

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD PLA2 EN EL VENENO DE
LA SERPIENTE *Bothrocophias myersi*.**

TATIANA LOZANO GONZÁLEZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD PLA2 EN EL VENENO DE
LA SERPIENTE *Bothrocophias myersi*.**

TATIANA LOZANO GONZÁLEZ

**ASESOR: Santiago Castaño Valencia Ph.D, profesor tiempo completo
Universidad ICESI**

**CO-ASESORES: Guillermo Montoya Ph.D, Fernando Castro Ph.D y Flavio
Cerón.**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

AGRADECIMIENTOS

En este trabajo quiero agradecer al profesor Santiago Castaño, al profesor Guillermo Montoya y Flavio Cerón, de la Universidad Icesi, por el apoyo en la realización de este trabajo.

Christian Yeres, de la Universidad Icesi, en el acompañamiento del uso de los equipos de laboratorio; Carlos Galvis del Zoológico de Cali por brindar los venenos de las especies de estudio de este trabajo.

Doctor Andrés Pereañez de la Universidad de Antioquia programa de Química Farmacéutica, por proveer la PLA2 (pura) de *Crotalus durissus*.

A los profesores Claudia Patricia Marín y Constain Hugo Salamanca que a pesar de no ser del área de este estudio su apoyo fue incondicional.

Agradezco también la confianza y el apoyo brindado por parte de mi familia, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me han demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos, que con sus consejos me ha ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

A Juan Sebastián Herrera y Juan Sebastián Valencia por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con ellos.

Finalmente a Camila Viteri, Ana Millán y Julia Marmolejo porque cada una con sus valiosas aportaciones hicieron posible este proyecto y por la gran calidad humana que me han demostrado con su amistad.

Tatiana Lozano González

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	9
1.1 ABSTRACT	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
4. MARCO TEÓRICO.....	14
4.1 Serpientes venenosas.....	14
4.1.1 <i>Bothrocophias myersi</i>	14
4.2 Veneno de las serpientes.....	16
4.2.1 Veneno de las serpientes de la familia Viperidae.	16
4.3 Fosfolipasa A2	16
4.3.1 PLA2 II Lys49 (miotoxina II).....	18
4.3.2. PLA2 II Asp49 (miotoxina I).	19
4.4 Técnica de halo de hemólisis para detectar actividad tipo PLA2	20
4.5 Cromatografía líquida para separar fracciones de enzimas con actividad PLA2 en venenos de serpientes	21
4.6 Técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida para identificación de enzimas con actividad PLA2	22
4.7 Estado del arte.....	24
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos Específicos.....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Condiciones en que se consiguieron los Venenos y tratamiento pre-experimentación.....	27
6.2 Hemolisis radial indirecta	27
6.3 Fraccionamiento UPLC con columna ACQUITY UPLC BEH 200 SEC 1,7 µm; 4,6* 150 µm.....	29
6.4 Electroforesis SDS-PAGE de venenos enteros y PLA2 (patrón de <i>C. durissus</i>)	31
7. RESULTADOS	38
7.1 Hemolisis Radial Indirecta.....	38

7.2 Cromatografía Líquida por Exclusión de Tamaño	41
7.3 Electroforesis de Poliacrilamida SDS-PAGE	47
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
8.1 Hemolisis Radial Indirecta.....	48
8.2 Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC)	48
8.3 Electroforesis	49
9. CONCLUSIONES	50
10. RECOMENDACIONES	50
11. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES

Figura 1. Fotografía de <i>Bothrocophias myersi</i>	15
Figura 2. Mapa de distribución interactivo de la especie <i>B. myersi</i>	15
Figura 3. Diferencias en el Loop de unión al calcio de las fosfolipasas A2 D49 y K49	18
Figura 4 Mecanismo catalítico de la PLA2 Asp49.	20
Figura 5. Lisis de eritrocitos por veneno serpiente (de <i>Bothrops asper</i>) en una placa de agar sangre.....	21
Figura 6. Esquema de la técnica de Cromatografía de permeación de gel, de tamiz molecular o de exclusión por tamaños.	22
Figura 7. Ilustración de un equipo usado para Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.	24
Figura 8. Análisis SDS-PAGE del Marcador de Rango Amplio sc-2361	37
Figura 9. Placas de agar sangre con EDTA, <i>B. myersi</i> luego de 1 hora de incubación.	38
Figura 10. Placas de agar sangre con CaCl ₂ <i>B. myersi</i>	39
Figura 11. Placas de agar sangre con EDTA, <i>C. durissus</i>	39
Figura 12. Placas de agar sangre con CaCl ₂ , <i>C. durissus</i>	40
Figura 13. Placas de agar sangre con EDTA, <i>B. asper</i>	40
Figura 14. Placas de agar sangre con CaCl ₂ , <i>B. asper</i>	41
Figura 15. Cromatograma a 280 nm de las 4 muestras con fase móvil de solución Sodio Fosfato 25mM pH6. , Cloruro de Sodio 125mM; Acetonitrilo (90:10).	43
Figura 16. Cromatograma a 215 nm de las 4 muestras con fase móvil de solución Sodio Fosfato 25mM pH6. , Cloruro de Sodio 125mM; Acetonitrilo (90:10).	44

Figura 17. Cromatograma a 280 nm de las 4 muestras con fase móvil de Buffer Sodio Fosfato 100mM pH 6.8.....	45
Figura 18. Cromatograma a 215 nm de las 4 muestras con fase móvil de Buffer Sodio Fosfato 100mM pH 6.8.....	46
Figura 19. Gel de electroforesis teñido con azul de commassie diluciones de C. durissus, B. asper y B. myersi, PLA2 patrón puro de C. durissus con marcador molecular.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación del gel separador 13%.	32
Tabla 2. Tampón para el gel separador Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	32
Tabla 3. SDS al 10% (peso/volumen)	32
Tabla 4. Acrilamida/Bis acrilamida Stock 30%	32
Tabla 5. Persulfato amónico (APS) al 10%	33
Tabla 6. Preparación del gel concentrador 3%	34
Tabla 7. Tampón para el gel separador Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	34
Tabla 8. Buffer de corrida para las muestras	34
Tabla.9 Buffer de electroforesis	35
Tabla 10. Tampón de Tinción de azul de Coomassie	36
Tabla 11. Solución decolorante para los geles de poliacrilamida	36

1. RESUMEN

Las Fosfolipasas A2 (PLA2) hacen parte de un diverso grupo de enzimas que juegan un rol importante en diversos procesos celulares y fisiológicos de los vertebrados. Estas intervienen en señales de transducción que activan diferentes procesos como contracción de músculo liso, otras activan la cascada de inflamación mientras otras intervienen en procesos digestivos del intestino de vertebrados procesando lípidos para su posterior absorción.

Algunos organismos como las serpientes venenosas (de la familia Viperidae) presentan adaptaciones y modificaciones de enzimas derivadas de glándulas salivales, donde se producen las PLA2 digestivas homólogas a las producidas en el páncreas que son liberadas en el intestino de vertebrados mamíferos. A diferencia de los mamíferos, las PLA2 de serpientes son inyectadas en las presas como agentes pre-digestivos de acción rápida o son inyectadas en agresores potenciales como medio de defensa.

Las PLA2 del veneno de Vipéridos dependen de la especie y pueden ser neurotóxicas y miotóxicas, siendo las últimas las que provocan destrucción de las membranas estructurales, produciendo inicialmente inflamación y dañando intensamente el músculo hasta necrosarlo.

Bothrocophias myersi (*B. myersi*) es una de las serpientes de la familia Viperidae. La composición y efectos de los venenos y sus fracciones, no han sido estudiadas por ser una especie rara, que habita zonas alejadas en el Chocó biogeográfico y además, nunca se había reportado un accidente ofídico hasta el año 2008, año en el cual el profesor Fernando Castro de la Universidad del Valle, sufrió un accidente por la mordedura de esta especie y presentó un proceso inflamatorio que se sospecha es atribuible a la actividad de la PLA2.

Una de las formas rápidas y económicas de detectar la actividad de algunas de las PLA2 es mediante la prueba de hemólisis radial indirecta (glóbulos rojos inmovilizados en agar), la cual permite detectar la actividad lítica de la enzima PLA2 gracias a un cambio en la decoloración del agar donde se produce la ruptura de los eritrocitos.

En este proyecto se propuso detectar si el veneno de *B. myersi* producía hemólisis (empleando la técnica anteriormente mencionada) y compararlo con efectos similares producidos por los venenos ya estudiados de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus*. También se propuso hacer una aproximación al fraccionamiento del veneno entero de *B. myersi* para detectar fracciones que posiblemente tengan la PLA2.

Para lograr los propuestos anteriores, se hizo prueba de hemólisis con veneno entero de *Bothrocophias myersi*, *Bothrops asper* y *Crotalus durissus*. Igualmente se caracterizó en el perfil de absorbancia de las cromatografías del veneno de cada una de las tres especies mediante cromatografía líquida (UPLC con una columna ACQUITY UPLC BEH 200 con detección UV a 280nm) y Electroforesis de proteínas SDS-PAGE. Tanto para la técnica de Cromatografía Líquida como para la electroforesis se corrió muestra de una PLA2 (Lítica) de *Crotalus durissus* con el propósito de verificar el tiempo de retención como el peso molecular.

Como resultado de este trabajo se puede decir que:

1. El veneno de *Bothrocophias myersi* produce halo de hemólisis. Estos resultados sugieren la presencia de PLA2 lítica.
2. El fraccionamiento de los venenos de la serpiente objeto de estudio empleando, para las diluciones del veneno entero de la especie objeto de estudio como para los venenos control y para la fracción aislada PLA2 patrón, se obtuvieron los cromatogramas que mostraron diferencias en los picos de absorbancia (280nm) y sus tiempos de retención; la PLA2 pura mostró un tiempo de retención de 10.318 minutos de su pico más alto, en la *B. myersi*, *B. asper* y *C. durissus*, además de aparecer picos representativos de otras moléculas de la composición de su veneno, se encuentran un pico bastante predominante en un tiempo de retención parecido al de la enzima pura empleada, 10.666, 10.379, 10.221 minutos respectivamente, indicando que este es el tiempo en el cual se podría colectar para aislar la enzima en la muestra de veneno entero (para trabajos posteriores).
3. La electroforesis mostró bandas bien marcadas que coinciden en posición en el gel tanto para los tres venenos (*B. myersi*, *B. asper* y *C. durissus*) como para la PLA2 (*C. durissus*) pura y todas coinciden con un peso molecular cercano a 14 kDa.

La evidencia experimental obtenida sugiere que en el veneno de *B. myersi* puede estar presente al menos un tipo de PLA2 con actividad lítica.

1.1 ABSTRACT

The Phospholipase A2 (PLA2) are part of a diverse group of enzymes that play an important role in diverse cellular and physiological processes in vertebrates. These are involved in signal transduction processes that activate different as smooth muscle contraction, activate other inflammatory cascade, while others are involved

in digestive processes of vertebrate intestine lipid processed for subsequent absorption.

Some organisms such as poisonous snakes (Viperidae family) present adaptations and modifications of enzymes derived from salivary glands, where they produce digestive PLA2 homologous to those produced in the pancreas that are released in the intestines of mammals vertebrates. Unlike mammals, snake PLA2 are injected into pre-dams as digestive agents swift action or are injected into potential aggressors as a defense.

The viper venom PLA2 species dependent can be neurotoxic and miotoxics, the latter being those that cause destruction of the structural membranes, initially causing inflammation and muscle damaging intensively until necross it.

Bothrocophias myersi (*B. myersi*) is one of the family Viperidae snakes. The composition and effects of poisons and their fractions have not been studied to be a rare species, inhabiting remote areas in the Chocó and also had never reported an accident ophidism until 2008, the year in which the professor Fernando Castro of the Valle University, was injured by the bite of this species and presented a suspected inflammatory process is attributable to the activity of PLA2.

One fast and economical ways of detecting the activity of some of the PLA2 is through the indirect radial haemolysis (red blood cells immobilized in agar), which allows to detect lytic activity of the enzyme PLA2 due to a change in the bleaching agar where the rupture of erythrocytes takes place.

This project is proposed to detect whether the venom hemolysis *B. myersi* produced (using the above technique) and compare it with similar effects as studied by *Bothrops asper* and *Crotalus durissus* venom. It was also proposed an approach to the fractionation of whole venom of *B. myersi* to detect fractions possibly have the PLA2.

To achieve the above criteria, hemolysis test was made with whole *Bothrocophias myersi*, *Bothrops asper*, *Crotalus durissus* venom. Also was characterized by absorbance profile chromatographies venom each of the three species by liquid chromatography (UPLC with ACQUITY UPLC BEH column 200 with UV detection at 280nm) and SDS-PAGE electrophoresis of proteins. For both liquid chromatography technique to electrophoresis shows a PLA2 (lytic) of *Crotalus durissus* was run in order to verify the retention time and molecular weight.

As a result of this work we can say that:

1. *Bothrocophias myersi* venom produces halo of hemolysis. These results suggest the presence of lytic PLA2.

2. Fractionation of snake venoms using object of study, to dilute whole venom of the species under study and for monitoring for poisons and PLA2 isolated fraction pattern, the chromatograms showed differences in absorbance peaks were obtained (280nm) and their retention times; pure PLA2 showed a retention time of 10,318 minutes of its peak in *B. myersi*, *B. asper* and *C. durissus* also representative of other molecules peaks appear the composition of the poison are quite predominant peak at a retention time similar to the pure enzyme employed , 10,666 , 10,379 , 10,221 minutes respectively, indicating that this is the time in which it may be collected for isolating the enzyme in the sample of whole venom (for future work) .

