad de la miotoxina II. (Lomonte et al., 1994). El mecanismo de inhibición del fucoidán o sus fragmentos se debe relacionar con el de la heparina, por sus características similares.

En estudios previos se estudiaron dos péptidos sintéticos, de la miotoxina II de *B. asper*; se seleccionaron las regiones 69-80 y 115-129 ya que ambas presentan un alto contenido de residuos cargados positivamente. De estos, solamente el péptido 115-129

mostró la capacidad de unirse a la heparina, sin embargo con una capacidad disminuida en comparación con la eficiencia de unión con la proteína completa. Además este péptido a altas concentraciones tuvo la capacidad de reproducir la actividad citolítica de la miotoxina II, capacidad que no presentan otros péptidos estudiados. Todo esto evidencia que el péptido 115-129 es parte de sitio de unión de la heparina a la miotoxina II, el cual a la vez está involucrado en la actividad de la toxina. Consecuentemente el mecanismo de neutralización de la heparina puede ser explicado por su unión a una región catiónica de la miotoxina II, la cual es crítica para el mecanismo citolítico (Lomonte et al., 1994).

La estructura tridimensional de la miotoxina II muestra que los residuos 115-129 están localizados en una región muy expuesta, después de la última hélice alfa, denominada hélice E. Esta región no es obstaculizada por la dimerización de la miotoxina (Arni et al., 1995).

El hecho de que la miotoxina II pueda formar dímeros y que interactúe multivalentemente con la heparina puede implicar una alta avidéz en la unión (Lomonte et al. 1994). Esto podría explicar como las moléculas con estructura repetitiva de mayor peso molecular pueden neutralizar mejor la miotoxina, en comparación con las de bajo peso molecular.

El posible sitio de unión del fucoidán en las miotoxinas ha sido investigado usando péptidos sintéticos cortos que representan la región encargada de dañar la membrana de las toxinas, es decir los residuos 115 a 129, los cuales representan la región C-terminal. El fucoidán inhibió la actividad citolítica de los tres péptidos en estudio (de tres miotoxinas distintas), lo cual demuestra la capacidad del fucoidán de interactuar con la región C-terminal de las miotoxinas PLA₂, al igual que la heparina. Además estos datos se complementaron al realizar un ensayo competitivo usando anticuerpos contra el péptido sintético de la miotoxina II de *B. asper*. La unión de estos anticuerpos a la toxina inmovilizada fue reducida en presencia del fucoidán (Angulo y Lomonte, 2003)

Al igualar las condiciones en cuanto a la cantidad de cada fragmento de fucoidán necesario para la neutralización de la miotoxina mediante preincubación, se podría esperar que al comparar ambos fragmentos, el de menor peso molecular, al tener una mayor posibilidad de desplazamiento y difusión *in vivo*, pudiera unirse más eficientemente a la miotoxina, en comparación con el fragmento de alto peso molecular. Sin embargo en los resultados obtenidos se observa como no existe una diferencia significativa entre ambos fragmentos en cuanto a la capacidad de disminuir la miotoxicidad. En el ensayo experimental puesto en práctica, al inocular los inhibidores inmediatamente después de la aplicación de la miotoxina y en el mismo lugar, el factor de la capacidad de desplazamiento de cada fragmento pudo no haber sido tan significativo, pues ambos fragmentos tienen la capacidad de interactuar con la miotoxina al ser inoculados en el mismo lugar.

En estudios con otros inhibidores de las toxinas de serpientes, se ha visto como se requiere una rápida aplicación del inhibidor para neutralizar la acción del veneno. Sin embargo a pesar de que estudios en ratones demuestran como es necesaria la inmediata administración del inhibidor, esto no puede ser extrapolado a los casos humanos. Se sugiere que el curso de tiempo para el daño del tejido local en humanos no es tan rápido como en roedores, por lo cual se pueden obtener buenos resultados a pesar de que los inhibidores se apliquen después de un corto periodo de tiempo (Rucavado et al. 2000).

Un experimento determinante en evaluar la capacidad de mejor desplazamiento de los fragmentos pudo haber consistido en la administración intravenosa de los fragmentos. Sin embargo en este caso, ninguno de los dos fragmentos tuvo la capacidad de disminuir la miotoxicidad, lo cual se puede atribuir a la unión de estos inhibidores a otras proteínas presentes tanto en los componentes sanguíneos como en los tejidos. También se puede deber a razones farmacocinéticas, pues la inyección intravenosa podría llevar a una dilución del fucoidán en un volumen de distribución grande, por lo que su concentración en el músculo afectado sería más baja.