3. Electrophoresis showed good matching labeled bands on the gel in place for both the three poisons (*B. myersi*, *B. asper* and *C. durissus*) as for PLA2 (*C. durissus*) pure and all agree with a close molecular weight 14 kDa .

The obtained experimental evidence suggests that in the venom of *B. myersi* may be present at least one type of PLA2 with lytic activity.

2. INTRODUCCIÓN

Los accidentes ofídicos (mordeduras de serpientes) son un problema de salud pública en Colombia y la mayor parte de los accidentes son producidos por especies de la familia Viperidae especialmente por las especies *Bothrops asper*, *Bothrops atrox* y *Crotalus durissus*. Los accidentes producidos por estas especies producen inflamación y edema de la zona mordida, alteraciones de la coagulación y necrosis. El edema, la inflamación y la necrosis son producidos por fosfolipasas de los tipos IIPLA2 que actúan sobre membranas lipídicas de las células.

Estas pueden actuar lizando los lípidos de la membrana (actividad enzimática dependiente de Calcio) o desestabilizando la membrana por deformación física mediante acomplejamiento entre las fosfolipasas y la membrana celular generando permeabilización de la membrana a los iones ya otras moléculas pequeñas.

Para los viperidos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis* existen tratamientos antiofídicos específicos (Suero polivalente para mordedura de vipéridos Antiofídico-Antilachesico-Anticrotálico), no así para para especies raras como es el caso de la especie *Bothrocophias myersi*, la cual es endémica de una zona específica del Chocó Biogeográfico.

En el año 2008 se presentó el único accidente reportado para esta especie (*Bothrocophias myersi*). Entre los síntomas que presentó el paciente que padeció la mordedura están: inflamación inmediata, dolor intenso local y un edema notorio. No se presentaron alteraciones de la coagulación, resultado que contrasta con los casos de las mordeduras de otros vipéridos. El paciente fue tratado con suero polivalente antiofídico para vipéridos (inespecífico) y analgésicos y salió de la crisis tóxica.

Dado que no se conocen los componentes del veneno de la especie, los síntomas que presentó el paciente que se correlacionan con actividad de tipo fosfolipasa II PLA2, en este trabajo se propuso de forma preliminar, verificar la actividad de la toxina y caracterizar su presencia mediante técnicas de química analítica y bioquímica.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los accidentes ofídicos son un problema de salud pública en Colombia y la Familia de serpientes sobre las que se reportan más accidentes ofídicos pertenecen a la familia Viperidae. *Bothrocophias myersi*, es una especie rara y no estudiada y sólo se ha reportado un accidente ofídico por esta especie, en el año 2008. Los síntomas de edema e inflamación sugieren hipotéticamente que hay presencia de fosfolipasas II tipo 2 (IIPLA2) que solo están presentes en la familia.

Por todo lo anterior se propuso hacer este trabajo con el propósito de avanzar en el estudio y posible reporte de nuevas toxinas (de la especie problema), proyectar terapias específicas para este tipo de envenenamiento y a futuro desarrollar nuevos medicamentos a partir de toxinas modificadas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Serpientes venenosas

Gracias a la selección natural las serpientes venenosas han obtenido una modificación en su saliva con una combinación de diferentes proteínas y enzimas, el cual es inyectado por sus colmillos acanalados, y lo utilizan como medio de defensa o para poder inmovilizar a su presa (Mackessy, 2002).

Se conocen 5 familias de serpientes venenosas: *Atractaspididae*, *Colubridae*, *Elapidae*, *Hydrophiidae* y *Viperidae* (O'Shea, 2008); En Colombia se encuentran serpientes venenosas de la familia *Viperidae*, las cuales están involucradas en el 90% de los accidentes ofídicos reportados en el país, y la familia *Elapidae*, que están involucradas en el 10% de los accidentes ofídicos reportados en Colombia (Patiño, 2002).

La familia *Viperidae* comprende un grupo de serpientes que presentan un cráneo con huesos reducidos, colmillos con dentición solenoglifa (colmillos ahuecados como hipodérmica) y adheridos al maxilar que es kinético, es decir con movimiento articulado en la mandíbula, los colmillos pueden erguirse cuando la serpiente abre la boca para atacar, y se pliegan de nuevo contra el techo bucal cuando cierra la boca

De la familia *Viperidae* se encuentran en el país estas dos géneros más importantes, el género *Bothrops* conocida como Mapaná o cuatro narices, está ampliamente distribuida en los bosques húmedos y plantaciones de caña y arroz, en el país, y la especie *Crotalus durissus terrificus*, que se distribuye en las regiones áridas y semiáridas de la costa atlántica.

4.1.1 *Bothrocophias myersi*

La especie *Bothrocophias myersi* hace parte de la familia *Viperidae* de las serpientes venenosas, puede llegar a medir más 75 cm de largo, tiene líneas tenues que forman figuras de X en su dorso y en su zona ventral tiene un color rojizo, es por esto que es conocida como equis roja, y su cabeza es de un marrón oscuro, por lo que también se conoce como cabeza de lanza chocoana, como lo muestra la Figura 1 (Serpentario de Colombia, 2010).



Figura 1. Fotografía de *Bothrocophias myersi*. (Castro Herrera, 2013)

Esta especie habita en los bosques húmedos del pacífico colombiano, específicamente en los departamentos del Cauca y Valle del Cauca (Figura 2.), y es por esto que es considerada como una especie de preocupación menor, ya que está en zonas poco pobladas o que no han sido intervenidas, por lo que es menos probable que se la especie experimente descensos significativos en su población (Castro Herrera, 2013).



Figura 2. Mapa de distribución interactivo de la especie *B. myersi* (Timms, 2010)

Es una serpiente terrestre que puede ser activa en el día, pero lo es más en la noche, y se alimenta de pequeños roedores, reptiles y algunos anfibios. Respecto a su reproducción, se sabe que con vivíparas pero no se tiene conocimiento sobre cuál es la temporada en la que se aparean y nacen sus crías, tampoco se tiene

una clara idea sobre cuantas crías pueden llegar a tener (Instituto Bioclon & Laboratorio Silanes, 2011)

4.2 Veneno de las serpientes

El veneno de las serpientes es considerado como una de las mezclas tóxicas más complejas que puede haber en la naturaleza, ya que el 95% de su composición es por pequeños péptidos, enzimas y toxinas, los cuales sirven para defenderse de los depredadores y para lograr que su presa no ponga resistencia, provocando una parálisis (Zugasti, Cepeda, & Morlett, 2009).

Estas decenas de toxinas enzimáticas hacen parte de pequeños grupos de clases de enzimas, por ejemplo, fosfodiesterasas (degradación de ácidos nucleicos y eficiente acción sobre el ADN como ARN) (Yarlequé Chocas, 2000), fosfomonoestearasas (producción de adenosina por catalización de hidrolisis de ésteres de fosfato) (Bergillos Gasió & Rivas Fernández, 2013), fosfolipasas A2 (desestabilización de la membrana y ruptura de ésta) (Maruñak & Ruiz de Torrent, 2005), L-aminoácido oxidasas (inducción de hemorragia y apoptosis) (Torii & Yamane, 2000).

4.2.1 Veneno de las serpientes de la familia Viperidae.

En la familia de las serpientes Viperidae su veneno está compuesto principalmente por enzimas hemotóxicas, pero algunas pueden ocasionar efectos neurotóxicos (Rehman, 1991), pero la inyección de este veneno ocasiona una gran letalidad (Neves-Ferreira & Cardinale, 2000) porque tiene enzimas responsables de miotoxicidad necrosis tisular, actividad anticoagulante o coagulante (Meaume, 1966), y tiene proteínas no enzimáticas como lo son los factores de crecimiento, las de agregación plaquetaria, inhibidores de proteinasas, entre otros (Rehman, 1991).

El efecto de miotoxicidad es ocasionado por la PLA2 del grupo II, y éstas tienen características muy similares a aquellas enzimas PLA2 que se encuentran en el exudado inflamatorio de los mamíferos.

4.3 Fosfolipasa A2

Las PLA2 realizan una hidrolisis en el enlace acil-éster de la posición sn2-acil de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos (Domont &

Perales, 2003). Es por su amplia distribución en la naturaleza, las fosfolipasas A2 se pueden clasificar de acuerdo según su masa molecular, sus puentes disulfuros, su secuencia y su requerimiento del ion calcio para poder funcionar (Fernandez Culma, 2013), y es por estas características que las PLA2 se pueden distribuir en diferentes categorías, como por ejemplo, citosolicas, secretadas, independientes de calcio, lipoproteínas asociadas a acetilhidrolasa, entre otras (Dennis & Cao, 2011).

La PLA2 es una enzima que tiene una actividad miotóxica, la cual tiene un mecanismo no enzimático y conduce a la necrosis muscular severa (Nicastro & Franzoni, 2003), su gran familia de proteínas tienen una homología bastante notable y al momento de realizar sus funciones en el cuerpo del ser vivo, sus funciones moleculares son bastante parecidas. (Soares & Giglio, 2003)

Las PLA2 secretadas fueron las primeras moléculas de esta familia en identificarse y tienen características de bajo peso molecular, ser dependientes de calcio y tener una diana de histidina aspartato en el sitio activo (Dennis & Cao, 2011). Se encuentran principalmente en el veneno de los animales ponzoñosos (escorpiones, avispas, abejas y serpientes) (Kini, 2003), y gracias a esta enzima, estos animales pueden inmovilizar y cazar a sus presas. Estas PLA2 secretadas se dividen en dos clases principalmente, PLA2 del grupo I y PLA2 del grupo II (Ohno & Chijiwa, 2003)

Fosfolipasas A2 del grupo I se han reportado en mamíferos, ya que estructuralmente se parecen a las PLA2s pancreáticas; también se han reportado en las serpientes de la familia Elapidae ocasionando efectos neurotóxicos pre y post sinápticos (Fernandez Culma, 2013), son altamente tóxicas y pueden ocasionar miotoxicidad (Lomonte & Angulo, 2003).

Las Fosfolipasas A2 del grupo II son similares estructuralmente a las PLA2 secretoras-inflamatorias no pancreáticas de los mamíferos (Fry & Wüster, 2004); además hace parte del veneno de la familia de las serpientes Viperidae y se dividen en dos miotoxinas (Ohno & Chijiwa, 2003), las que poseen una actividad enzimática como la PLA2 con un aspartato en la posición 49 (Asp49 o D49-miotoxina I) realizan una catálisis a donde llegan, y las fosfolipasas homologas, las cuales su actividad enzimática es muy baja al tener una Lisina en la posición 49 (Lys49 o K49- miotoxina II), como se evidencia en la figura 3 (Domont & Perales, 2003).

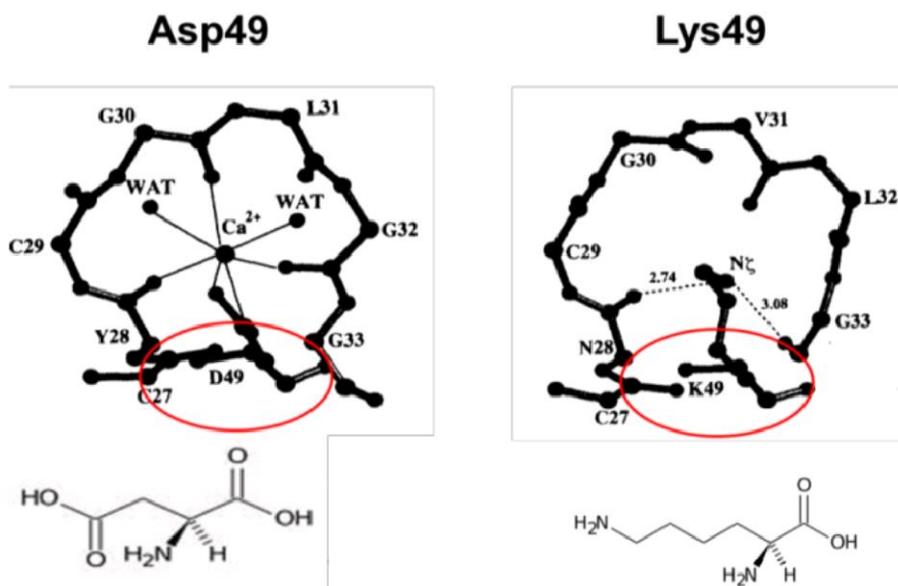


Figura 3. Diferencias en el Loop de unión al calcio de las fosfolipasas A2 D49 y K49, se resalta en la figura la región del sitio catalítico, para las D49 la formación de la estructura bi-piramidal-pentagonal, compuesta por el Ca²⁺, los oxígenos del carboxilato del residuo de D49, junto con el oxígeno del carbonilo de los átomos y dos moléculas de agua, Mientras que para la K49, carecen de esta formación. Abajo se señala la estructura de los aminoácidos D49 y K49. Tomado de Fernández Culma, 2013 que lo tomó de Ami *et al.*, 1996.

4.3.1 PLA2 II Lys49 (miotoxina II).

Su estructura es muy similar a la Asp49 porque tienen tres hélices alfa entre los residuos 1-12, 37-54 y 90-109, dos hojas beta anti paralelas que se mantienen unidas por 7 puentes disulfuro (Ownby & Selistre de Araujo, 1999); pero hay una diferencia bastante importante entre la miotoxina II y la miotoxina I y esa es en el loop de unión a calcio, porque Asp49 tiene una estructura bi-piramidal pentagonal conformada por el ion calcio, y Lys49 no puede realizar esa estructura.