En la búsqueda de inhibidores para la aplicación en caso de mordeduras de

serpientes es importante que el inhibidor tenga la capacidad de distribuirse por los tejidos tanto tras la aplicación intramuscular ya sea en el sitio de la mordedura de la serpiente o en otras zonas anatómicas, como tras la aplicación intravenosa, los cuales serían los métodos más adecuados para la aplicación de un posible fármaco con la capacidad de disminuir el daño muscular ocasionado por las mordeduras de serpientes. Por lo tanto esta deficiencia de los fragmentos de fucoidán de no poder disminuir el daño causado por la miotoxina cuando fueron aplicados por la vía intravenosa, constituye una limitante para su utilización en estos casos.

En la evaluación de la capacidad neutralizante por los fragmentos de fucoidán del veneno crudo de *B. asper*, mientras que el fragmento de alto peso molecular tuvo la capacidad de disminuir la miotoxicidad de manera significativa con respecto a los controles que solo recibieron la miotoxina, el fragmento de bajo peso molecular no mostró dicha capacidad neutralizante, representando este el único experimento en el cual se observó una diferencia significativa entre ambos fragmentos en cuanto a su capacidad neutralizante de la miotoxicidad. Esto indica la interacción del fragmento de alto peso molecular con otros componentes del veneno distintos a la miotoxina II, los cuales a la vez no tuvieron la capacidad de unirse con el fragmento de bajo peso molecular. Además la posible mayor avidez que presenta la unión entre el fragmento de alto peso molecular y la miotoxina gracias a las interacciones multivalentes entre ambos, las cuales se presentan en una limitada cantidad cuando el fragmento es de menor tamaño, permitiría que el fragmento de alto peso molecular inhiba más eficientemente el veneno total.

Este experimento refleja como el fragmento de alto peso molecular tanto por su capacidad de neutralizar la miotoxina con una menor relación fucoidán:miotoxina como por su capacidad de neutralizar la miotoxina cuando se encuentra formando parte del veneno total, el cual es el que en los casos reales se inocula, muestra una más adecuada capacidad neutralizante del daño muscular causado durante las mordeduras de serpientes. Al ser este fragmento una fracción del fucoidán crudo, sin ningún proceso de hidrólisis, para estudios posteriores, se podría utilizar el fucoidán crudo como inhibidor y no sus fragmentos tras hidrólisis ácida, o se pueden buscar otros métodos para hidrolizar el fucoidán sin someterlo

a reacciones fuertes como la hidrólisis ácida que pueda afectar su estructura química y por ende su capacidad neutralizante de las miotoxinas de los venenos de serpientes.

Se ha observado que en los envenenamientos por serpientes, el veneno tiende a formar depósitos en el sitio de la mordedura, dados por la necrosis local y el daño de los vasos sanguíneos. Estos depósitos no pueden ser alcanzados por los anticuerpos del suero antiofídico utilizado como tratamiento por lo que el veneno puede difundir hacia el flujo sanguíneo causando daño tisular de una manera más tardía. Por este motivo la administración *in situ* de inhibidores que difundan rápidamente puede inhibir efectivamente el daño ocasionado por estos depósitos de veneno (Boyer et al., 1999; Rucavado et al, 2000).

CONCLUSIONES

- Tanto el fucoidán crudo como sus dos fragmentos estudiados de distintos pesos moleculares son capaces de neutralizar la miotoxicidad causada por la miotoxina II de *B. asper*. Dicha neutralización se atribuye a la interacción de las cargas negativas del inhibidor con las cargas positivas de la miotoxina.
- El fragmento de alto peso molecular muestra una mayor capacidad neutralizante intrínseca hacia la miotoxina II *in vitro* que el fragmento de bajo peso molecular, en términos de relación de masas. Esto podría estar relacionado con un posible mayor número de sitios de unión y por ende, una mayor multivalencia y avidéz, de las cadenas de fucoidán de mayor tamaño.
- Ambos fragmentos de fucoidán estudiados presentan la misma capacidad de neutralización de la miotoxina II de *B. asper* al administrarse *in situ*, cuando se estandarizan las concentraciones necesarias de cada fragmento para obtener la neutralización de la miotoxina mediante preincubación.
- La inhibición de las miotoxinas de los venenos de serpientes depende de distintos factores. De manera contraria a lo que tradicionalmente se ha considerado, la disminución del peso molecular de un inhibidor no necesariamente va a conllevar a una mayor eficiencia en neutralización, dada por la mayor distribución del mismo por los tejidos. La capacidad inhibitoria va a depender de todos los factores involucrados en la unión inhibidor-miotoxina y no solo de la difusibilidad del inhibidor. Como se evidencia en el presente estudio, en el caso del fucoidán la disminución del peso molecular puede afectar la potencia neutralizante *in vitro* e *in vivo*.
- El fragmento de bajo peso molecular obtenido por hidrólisis ácida del fucoidán crudo, al no mostrar capacidad de neutralización del veneno crudo de *B. asper*, no es recomendable para su utilización como eventual tratamiento del accidente