Esta toxina puede llegar a tener 2 conformaciones (abierta y cerrada), dando una forma de pinzas con los dominios C-terminales (Soares & Giglio, 2003), los cuales son reconocidos como las regiones miotóxicas (Fernández Culma, 2013) y son bastante ricos en residuos catiónicos e hidrofóbicos. (Ohno & Chijiwa, 2003).

La PLA2 Lys49 cuando entra en contacto con la membrana la desestabiliza porque esta proteína tiene secciones que están cargadas positivamente y al entrar en contacto con las cargas negativas de los fosfolípidos, ocasionan una interacción electrostática y esto ocasiona una fuerte actividad miotóxica, porque hay una interacción hidrofóbica que permite la penetración de toxinas como la PLA2 Lys49 (Gutiérrez, 2002) (Falconi, Desideri, & Rufini, 2000).

La PLA2 Lys49 causa daño a la membrana al ocasionar efectos edematizantes y mionecróticos, los cuales de una forma indirecta activan toda una respuesta inflamatoria, porque activan y liberan citoquinas y producen una desgranulación de mastocitos (Lomonte & Angulo, 2003) (Teixeira & Cury, 2009)

4.3.2. PLA2 II Asp49 (miotoxina I).

La miotoxina II posee una masa molecular entre 14kDa y 18 kDa, los 7 enlaces disulfuro al igual que la PLA2 Lys49 (Arni & Ward, 1996), tiene un sitio de unión al ión calcio en una orientación estereoscópica que tiene esta enzima y así poder unirse a la membrana celular (Scott & Sigler, 1994). Esta unión al calcio hace que su actividad catalítica dependa de éste y el aspartato en la posición 49 juega un papel crucial en el estado intermedio de las PLA2s que son catalíticamente activas (Angulo Ugalde, 2005).

El sitio catalítico de esta miotoxina está constituido por cuatro aminoácidos que se encuentran en las dos hélices alfa (His48, Asp49, Asp99 y Tyr52) y el sitio en donde está unido el calcio se constituye gracias a dos átomos de oxígeno que se encuentran en el carboxilo del aminoácido Asp49 (Angulo Ugalde, 2005).

El beta carboxilato del Asp49 interacciona con los oxígenos carbonilos de los residuos de Tirosina en la posición 28 y Glicina en las posiciones 30 y 32, dos moléculas de agua y el ion calcio; el aminoácido Histidina en la posición 48 extrae un protón de las moléculas de agua, permitiendo que la proteína obtenga una carga positiva y así realizar el ataque nucleofílico, y la carga se estabiliza finalmente con las uniones del hidrógeno con el Asp 99 (ver Figura 4) (Scott & Sigler, 1994) (Scott & White, 1990)

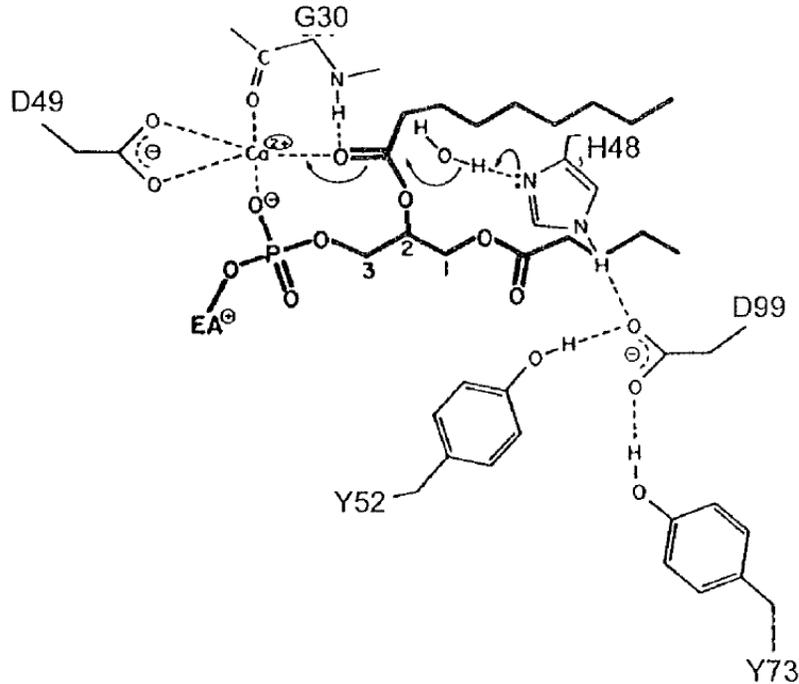


Figura 4 Mecanismo catalítico de la PLA2 Asp49. Tomado de Angulo Ugalde (2005) que fue tomado de Scott & White (1990)

4.4 Técnica de halo de hemólisis para detectar actividad tipo PLA2

Una de las formas efectivas y de bajo costo para evaluar actividad de enzimas PLA2 de serpientes es la de utilizar geles de agar con eritrocitos (adicionalmente se colocan otros componentes secundarios). Por lo general se ha visto que al sembrar en un punto del gel, un pequeño volumen (del orden de μL) de PLA2 de serpientes y solución salina, comienza a producir la ruptura de los glóbulos rojos, liberando el contenido citoplasmático y produciendo una coloración diferente a la del gel con los glóbulos intactos.

La forma circular de la lisis es llamada halo de lisis y varios autores han estandarizado la técnica de detección sembrando un volumen discreto y midiendo el halo de hemólisis a un tiempo determinado. (Stabeli *et al*, 2012)



Figura 5. Lisis de eritrocitos por veneno serpiente (de *Bothrops asper*) en una placa de agar sangre. En el centro de la placa se aprecia una coloración amarilla, indicando ruptura de glóbulos rojos por el veneno de la serpiente. (Figura tomada por Lozano, T. 2013)

La PLA2 ASP49 es una enzima dependiente de calcio y tendrá un mayor efecto cuando está en presencia del ión calcio (Burke & Dennis, 2009), produciendo una lisis rápida y notoria de los glóbulos rojos; y cuando se realiza una quelación con EDTA sódico se consigue la eliminación del calcio iónico circulante, disminuyendo la potencia de aquellas enzimas dependientes de éste ión. (Gutiérrez *et al*, 1995)

4.5 Cromatografía líquida para separar fracciones de enzimas con actividad PLA2 en venenos de serpientes

La exclusión molecular ha sido una de las técnicas más utilizadas en el aislamiento y purificación de enzimas que se encuentran en el veneno de serpientes del género *Bothrops* que tienen actividad tipo fosfolipasa (Simões-Silva *et al*, 2012). Este tipo de separación no existe una interacción física o química entre las moléculas del analito y la fase estacionaria, siendo utilizados actualmente para la separación de las moléculas con peso molecular alto (Stabeli *et al*, 2012)

En la cromatografía de exclusión por tamaño se utiliza una columna que esta rellena con un material bastante poroso; cuando las moléculas disueltas de varios tamaños fluyen dentro de este tipo de columna, las más pequeñas recorren a menor velocidad el material poroso de la columna porque penetran profundamente en los poros, ocasionando que salgan en un tiempo mayor, mientras que las

grandes recorren a mayor velocidad la columna, porque no atraviesan los poros y salen de la columna en un tiempo menor. (González Benito, 2008)

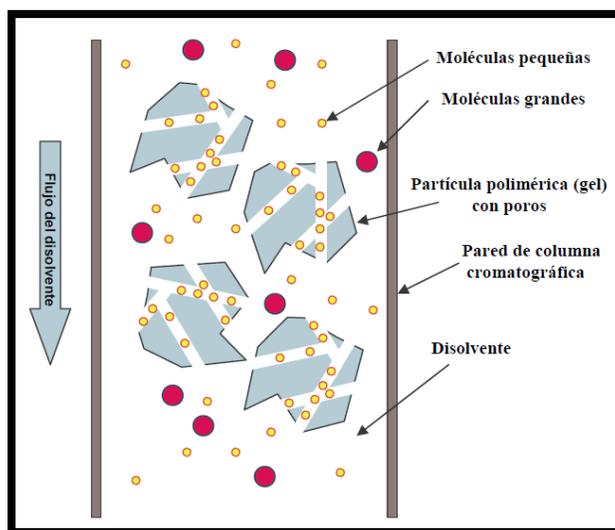


Figura 6. Esquema de la técnica de Cromatografía de permeación de gel, de tamiz molecular o de exclusión por tamaños. (González Benito, 2008)

Dependiendo de la forma en que se use la fase móvil se tienen dos métodos, el primero es el isocrático, el cual durante toda la separación de las moléculas se utiliza siempre el mismo solvente y el segundo que se hace con un gradiente de elución, donde se cambia la composición de la fase móvil (Cilla García, 2013).

4.6 Técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida para identificación de enzimas con actividad PLA2

Mediante la electroforesis es posible separar moléculas biológicas en dependencia fundamentalmente de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. Es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos negativo y positivo), dependiendo de su carga neta, peso molecular y estructura tridimensional. (Spring, 2006)

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, forma geles transparentes con estabilidad mecánica, relativamente no iónicos y permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la

concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. (Peek & Williams, 2001)

El SDS-PAGE es un método relacionado con la migración de partículas cargadas en un medio bajo la influencia de un campo eléctrico continuo, desde el punto de vista electroforética, las propiedades más importantes de las proteínas son masa molar, carga y conformación. Electroforesis en gel de poliacrilamida permite el análisis de la proteína en su forma nativa o desnaturalizada. (Campbell & Farrell, 2009)

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. (Maldonado Alconada & Jorrín Novo, 2006)

Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno, por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible. (Peek & Williams, 2001)

Los geles de poliacrilamida (PAGE) se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador (TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$), que se añade en forma de persulfato amónico. (Maldonado Alconada & Jorrín Novo, 2006)

Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida. Las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (β -mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. El SDS es un detergente de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1,4g de SDS por gramo de proteína, uniéndose una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. (Maldonado Alconada & Jorrín Novo, 2006)

Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su

masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. (Maldonado Alconada & Jorrín Novo, 2006)

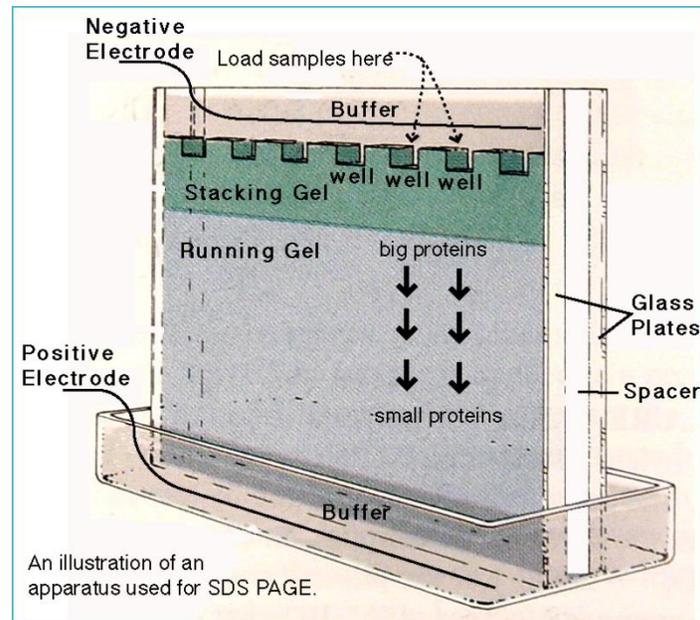


Figura 7. Ilustración de un equipo usado para Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes. Tomado de Peek & Williams (2001)

4.7 Estado del arte

Existen varios trabajos en los que se ha caracterizado varias fosfolipasas de viperidos. La técnica de halo de hemólisis fue propuesta por Gutierrez et al en 1995. Mediante esta se permitió de una forma económica identificar actividad tipo PLA2 enzimáticamente activa.

La identificación de estas proteínas se ha llevado acabado gracias a una separación de moléculas con ayuda de una columna de exclusión por tamaño en combinación con una cromatografía de intercambio iónico con dos tipos de resinas que mejoren dicha separación; algunos estudios muestran que colocan las proteínas obtenidas en condiciones desnaturalizantes para realizar una electroforesis y así lograr identificarlas con su peso molecular y por una secuenciación.

La identificación de fracciones que contienen PLA2 para su posterior separación ha sido bien documentada. Por lo general las separaciones se hacen empleando

gel granulado G75 para hacer una separación macro y posteriormente se hace una separación refinada empleando HPLC con columna C18 en fase reversa. Sin embargo no se ha utilizado la columna ACQUITY UPLC BEH 200 SEC 1,7 µm; 4,6* 150 µm, para hacer este tipo de caracterizaciones para un fraccionamiento posterior.

La identificación de estas proteínas se ha llevado a cabo gracias a una separación de moléculas con ayuda de una columna de exclusión por tamaño en combinación con una cromatografía de intercambio iónico con dos tipos de resinas que mejoren dicha separación; algunos estudios muestran que colocan las proteínas obtenidas en condiciones desnaturizantes para realizar una electroforesis y así lograr identificarlas con su peso molecular y por una secuenciación.

Con la metodología Sephadex G75 y HPLC C18 fase reversa (Babaie *et al*, 2013) se ha hecho la caracterización de ellos tiempos de retención de diferentes toxinas de venenos de serpientes como por ejemplo la Cascabel (*Crotalus durissus*), la Cobra (*Naja naja*), la Barba amarilla (*Bothrops atrox*) y la Mapaná (*Bothrops asper*) (Marcussi & Sant'Ana, 2007).

La única evidencia que llevó a estudiar la actividad tipo fosfolipasa de la serpiente *Bothrocophias myersi*, fue el accidente por mordedura, que se presentó en el 2008. Accidente que le ocurrió al profesor Fernando Castro de la Universidad del Valle. Y como se había dicho este accidente produjo un edema y un proceso inflamatorio agudo que está altamente correlacionado con la actividad PLA2 enzimática

Pero hay una especie endémica del Valle del Cauca a la que todavía no se le ha realizado una identificación de los componentes más importantes que pueden tener los venenos de las serpientes Viperidae, y esa es la *Bothrocophias myersi*, la cual en el año 2008 ocasionó una mordedura al profesor Fernando Castro de la Universidad del Valle y le propició un edema y un proceso inflamatorio agudo

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Verificar la presencia de PLA2 en el veneno de *B. myersi*.

5.2 Objetivos Específicos

- Detectar efecto hemo-lítico *B. myersi*.
- Evaluar la coincidencia entre los tiempos de retención de una PLA2 (pura) de *Crotalus durissus* patrón y los picos de absorbancia del veneno entero de *B. myersi* empleando una técnica de cromatografía líquida.
- Estimar la coincidencia de peso molecular entre la bandas de una PLA2 (pura) de *Crotalus durissus* patrón y las bandas que presenta el veneno entero de *B. myersi*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Condiciones en que se consiguieron los Venenos y tratamiento pre-experimentación

Los venenos fueron donados por a la Fundación del zoológico de Cali y al banco de venenos de la Universidad del Valle (dirigido por el Doctor Fernando Castro) El patrón puro de PLA2 de la serpiente *Crotalus durissus* fue donada por el Doctor Andrés Pereáñez de la Universidad de Antioquia.

Los venenos y el patrón puro de PLA2 se conservaron a una temperatura de -18°C y al momento de utilizarlos se diluyeron con buffer fosfato de sodio pH7,4.

6.2 Hemolisis radial indirecta

Para lograr registrar la hemolisis radial indirecta del veneno en agar-agar, se adaptó la técnica propuesta por Gutierrez *et al.*,(1988).

Utilizando placas de agar – sangre observó la lisis de glóbulos rojos producida por los dos venenos control (*B. asper* y *C. durissus*). Utilizando placas de petri de plástico de 15 mL se hizo registro Figuragráfico luego de sembrar 2µL de las diluciones del veneno en un pozo dispuesto en el agar.

Se usaron 250 mL del medio de cultivo para adicionar cloruro de calcio y otros 250 mL para adicionar un agente quelante, en este caso EDTA.

El calcio en medio fisiológico está a 0,01 mg/mL intracelular (Shen, Lee, & Soelaiman, 2002), se tomó esa concentración para agregarla al cultivo realizado con anterioridad, se hace un stock con 100 mg de cloruro de calcio y 10 mL de agua; para EDTA se agregan 1,5 g y se disuelven con 100 mL de agua.

El medio de cultivo se hizo de la siguiente forma:

1. Se mezclaron en un erlenmeyer de 500 mL, 480 mL H₂O con 7,5g de agar-agar y 4,45g de cloruro de sodio con ayuda de una plancha de calentamiento y magneto.
2. La mezcla anterior se llevó al equipo de autoclave aproximadamente por 2 horas.
3. Se esperó a que la temperatura del medio de cultivo estuviera entre 45° – 50°C para adicionar los eritrocitos y evitar su rompimiento por el calor.

Se separan los eritrocitos del resto de los componentes de la sangre, porque con ellos se observa si hay una ruptura de la membrana celular.

4. La sangre y la yema de huevo se lavaron con Buffer Fosfato pH 7,4 para aislar los eritrocitos de la sangre y los nutrientes de la yema. En un tubo Falcon de 50 mL se adicionaron aproximadamente 20 mL de sangre y 20 mL de buffer fosfato pH 7,4. Se realizaron tres lavados y en cada uno se descartó el sobrenadante; luego del 3 lavado están los eritrocitos. Este mismo proceso se realizó con la yema de huevo.
5. El total del medio fueron 500 mL, el cual se dividió en 250 mL para el CaCl₂ y 250 mL para el EDTA, por lo tanto, para un volumen final de 250 mL se adicionaron 0,25 mL del stock de CaCl₂ y 2,5 mL del stock de EDTA.

Las placas de petri se marcaron con las respectivas diluciones que se sembraron y de cual veneno son. Las placas no se taparon cuando el medio de cultivo se agregó porque la temperatura todavía era un poco alta y el vapor se podría quedar atrapado en la placa de petri, produciendo una pequeña condensación y las gotas de agua caen al cultivo dejando burbujas en él.

Se hicieron 6 diluciones del veneno puro con buffer fosfato pH 7,4 para que no se desnaturalicen las proteínas. Se hacen para saber qué tan grande es la actividad lítica de la fosfolipasa en el veneno de la serpiente. Las diluciones que se van a realizar son en 10, 50, 100, 250, 500 y 700 μ L.

Pesando el veneno puro extraído de la *C. durissus* se hace el Stock 1, el cual tendrá 10 μ L del veneno puro + 90 μ L del Buffer fosfato, esta es la dilución 1/10. Se hace el Stock 2, el cual tendrá 5 μ L del veneno puro + 45 μ L del Buffer fosfato.

A partir del Stock 2 se hacen las próximas 4 diluciones así:

- Dilución 1/50: 20 μ L Stock 2 + 80 μ L Buffer
- Dilución 1/100: 10 μ L Stock 2 + 90 μ L Buffer
- Dilución 1/250: 4 μ L Stock 2 + 96 μ L Buffer
- Dilución 1/500: 2 μ L Stock 2 + 98 μ L Buffer

Para la dilución 1/700 se realiza un tercer Stock, por lo tanto:

Stock 3: 5 μ L Stock 2+ 45 μ L Buffer

- Dilución 1/700: 14 μ L Stock 3 + 86 μ L Buffer

Son 6 diluciones en total, las cuales se ensayaron en 2 tipos de placas (CaCl y EDTA), por lo tanto fue un total de 4 placas, a las cuales se les adicionó 2 μ L de

cada dilución en las placas previamente marcadas con su respectivo compuesto adicional y con la dilución correspondiente. Luego de realizar la siembra de las diluciones en las respectivas placas, éstas se colocaron en un horno a 37° centígrados (temperatura corporal).

Se hizo un seguimiento fotográfico a las placas de agar sangre con siembra de cada veneno a una hora. La ruptura de los eritrocitos se puede diferenciar por tener una coloración amarilla en las figuras tomadas que aumenta su diámetro con el pasar del tiempo.

Las placas de agar sangre con cloruro de sodio y las placas de agar sangre con EDTA se incubaron a una temperatura de 37°C para poder simular la temperatura corporal humana y así tener un mejor resultado de la acción del veneno, y especialmente de la enzima, que se desea analizar.

6.3 Fraccionamiento UPLC con columna ACQUITY UPLC BEH 200 SEC 1,7 μm ; 4,6* 150 μm

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla compleja. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado.

La Ultra Performance Liquid Chromatography se basa en las mismas reglas y principios cromatográficos a los que se acostumbran con el HPLC con columnas de 5 μm y 3 μm , pero añade un diseño instrumental innovador específicamente creado para reducir y controlar el ancho de la banda cromatográfica. (Waters Corporation, 2008)

Para aprovechar plenamente la química de las partículas de menos 2 μm , el sistema ACQUITY UPLC exige caudales de la fase móvil generalmente más elevados para garantizar el funcionamiento en la región adecuada de la curva de rendimiento del caudal, así como las consideraciones básicas acerca de la transparencia y optimización de métodos. Se utilizó el método isocrático.

Las muestras se filtraron por un filtro QIA Shredder Mini Spin Column Store at 15-25°; se agregan 100 μL al filtro y se centrifugaron a 3000 rpm en 2 minutos.

Se utilizó un sistema ACQUITY UPLC-H-Class con detector de ordenamiento de Figuradiodos, una columna ACQUITY UPLC BEH 200 SEC 1,7 μm ; 4,6* 150 μm . El agua tipo 1 (Ultra pura) se utiliza para el lavado de la aguja y de los sellos del equipo UPLC.

Se utilizó una fase móvil de una solución de fosfato de sodio dibásico 25mM a pH 6.8, Cloruro de Sodio 150mM; se mezcla lo anterior con Acetonitrilo, la proporción del buffer debe ser 90:10 (Fosfato de sodio dibásico y Cloruro de sodio: Acetonitrilo), y una segunda fase móvil de Buffer fosfato de sodio 100mM pH 6.8.

Para la primera fase móvil, una solución de Fosfato de sodio dibásico 25mM, Cloruro de Sodio 150mM en combinación con Acetonitrilo, 250mL en proporción 90:10, se obtuvieron las siguientes cantidades de cada reactivo:

Se tomaron 2.192g de Fosfato de Sodio dibásico para obtener la concentración deseada, para el Fosfato de sodio dibásico se pesaron 0.887g para obtener la concentración final deseada (25mM)(Se ajusta el pH a 6.8) y para el acetonitrilo se utilizaron 25 mL.

Esta solución de sales y bases estuvo en una proporción donde 90% es la mezcla del Fosfato de sodio dibásico pH 6.8 25mM y el cloruro de sodio 150 mM y el 10% es el acetonitrilo. El volumen que se utilizó para toda la fase móvil fue de 250mL.

Para la segunda fase móvil, buffer fosfato de sodio 100mM pH 6.8, se pesaron 3.55g de Fosfato de Sodio dibásico, 3.45g de Fosfato de Sodio monobásico, se adicionaron a un erlenmeyer que tenía 500mL de agua destilada, y la solución final se filtró con una membrana de 0.22 μm , se verificó el pH e inicialmente estaba en 6,5 y se aproximó a 6.8.

Se configuraron las condiciones para la corrida de las diferentes muestras, como por ejemplo el flujo, tiempo de corrida, la fase móvil utilizada y las longitudes de onda en las que se leyeron las muestras.

Teniendo en cuenta que las proteínas tienen residuos de triptófano y tirosina, pueden ser leídas a una longitud de onda de 280nm, gracias a su anillo aromático, es por esto que se toma esta longitud de onda para hacer las lecturas de los venenos.

Una columna BEH 200 debe tener una presión alrededor de 7000 psi por 150 y 300 mm (Waters Corporation, ACQUITY UPLC BEH SEC COLUMNS AND STANDARDS, 2012), con lo anterior se utilizó un flujo de 0.150mL/min.

Se utilizó una temperatura de 15°C para mantener las muestras frescas y evitar degradaciones, pero la columna no tuvo ajuste de temperatura porque el preheater

se encontraba dañado en el momento en el que se hicieron las lecturas de las muestras.

Se utilizó una dilución 1/50 del veneno porque es una de las diluciones donde se cree tener mayor porcentaje de toxinas, las cuales mostrarán con mayor claridad una separación de acuerdo a su peso molecular, sin llegar a ocasionar un taponamiento en la columna.

Se seleccionaron de los tres venenos (*C. durissus*, *B. asper*, *B. myersi*) la dilución 1/50 para inyectar en el equipo de UPLC de Waters.

6.4 Electroforesis SDS-PAGE de venenos enteros y PLA2 (patrón de *C. durissus*)

Los geles de poliacrilamida actúan a modo de tamiz molecular retardando el movimiento de macromoléculas grandes mientras que permiten a moléculas más pequeñas moverse libremente, potenciando de esta forma la separación.

Para poder realizar la electroforesis se deben realizar dos tipos de geles, el primero es un gel separador o de corrida, en el cual se va a observar la separación de las proteínas de acuerdo a su carga y el segundo es un gel de apilamiento o stacking, que sirve de soporte para cargar las muestras y concentrar las proteínas en un solo punto, para que éstas ingresen en el gel separador uniformemente.

Realizando el gel de electroforesis de poliacrilamida SDS-PAGE, la cámara de electroforesis es conectada a la fuente y así se programa para tener las condiciones adecuadas para una electroforesis desnaturalizante. El voltaje se configura a 120 voltios, una corriente de 80 mA y se tuvo un tiempo de corrida de 2 horas.

En los pozos del gel se sembraron inicialmente 5µL del buffer de la muestra y se conectaron los electrodos a la fuente y comenzar la corrida por media hora, esto con el fin de despejar un poco los pozos de acrilamida y tener la base de lo que se debe esperar a que salga de la electroforesis, es decir, que cuando ese buffer inicial haya bajado completamente del gel, las proteínas van a estar lo mejor separadas posible.

A continuación se muestra el procedimiento para preparar cada uno de los geles

Preparación del gel de corrida al 13%.

Tabla 1. Preparación del gel separador 13%

Gel Separador al 13% de Acrilamida en Tampón Tris-HCl 0,375M pH 8,8	
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
SDS al 10%	0,1 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	4,3 mL
APS al 10%	0,05 mL
TEMED	0,005 mL
Agua tipo 1	Completar hasta 10 mL

Los volúmenes de la tabla 1 se obtienen de las siguientes soluciones madre.