ofídico.

- El posterior estudio del fucoidán o sus fragmentos como tratamiento para el accidente ofídico, debe contemplar su uso intramuscular, pues ninguno de los fragmentos de fucoidán muestra capacidad de disminuir el daño local ocasionado por la miotoxina cuando se administra por vía intravenosa.
- Dada la baja eficiencia de los antivenenos para combatir el daño local ocasionado por las mordeduras de serpientes, la implementación terapéutica de un inhibidor de las miotoxinas como el fucoidán o sus fragmentos, representa una posible opción complementaria para disminuir las secuelas locales causadas por estos envenenamientos.

REFERENCIAS

- Angulo Y, Lomonte B (2003) Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Biochemical Pharmacology* 66, 1993-2000.
- Arni RK, Ward RJ, Gutiérrez JM, Tulinsky A (1995) Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystallographica D* 51, 311-317.
- Baba M, Snoeck R, Pauwels R, De Clercq E (1998) Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11, 1742-1745.
- Bolaños R (1984) *Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica*. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Boyer L, Seifert M, Clark R, McNally J, Williams S, Nordt S, Walter F, Dart R (1999) Recurrent and persistent coagulopathy following pit viper envenomation. *Arch Intern Med* 159, 706-710.
- Chaves F, Alvarado J, Aymerich R, Solórzano A (1996) *Aspectos básicos sobre las serpientes de Costa Rica*. Oficina de Publicaciones de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Collic S, Boisson C, Jozefonvicz J (1994) A low molecular weight fucoidan fraction from the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry* 35, 697-700.
- Deux J, Meddahi-Pellé A, Le Blanche A, Feldman L, Collic-Jouault S, Brée F, Boudghène F, Michel J, Letourneur D (2002) Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in stent restenosis model. *Arteriosclerosis*,

Thrombosis, and Vascular Biology 22, 1604-1609.

Dicker RD (2004) Testing Zorbax GF-250 performance using gel-filtration test mixtures. Agilent technical publications.

Gutiérrez JM, Rojas G, Aymerich R (1999) El envenenamiento ofídico en Centroamérica: fisiopatología y tratamiento. Instituto Clodomiro Picado, Facultad Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Gutiérrez JM, Ownby CL (2003) Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931.

Gutiérrez JM, Theakston RD, Warrell DA (2006) Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Medicine* 3, 150.

Kjellén L, Lindahl U (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60, 443-475.

Mabeau S, Kloareg B, Joseleau J (1990) Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry* 29, 2441-2445.

Lizano S, Lomonte B, Fox J, Gutierrez JM (1997) Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochemical Journal* 326, 853-859.

Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson L, Maccarana M (1994) Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *Journal of Biological Chemistry* 269, 29867-29873.

- Lomonte B (1994) Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. Tesis Doctoral. Universidad de Göteborg, Suecia.
- Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, Daniele JJ, Geoghegan P, Gutiérrez JM (1999) Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon* 37, 145-158.
- 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.
- Otero R, Gutiérrez JM, Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Arango J, Gómez F, Toro A, Cano F, Rodríguez M, Martínez J, Cornejo W, Gómez M, Uribe F, Cárdenas S, Núñez V, Díaz A (2002) Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40, 1107-1114.
- Rucavado A, Escalante T, Franceschi A, Chaves F, León G, Cury Y, Ovadia M, Gutiérrez JM (2000) Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. *Am J Trop Med Hyg* 63, 313-319.
- Solórzano A (2004) Serpientes de Costa Rica, 791 pp. Editorial InBio, San José, Costa Rica.