Tabla 2. Tampón para el gel separador Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

Solución Tris-HCl 0,5M pH 6,8	
Tris-base	6,05 g
Disolver en 80 mL de agua destilada	
Ajustar pH 6,8 con HCl	
Llevar hasta 100 mL con agua destilada	

Tabla 3. SDS al 10% (peso/volumen)

SDS al 10%	
SDS	10 g
Disolver en 80 mL de agua destilada	
Llevar hasta 100 mL con agua destilada	

Tabla 4. Acrilamida/Bis acrilamida Stock 30%

Acrilamida/Bis acrilamida Stock 30%	
Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g
Agua	

Tabla 5. Persulfato amónico (APS) al 10%

Persulfato de amonio (APS) al 10%	
Persulfato de amonio	10 g
Disolver en 8 mL de agua destilada. Completar 10 mL con agua destilada	

Teniendo las soluciones madre de cada uno de los componentes del gel de corrida o separador, se realizó el siguiente procedimiento que está en el Procedimiento Operativo Estándar del laboratorio de biomédica de la Universidad Icesi.

1. Se mezclaron los componentes mencionados. (La polimerización comienza en el momento en que se añade el TEMED, por lo tanto se trabajó con rapidez a partir de este momento.)
2. Con cuidado, se añadió la mezcla en el interior del molde hasta una altura aproximada de 2 cm del borde superior de la placa mayor.
3. Dejando suficiente espacio para el gel concentrador y se debe calcular 1 cm más de la longitud de los pocillos del peine.
4. A continuación, se cubrió la superficie del gel con agua destilada. El agua genera peso y por esto hizo que el gel formara una línea recta y evita la formación montañas (las conocidas “sonrisas”). Previendo el contacto del oxígeno con el gel que inhibe la reacción de polimerización.

Cuando el gel de corrida se polimerizó se preparó inmediatamente el gel de apilamiento así como aparece a continuación,

Preparación del gel de apilamiento al 3%.

1. Se lavó la parte superior del gel 2-3 veces con agua destilada para eliminar cualquier residuo de acrilamida no polimerizada.

Tabla 6. Preparación del gel concentrador 3%

Gel Concentrador al 3% de Acrilamida en Tampón Tris-HCl 0,125M pH 6,8	
Tris Hcl 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
SDS al 10%	0,1 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	1 mL
APS al 10%	0,100 mL
TEMED	0,005 mL
Agua tipo 1	Completar hasta 10 mL

Tabla 7. *Tampón para el gel separador Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8*

Solución Tris-HCl 0,5M pH 6,8	
Tris-base	6,05 g
Disolver en 80 mL de agua destilada	
Ajustar pH 6,8 con HCl	
Llevar hasta 100 mL con agua destilada	

2. Se mezclan los componentes mencionados. (La polimerización comienza en el momento en que se añade el TEMED, por lo tanto se debe trabajar con rapidez a partir de este momento.)
3. Utilizando una pipeta Pasteur, se introduce la solución directamente sobre la superficie del gel separador.
4. Inmediatamente se inserta el peine en la solución concentradora con cuidado para evitar que se formen burbujas de aire.
5. Se espera hasta que el gel haya polimerizado (aproximadamente 30 minutos).
6. Se retira el peine cuidadosamente con un movimiento vertical.
7. Usando una botella de lavado, se enjuagan los pocillos 2-3 veces con agua destilada para eliminar cualquier resto de acrilamida.

Luego de tener el gel de poliacrilamida listo, se prepararon las muestras para la corrida.

Preparación de las muestras

En el tiempo de espera durante la polimerización se prepararon las muestras que se cargaron en el gel

Tabla 8. *Buffer de corrida para las muestras.*

Tampón de muestra^A	
Tris HCL 0,5M pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS 10%	1,6 mL
Azul de bromofenol ^B 1%	0,4 mL
2-mercaptoetanol ^C	0,4 mL
Agua	3 mL

A- *Debe prepararse antes de usar. Se puede preparar con anterioridad sin el 2 mercaptoetanol y almacenar el tampón a temperatura ambiente. El 2-mercaptoetanol se añade antes de usar el tampón.*

B- *Utilizar una solución concentrada previamente preparada que contiene 100 mg en 1000 μ L de agua.*

C- Se debe de manipular en campana de extracción porque es tóxico y huele feo.

Se toman 10 μ L de las fracciones en tubos eppendorff diferentes y se añade 10 μ L del tampón de las muestras. Hacer lo mismo con los estándares

Se fijan las tapas de los tubos eppendorff y se calientan en un termobloque a 100°C por 5 min. Se centrifugan a 15 segundos a máxima velocidad para concentrar el volumen en el fondo del tubo.

Electroforesis

Se insertan las placas con los geles polimerizados en la unidad de electroforesis

Se prepara el buffer de electroforesis

Tabla.9 Buffer de electroforesis

Tampón de electroforesis 1X tris glicina pH 8,3	
Tris-base	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
Disolver en 800 mL de agua	
Ajustar pH 8,3 con HCl	
Adicione agua hasta completar 1000 mL	

1. Se añade en los reservorios internos y externos de la cámara de electroforesis
2. Se retiran los restos de burbujas y de acrilamida de los pocillos adicionando más tampón.
3. Se aplican las muestras en los pozos (10-20 μ L) en un orden predeterminado y anotando previamente en la bitácora.
4. No olvidar añadir en uno de los pozos la dilución 1/100 de cada veneno para tenerlo como estándar. (Las muestras se añaden lentamente para que no se rebosen de los pozos)
5. Se conectan los electrodos a la cubeta de electroforesis y a la fuente de poder y se aplica corriente. La corriente eléctrica recomendada es de un voltaje de 120V y un amperaje constante de 80 mA.
El electrodo negro es el cátodo (-). Electrodo rojo es ánodo (+)
6. Las proteínas tratadas con SDS están cargadas negativamente y migrarán hacia el electrodo rojo (positivamente).
7. Una vez acabada la electroforesis (aproximadamente 120 minutos), cuando el frente de azul de bromofenol alcanza la parte inferior del gel, se

desconecta la fuente, se retiran los electrodos y los geles se retiran de la cubeta de electroforesis.

8. Los geles de acrilamida se retiran del interior del molde, separando cuidadosamente los cristales con ayuda de los separadores.

Tinción con Azul de Coomassie

Las bandas de proteínas se visualizan tiñendo los geles con solución de azul de Coomassie. La tinción se realiza con agitación suave por aproximadamente 30 minutos

Tabla 10. *Tampón de Tinción de azul de Coomassie*

Tampón de Tinción Azul de Coomassie	
Azul de Coomassie	1 g
Ácido Acético	100 mL
Metanol	400 mL
Agua	Completar hasta 1 L

Preparar en la campana de extracción porque el metanol es tóxico. Se debe de mantener en agitación hasta la dilución de la mayor parte de colorante

1. Se transfiere el gel de la placa de vidrio a un recipiente que tiene la solución de Coomassie, la cual se realiza con los ingredientes que se muestran en la tabla 10.
2. Se deja el gel en agitación suave con suficiente volumen de esta solución a temperatura ambiente por 1 hora.
3. Se elimina la solución de tinción con una pipeta y se conserva para futuras tinciones
4. Se añade la solución decolorante y se incuba para eliminar el exceso de coloración hasta que solo queden teñidas de azul las proteínas. (Cambiando la solución decolorante tantas veces como sea posible).

Tabla 11. *Solución decolorante para los geles de poliacrilamida*

Solución decolorante de geles	
Ácido Acético	100 mL
Metanol	400 mL
Agua	Completar hasta 1 L

5. El gel puede estar en solución decolorante toda la noche pero se pueden observar las proteínas en menos de 5 horas.
6. Se elimina la solución de destiño y se añade agua o ácido acético al 10%

Para identificar en la electroforesis, las bandas de proteínas que puedan presentar pesos moleculares entre 14 y 18 kDa (rango de peso de las PLA2 de venenos de serpiente) se empleó la escalera de marcador molecular Ranger Marker SC- 2361 de *Santa Cruz Biotechnology*. Este marcador fue sembrado en el gel junto con las diluciones de cada veneno entero y la PLA2 de *Crotalus durissus*.

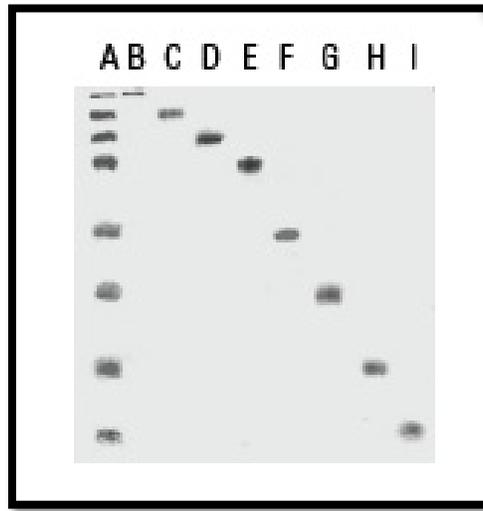


Figura 8. Análisis SDS-PAGE del Marcador de Rango Amplio sc-2361, mostrando el panel total de marcadores. **(A)** 200kDa Miosina Individual. **(B)** 97kDa Fosforilasa B. **(C)** 66kDa BSA **(D)** 44 kDa Ovoalbúmina **(E)** 29 kDa Anhidrasa Carbónica **(F)** 17 kDa Mioglobina **(G)** 14kDa Lisozima **(H)** 6 kDa Aprotinina **(I)** Marcadores (Santa Cruz Biotechnology, 2007)

En la figura 8 la banda en la posición número 5 o la banda en la posición número 6 hacen referencia a dos valores entre los que se encuentra el peso molecular de la fosfolipasa, recordando que el peso molecular de la PLA2 están entre 14 – 18 kDa, y los valores que muestra la escalera del marcador son 17 kDa y 14 kDa

7. RESULTADOS

7.1 Hemolisis Radial Indirecta

En el registro fotográfico realizado a las placas de agar sangre con siembra de cada veneno se pudo evidenciar la actividad hemolítica. También se pudo evidenciar visualmente que al aumentar la concentración de los venenos más grande es el tamaño del halo de hemólisis. En la figura 10 se puede evidenciar la actividad hemolítica producida por el veneno puro de *B. myersi*, las dos primeras Figura 9 (A y B) son de dos placas de agar sangre que tienen EDTA en su composición, mostrando una lisis de los eritrocitos en la siembra del veneno puro y en la dilución 1/10, y las otras dos Figuras 10 (C y D) muestran dos placas de agar sangre en las que tienen cloruro de calcio, mostrando que para las diluciones 1/10 y 1/50 hay un efecto mayor de lisis.

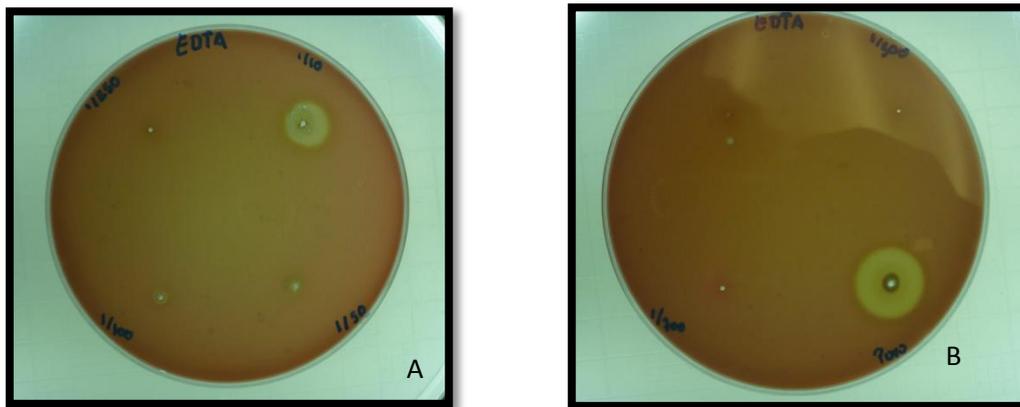


Figura 9. Placas de agar sangre con EDTA, *B. myersi* luego de 1 hora de incubación. **A** Diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/250 del veneno de *B. myersi*. **B.** diluciones 1/500, 1/700 Y veneno puro de *B. myersi*

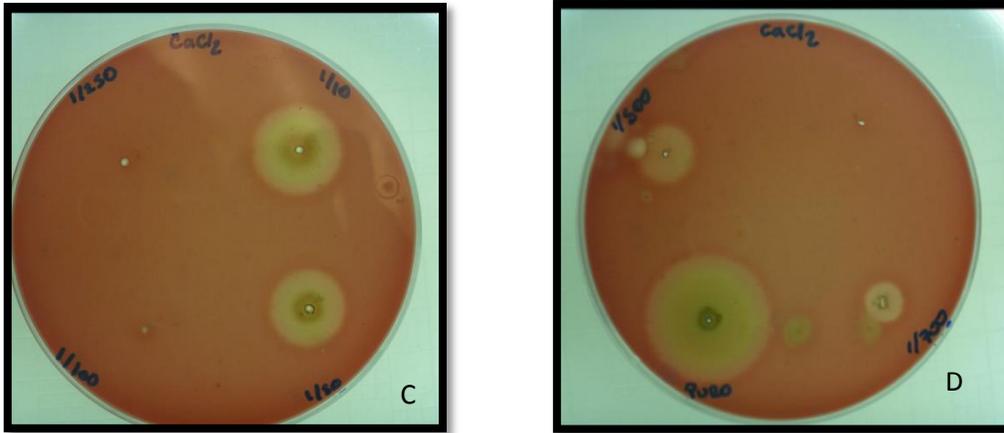


Figura 10. Placas de agar sangre con CaCl₂ *B. myersi* luego de 1 hora de incubación. **C.** Diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/250 del veneno de *B. myersi*. **D.** diluciones 1/500, 1/700 Y veneno puro de *B. myersi*

Las siguientes placas muestran la siembra de las diluciones del veneno puro de *C. durissus*, la dos primeras Figuras 11 (E y F) son de dos placas de agar sangre que tienen EDTA en su composición, mostrando una lisis de los eritrocitos en la siembra del veneno puro y en la dilución 1/10, y las dos segundas Figuras 12 (G y H) muestran dos placas de agar sangre en las que tienen cloruro de calcio, mostrando que para las diluciones 1/10 y 1/50 hay ruptura de la membrana de los eritrocitos, además del que ocasiona el veneno puro.

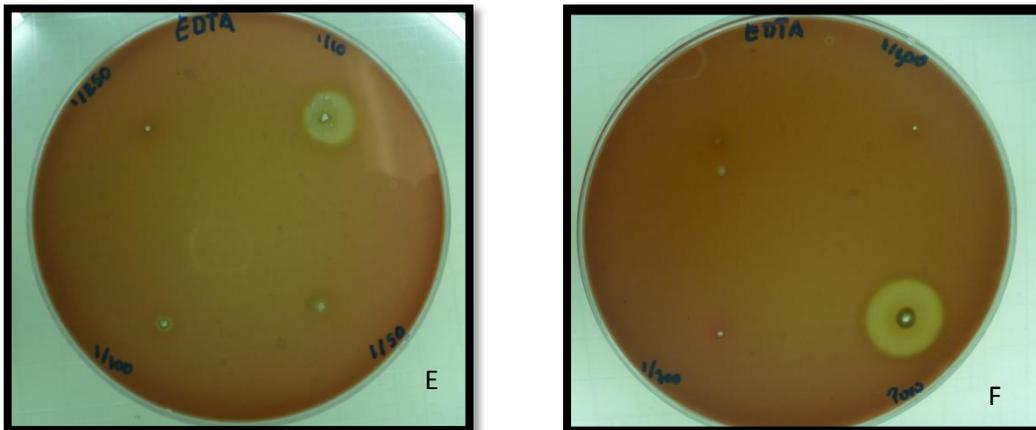


Figura 11. Placas de agar sangre con EDTA, *C. durissus* luego de 1 hora de incubación. **E.** Diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/250 del veneno de *C. durissus*. **F.** diluciones 1/500, 1/700 Y veneno puro de *C. durissus*

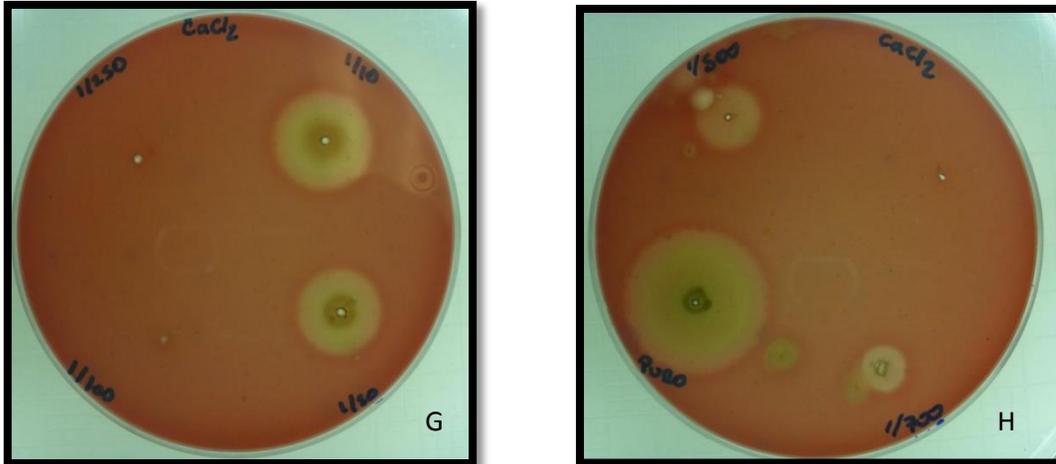


Figura 12. Placas de agar sangre con CaCl_2 , *C. durissus* luego de 1 hora de incubación. **G.** Diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/250 del veneno de *C. durissus*. **H.** diluciones 1/500, 1/700 Y veneno puro de *C. durissus*

A continuación se muestran las placas a las que se les fue sembrado las diluciones del veneno puro de *B. asper*, la dos primeras Figuras 13 (I y J) muestran una lisis de los eritrocitos en la siembra de la dilución 1/10, y las dos segundas Figuras 14 (G y H) muestran dos placas de agar sangre en las que tienen cloruro de calcio, mostrando que para las diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 hay ruptura de la membrana de los eritrocitos.

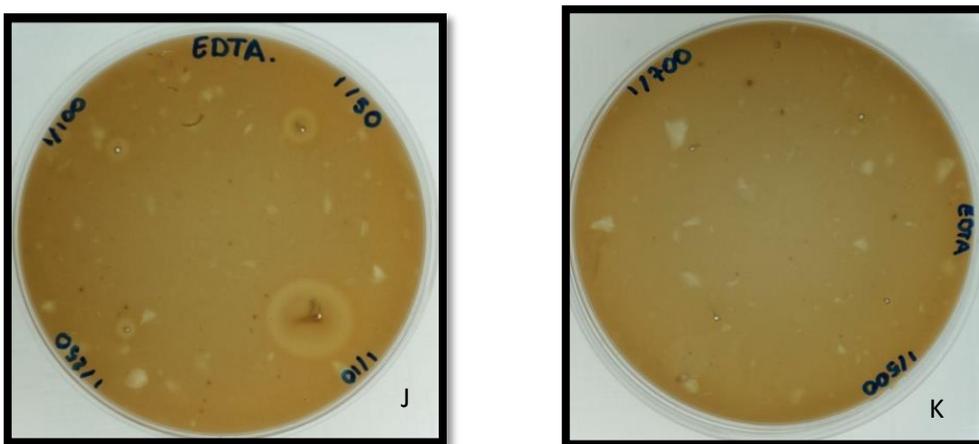


Figura 13. Placas de agar sangre con EDTA, *B. asper* luego de 1 hora de incubación. **J** Diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/250 del veneno de *B. asper*. **K.** diluciones 1/500, 1/700 Y veneno puro de *B. asper*

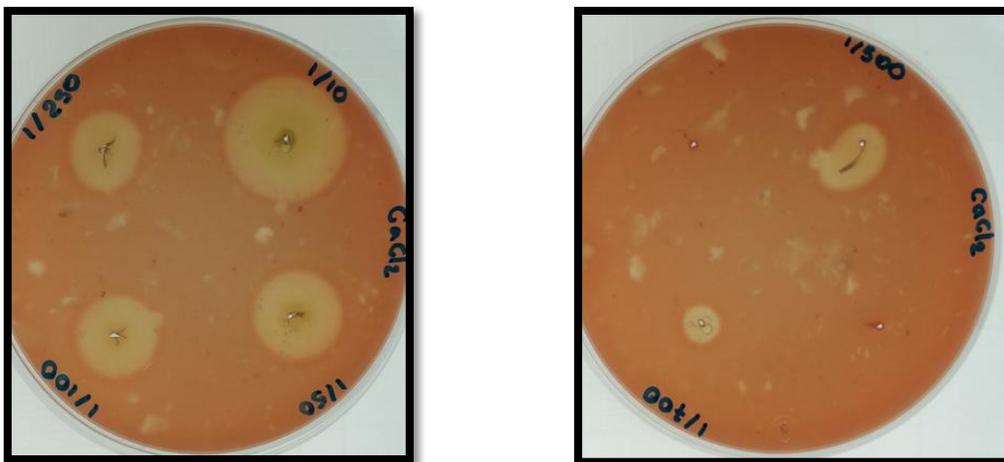


Figura 14. Placas de agar sangre con CaCl₂, *B. asper* luego de 1 hora de incubación. **L** Diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/250 del veneno de *B. asper*. **M** diluciones 1/500, 1/700 Y veneno puro de *B. asper*

Cuando las placas se revisaron por segunda vez, la coloración de las placas con EDTA era de un color café, porque el EDTA al ser un agente quelante causa aglomeraciones que modifican la coloración del medio en el que se encuentra.

7.2 Cromatografía Líquida por Exclusión de Tamaño

Se presentan cuatro cromatogramas que tienen un tiempo de corrida de 20 minutos, en la Figura 16 y la Figura 17, están los cromatogramas de *C. durissus*, *B. asper*, *B. myersi* y el patrón puro de PLA2, en su respectivo orden en la primera fase móvil utilizada (Solución de fosfato de sodio 25mM pH6.8 , Cloruro de Sodio 125mM; Acetonitrilo (90:10)); la Figura 16 muestra un cromatograma a una longitud de onda de 280nm y la Figura 17 muestra a una longitud de onda de 215nm.

Se tomó un tiempo de corrida para las muestras de 20 minutos y donde de cada una se inyectaron 5 µmL, con un flujo de 0.150mL/min. Con este flujo, los picos de las muestras se demoraron más tiempo en salir, mostrando una mejor separación de las moléculas.

La Figuras 15 muestra los cromatogramas obtenidos en el mismo orden anterior a una longitud de 280nm y la Figura 16 muestra a una lectura de longitud de onda de 215nm.

Con el cromatograma de la dilución 1/50 de *B. asper*, se observa la aparición de cinco picos, la aparición de los picos inicio al minuto 7.50 aproximadamente y finalizó en el minuto 15.50, comparando este cromatograma con el anterior se puede ver que tienen un pico en común, pues el tiempo de retención en ambos es muy parecido, ese pico es el segundo que aparece en el cromatograma de *B. asper*; además de la baja intensidad del pico que aparece en el minuto 10, también tiene una similitud con el pico que aparece en *C. durissus* a un tiempo de retención parecido y el tiempo de retención para el último pico de ambos cromatogramas es muy parecido, al igual que la absorbancia, por lo que se puede decir que *B. asper* tiene proteínas muy parecidas a *C. durissus* en su veneno.

Con el cromatograma de *B. myersi* se observa que hay 4 picos, siendo el último de mayor intensidad. Los picos en los que se relaciona más con los cromatogramas anteriores es con el que inicia en 9 minutos, en *B. myersi* este pico es de baja intensidad a diferencias que los otros dos venenos, en los que se encuentra con una alta absorbancia. Los 2 cromatogramas anteriores presentan un pico que inicia en el décimo minuto, acá hace parte del segundo pico que está en el minuto 9.383; Su tercer pico (minuto 12.451) está muy cercano del cuarto pico, por lo que muestra que no hay una buena resolución con este método.

Dejando el flujo a 0.150mL/min, el tiempo de corrida se aumentó a 25 minutos, la fase móvil se cambió por el Buffer de Fosfato de Sodio 100 mM, los canales fueron a 280 nm y 215 nm. Se dejó equilibrando el método, lo cual es dejar pasar la fase móvil sola por la columna por unos 20 minutos, lo que permite una mejor corrida de las muestras y así estabilizar la presión de la columna.

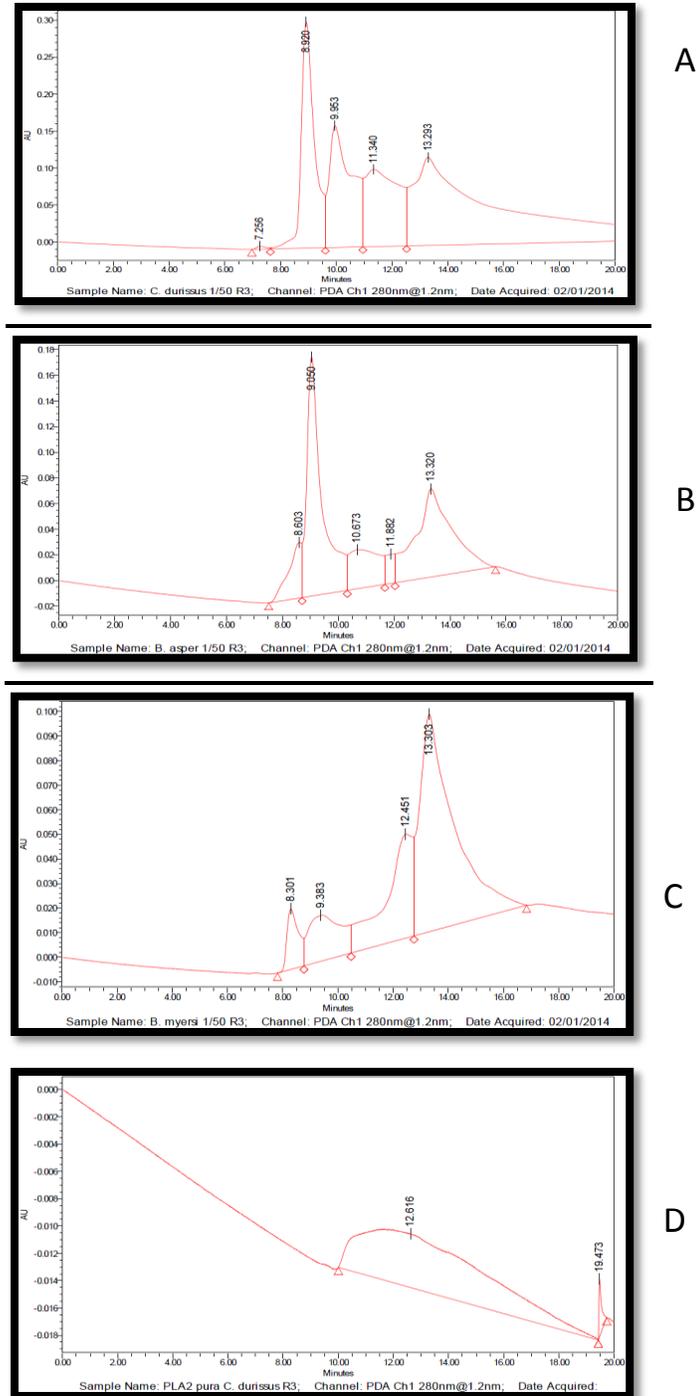
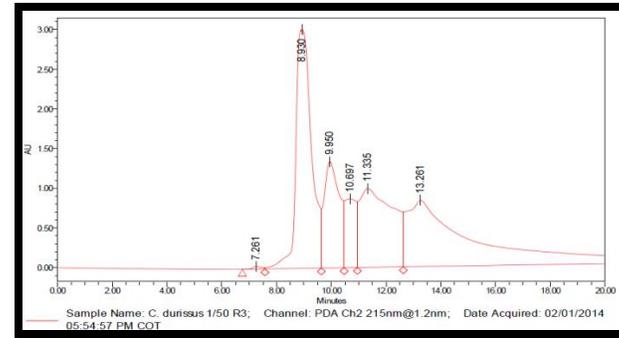
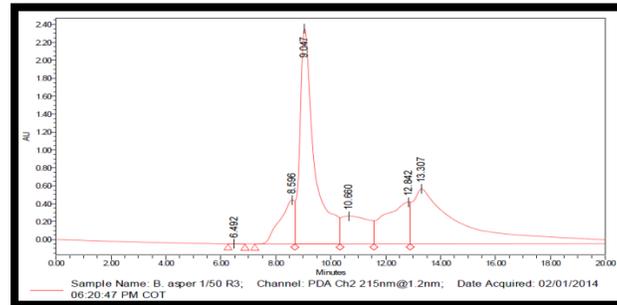


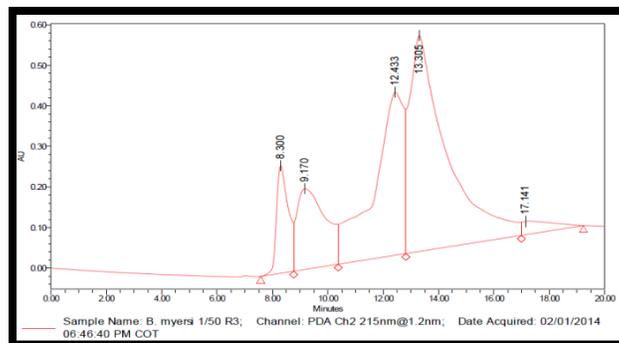
Figura 15. Cromatograma a 280 nm de las 4 muestras con fase móvil de solución Sodio Fosfato 25mM pH6. , Cloruro de Sodio 125mM; Acetonitrilo (90:10). **A.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Crotalus durissus*. **B.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrops asper*. **C.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrocophias myersi*. **D.** Cromatograma patrón puro de PLA2 de patrón de *Crotalus durissus*.



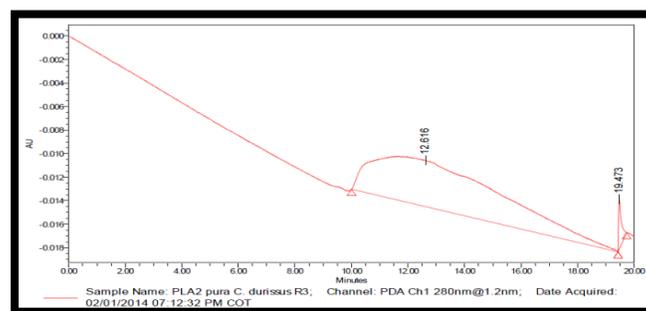
A



B



C



D

Figura 16. Cromatograma a 215 nm de las 4 muestras con fase móvil de solución Sodio Fosfato 25mM pH6. , Cloruro de Sodio 125mM; Acetonitrilo (90:10). **A.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Crotalus durissus*. **B.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrops asper*. **C.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrocophias myersi*. **D.** Cromatograma patrón puro de PLA2 de patrón de *Crotalus durissus*.

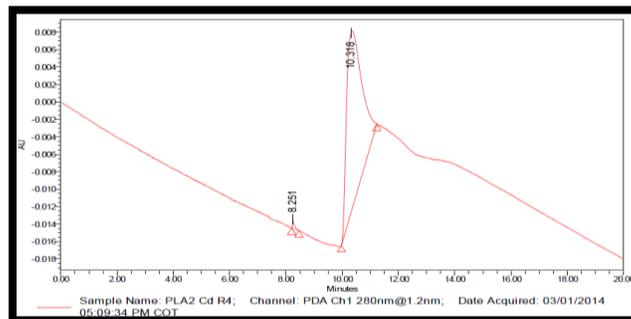
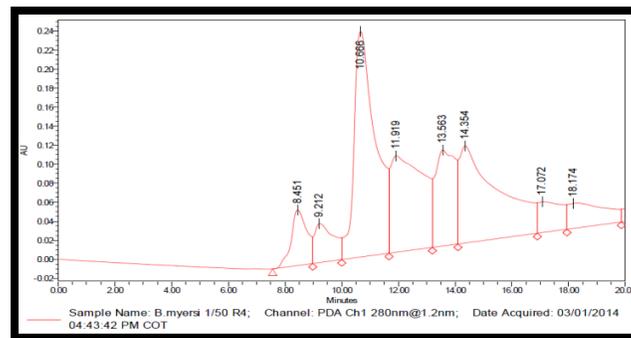
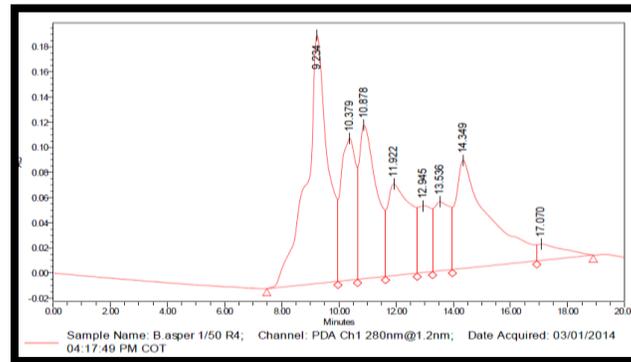
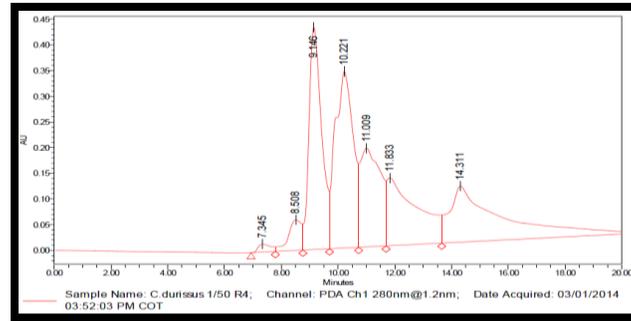
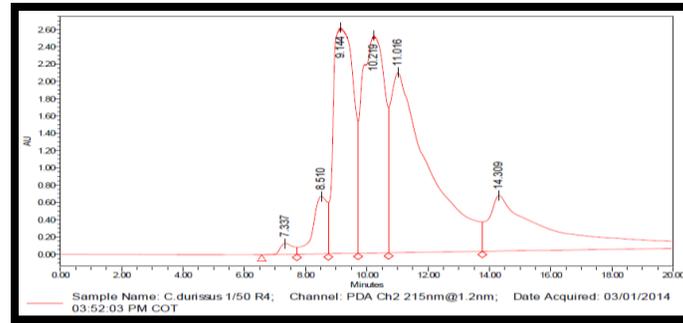
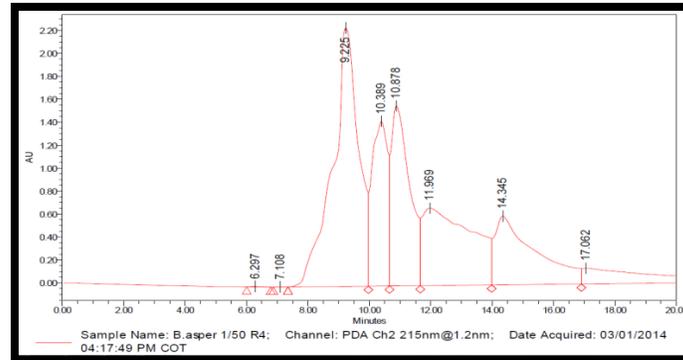


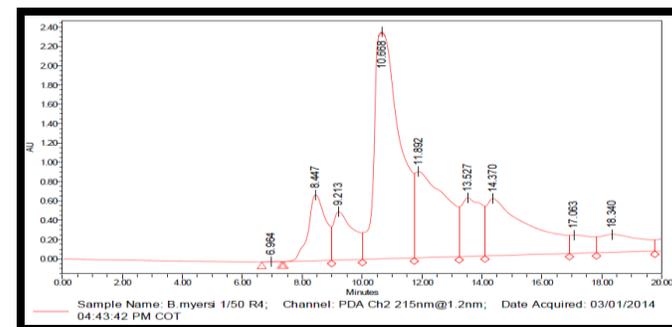
Figura 17. Cromatograma a 280 nm de las 4 muestras con fase móvil de Buffer Sodio Fosfato 100mM pH 6.8. **A.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Crotalus durissus*. **B.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrops asper*. **C.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrocophias myersi*. **D.** Cromatograma cristales puros de PLA2 de patrón de *Crotalus durissus*.



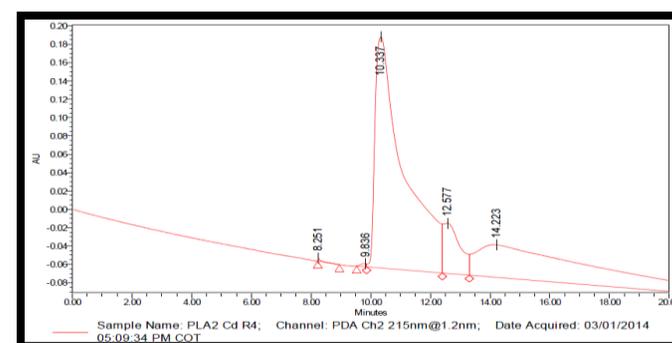
A



B



C



D

Figura 18. Cromatograma a 215 nm de las 4 muestras con fase móvil de Buffer Sodio Fosfato 100mM pH 6.8. **A.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Crotalus durissus*. **B.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrops asper*. **C.** Cromatograma de la dilución 1/50 del veneno puro de *Bothrocophias myersi*. **D.** Cromatograma cristales puros de PLA2 de patrón de *Crotalus durissus*.

7.3 Electroforesis de Poliacrilamida SDS-PAGE

El gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró una banda bien definida para la fracción pura de PLA2 de *Crotalus durissus*. Esta banda coincide con la banda del marcador de peso molecular de 14 kDa, (coincidiendo con el peso molecular esperado para algunas de las PLA2 reportadas). Tanto los venenos enteros de las especies *B myersi*, *B asper*, y *C durissus*, muestran varias bandas pero en todas se puede observar una banda de muy buen contraste y discriminación visual que coincide con la posición de corrida (peso molecular similar) de la PLA2 pura.

Esto se puede evidenciar en la Figura 19, en la cual se muestra la siembra concentrada de veneno de cada una de las tres especies y diluciones (1/100) de los mismos venenos para generar mejor discriminación visual de la electroforesis

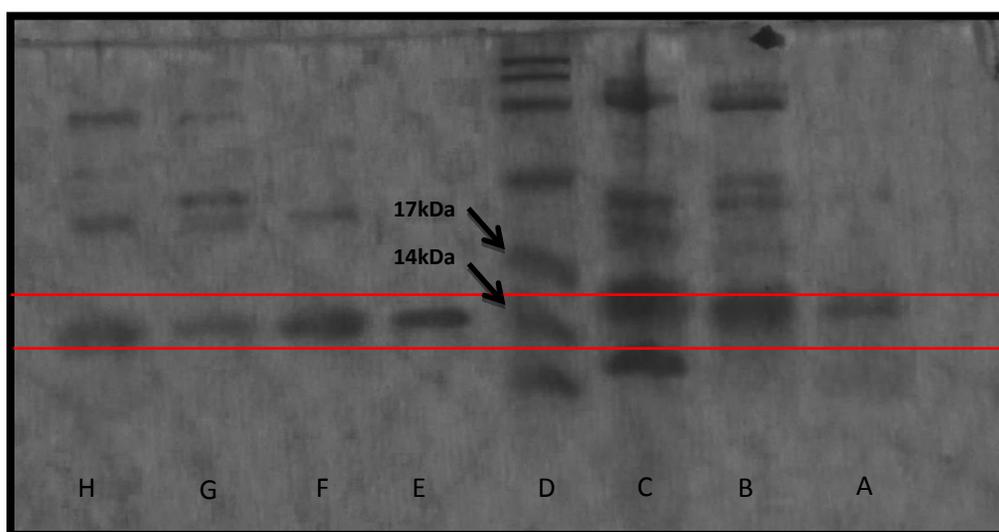


Figura 19. Gel de electroforesis teñido con azul de comassie diluciones de *C. durissus*, *B. asper* y *B. myersi*, PLA2 patrón puro de *C. durissus* con marcador molecular. **A.** *B. myersi* veneno puro. **B.** *B. asper* veneno puro. **C.** *C. durissus* veneno puro. **D.** Broad Ranger Markers SC- 2361. **E.** PLA2 Patrón *C. durissus*. **F.** *B. myersi* Dilución 1/100. **G.** *B. asper* Dilución 1/100. **H.** *C. durissus* Dilución 1/100.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 Hemolisis Radial Indirecta

Comparando las diluciones del veneno de *B. myersi*, en las placas que tienen el agente quelante, se ven dos halos de lisis, el primero es con la menor dilución utilizada, 1/10 y con el veneno puro (Figura 9), el resto de las diluciones no presentó hemolisis, en ninguna de las 2 horas en las que se dejaron incubando las placas. Esto pudo deberse a que la dosis inoculada en el gel no fue suficiente para producir efecto alguno; porque la quelación con EDTA, el calcio disponible no era suficiente para generar el efecto lítico o por el efecto combinado de ambas variables.

Una debilidad de este trabajo fue el no haber podido cuantificar la cantidad de proteínas totales de cada veneno y cuantificar la concentración de iones calcio presentes en el veneno de la serpiente. Esto habría podido permitir medir la actividad tipo PLA2 enzimáticamente activa (en cada veneno) mediante la titulación con calcio. Esto daría idea aproximada de la potencia PLA2 producida por el veneno.

Con las placas que tenían en su composición cloruro de calcio se pueden decir dos cosas: 1) que los halos de hemolisis fueron de mayor tamaño cuanto mayor fue la concentración (menor dilución) de veneno depositado en los posos del gel (1/10, 1/50 (Figura 10 C) y el veneno puro (Figura 10 D)). 2) que al comparar estos halos con sus diluciones para los geles con EDTA se puede observar que la presencia de calcio es un factor que potencia el tamaño de los halos como es coherente con la actividad tipo PLA2 enzimáticamente activa.

Los resultados de halo de hemólisis fueron coherentes tanto para el veneno de la especie objeto de estudio (*B. myersi*) como para los venenos de las otras dos especies (*C. durissus* y *B. asper*) que fueron usadas como control positivo.

8.2 Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC)

Dilucidar el tiempo de retención para la PLA2 de *C. durissus* fue fundamental para detectar picos con tiempos de retención similares en las especies objeto de estudio. Esto da otra idea confirmatoria de la presencia de PLA2 homóloga al patrón. Como se puede observar, en los últimos cromatogramas (más definidos) se pudo observar que cada uno de los venenos enteros (*C. durissus*, *B. asper*, *B. myersi*) presentan picos con tiempos de retención similares a la fracción PLA2

purificada lo que sugeriría que esta enzima puede estar contribuyendo a la detección de dichos picos.

La evidencia mostrada aquí es importante porque de haberse encontrado una ausencia de pico a este tiempo concordante con el pico del patrón, la presencia de PLA2 (al menos homóloga a la presente en *C. durissus*) debía replantearse. Bajo las condiciones señaladas y empleando la columna SEC, estas PLA2 presentan tiempos de retención cercanos a los 10 minutos.

Este sería uno de los primeros trabajos hechos con este tipo de sistema y de columna dado que esta columna no lleva más de un año en el mercado mundial.

8.3 Electroforesis

La prueba de identificación de bandas mediante electroforesis fue contundente. Al igual que la cromatografía líquida, las técnicas de electroforesis separan las proteínas y dan una idea de la cantidad de componentes proteicos presentes en el veneno. El patrón puro de PLA2 de *C. durissus* se presenta en el gel como una banda diáfana (sin degradación). Esta banda coincide con bandas en posiciones similares de la corrida que corresponden para los venenos de *C. durissus*, *B. asper*, y la especie objeto de estudio *B. myersi*. Todas al mismo nivel relativo de corrida que coincide con el marcador de peso molecular de 14 kDa.

Estos resultados específicamente coinciden con los reportados Peichoto y Rodríguez *et al.*, (2006) para la identificación de PLA2 en el veneno de *C. durissus terrificus* y por los resultados obtenidos por Ramírez & Quevedo *et al.*, 2004 para el veneno de *B. asper*.

Aunque hay que persistir en la separación de esta enzima en el veneno de la serpiente *B. myersi*, este trabajo evidencia la actividad y la presencia de la enzima (al menos de una). Sin embargo se hace necesario mejorar la estrategia de aislamiento e identificación de isoformas de PLA2, y en el aislamiento de dicha enzima para profundizar en su actividad cinética.

9. CONCLUSIONES

- El veneno entero de *Bothrocophias myersi* produce halo de hemólisis (en agar sangre) tanto en presencia como en ausencia de Calcio. Teniendo en cuenta que esta prueba ha sido estandarizada por otros autores para verificar la actividad de PLA2, se sugiere que hay por lo menos una PLA2 presente en el veneno de la especie estudiada.
- Se pudo observar sistemáticamente que al caracterizar el veneno entero de *B. myersi*, este presenta un pico de absorbancia cuyo TR coincide con el TR de retención de la PLA2 pura de *C. durissus*. Coincidiendo también con picos de las otras dos especies de vipéridos usadas como control.
- También se pudo observar mediante electroforesis para proteínas, que hay coincidencias en la posición de la banda detectada para PLA2 pura de *C. durissus* y algunas de las bandas detectadas para las otras dos especies control y la de *Bothrocophias myersi*. Además estas coinciden con el marcador de peso molecular de 14kDa
- Por lo anterior se sugiere que al menos una PLA2 se encuentra presente en el veneno de *B. myersi*.

10. RECOMENDACIONES

- Utilizar un método de gradiente de elución para la fase móvil en la cromatografía de exclusión por tamaño para dar un mejor fraccionamiento de las proteínas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Álvarez-León, R. (1998). Notas sobre la ocurrencia de *Pelamis platurus* (Reptilia: Serpentes: Hydrophiidae) en el pacífico colombiano. *Caldasia Vol. 20, No. 2*, 93-94.
- 2. Angulo Ugalde, Y. (2005). *Fosfolipasa A2 miotóxicas de venenos de serpientes de la familia Viperidae: Caracterización estructural y funcional*. San José - Costa Rica: Universidad de Costa Rica - Instituto Clodomiro de Picado.
- Arni, R., & Ward, R. (1996). Phospholipase A2: a structural review. *Toxicon 34*, 827-41.
- Babaie, M., & Slamanizadeh, H. (2013). Blood Coagulation Induced by Iranian Saw-Scaled Viper (*Echis Carinatus*) Venom: Identification, Purification and Characterization of a Prothrombin Activator. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 1145-1150.
- Bergillos Gasión, F., & Rivas Fernández, M. d. (2013). Veneno - Enzimas Hidrolíticas. En F. Bergillos Gasión, & M. d. Rivas Fernández, *Toxinología clínica - Lesiones por picaduras y moerdeduras de. Volumen 1* (pág. 516). Medical.
- Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2009). Protein Purification and Characterization Techniques - Electrophoresis. En M. K. Campbell, & S. O. Farrell, *Biochemistry. 7th Edition* (pág. 126). Belmont - Canada: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Castro Herrera, F. (03 de 05 de 2013). *Chocoan Toadheaded Pitviper (Bothrocophias myersi)*. Recuperado el 09 de 02 de 2014, de Naturalista Conabio: <http://conabio.inaturalist.org/photos/362179>
- Cedimed cía Ltda. (08 de 11 de 2012). *Suero Antiofídico Polivalente*. Recuperado el 08 de 02 de 2014, de Universidad de Costa Rica: <http://sueroantiofidicopolivalente.blogspot.com/2012/11/blog-post.html>
- Dennis, E., & Cao, J. (2011). Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev. 111*, 6130-85.

- Domont, G., & Perales, J. (2003). Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* 42(8) Review. PubMed PMID: 15019494., 963-77.
- Falconi, M., Desideri, A., & Rufini, S. (2000). Membrane-perturbing activity of Viperidae myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem. *Journal of Molecular Recognition* (1) PubMed PMID: 10679892., 14-9.
- Fernandez Culma, M. (2013). *Aislamiento de una PLA2 homóloga del veneno de la serpiente Bothrops asper: Caracterización bioquímica y biológica*. Medellín - Colombia: Universidad de Antioquia - Facultad de Química Farmacéutica.
- Fry, B., & Wüster, W. (2004). Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Molecular Biology and Evolution* (5) PubMed PMID: 15014162., 870-83.
- Gutiérrez, J. (2002). Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. *Revista de Biología Tropical*, 915-31.
- Instituto Bioclon, & Laboratorio Silanes, .. (2011). *Bothrocophias myersi*. Recuperado el 09 de 02 de 2014, de RedTox: <http://www.redtox.org/rt3/servlet/CtrlVerArt?clvart=2597>
- Kini, R. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827-40.
- Kumar, V. V., & Brahmabhatt, K. (2013). Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(2), 156-162.
- Lomonte, B., & Angulo, Y. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon. Review. PubMed PMID: 15019489.*, 885-91.
- Mackessy, S. P. (2002). Biochemistry and Pharmacology. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 21 (1-2), 45.
- Marcussi, S., & Sant'Ana, C. (2007). Snake Venom Phospholipase A2 Inhibitors: Medicinal Chemistry and . *Corrunt Topics in Medicinal Chemistry. Volum 7. Num. 0*, 1-14.

- Maruñak, S., & Ruiz de Torrent, R. (2005). *Mionecrosis inducida por fosfolipasa A2 aislada del veneno de Bothrops jararacussu de Argentina*. Corrientes - Argentina: Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
- Meaume, J. (1966). Les venins des serpents: agents modificateurs de la coagulation sanguine. *Toxicon*, 26.
- Neves-Ferreira, A., & Cardinale, N. (2000). Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from Didelphis marsupialis serum. *Biochim Biophys Acta - 1474(3)*, 310.
- Nicastro, G., & Franzoni, L. (2003). Solution structure of crotamine, a Na⁺ channel affecting toxin from Crotalus durissus terrificus venom. *European Journal of Biochemistry*, 1969-1971.
- Ohno, M., & Chijiwa, T. (2003). Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. *Toxicon*. 42(8) Review. PubMed PMID: 15019486., 841-54.
- O'Shea, M. (2008). Evolution of venomous snakes. En M. O'Shea, *Venomous Snakes of the world* (pág. 16). London: New Holland Publishers.
- Ownby, C., & Selistre de Araujo, H. (1999). Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon*. 37, 411-45.
- Patiño, B. S. (2002). Serpientes venenosas. *Grupo de Estudio de Animales Silvestres (Boletín GEAS) - Volumen III, Núm 5*, 37.
- Peek, M., & Williams, L. (01 de 05 de 2001). *SDS Page Gel Electrophoresis*. Recuperado el 23 de 11 de 2013, de School of Chemistry and Biochemistry - Georgia Institute of Technology: http://ww2.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html
- Peichoto, M., Rodríguez, J., & Rey, L. (2006). Reactividad cruzada entre veneno de Philodryas paagioniensis (Colubridae) y suero anticrotálico. *Universidad Nacional del Nordeste - Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen E-002*, 1-4.
- Plata, T. M. (28 de 02 de 2014). *Accidente Ofídico*. Recuperado el 03 de 03 de 2014, de Manual de Urgencias en Medicina Interna. Asociación Colombiana de Medicina Interna. Ediciones Acta Médica Colombiana.: <http://www.aibarra.org/Guias/9-4.htm>

- Ramar Perumal, S., & Ponnampalam, G. (2012). Therapeutic application of natural inhibitors . *Biomedical Informatics*, 48-57.
- Ramírez, J., Quevedo, E., & López, E. (2004). Purification and partial characterization of phospholipases A2 from *Bothrops asper* (Barba amarilla) snake venom from Chiriguaná (César, Colombia). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. Volum 10 N°3, 242-259.
- Rehman, A. S. (1991). *Studies on the venom of viperidae snakes (Leaf Nosed Viper and Horned Viper)*. Karachi, Pakistán: H.E.J. Research Institute of Chemistry - University of Karachi.
- Renjifo, J. M., & Lundberg, M. (2003). Una especie nueva de serpiente coral (Elapidae, micrurus), de la región de Urrá, municipio de tierra alta, Córdoba, Noroccidente de Colombia. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*. VOLUMEN XXVII, NÚMERO 102, 142, 144.
- Santa Cruz Biotechnology. (2007). *Broad Ranger Marker SC-2361*. Recuperado el 17 de 11 de 2013, de Santa Cruz Biotechnology: <http://www.scbt.com/es/datasheet-2361-broad-range-markers.html>
- Scott, D., & Sigler, P. (1994). *Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2 - Advances in Protein Chemistry 45*. PubMed PMID: 8154374, 53-88.
- Scott, D., & White, S. (1990). *Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2 - Science 250*, 1541-46.
- Serpentario de Colombia. (2010). *Bothrocophias myersi (Cabeza de Sapo Chocoana)*. Recuperado el 09 de 02 de 2014, de Serpentario Nacional: <http://www.serpientesdecolombia.com/project/bothrocophias-myersi-cabeza-de-sapo-chocoana/>
- Soares, A., & Giglio, J. (2003). Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon*, 856.
- Spring, L. (. (2006). *Biology Animation Library - Gel Electrophoresis*. Recuperado el 20 de 11 de 2013, de DNA Learning Center: <http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>
- Teixeira, C., & Cury, Y. (2009). Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon 54*, 988-97.

- Timms, J. (2010). *Bothrocophias myersi* (Gutberlet and Campbell, 2001). Recuperado el 09 de 02 de 2014, de Bothrops The Ultimate Pitviper: <http://www.bothrops-theultimatepitviper.com/especies/especie-Bothrocophias-myersi.html>
- Torii, S., & Yamane, K. (2000). Molecular cloning and functional analysis of apotoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry*, 3198.
- Yarlequé Chocas, A. (2000). Acción del veneno. En A. Yarlequé Chocas, *Las Serpientes Peruanas y Sus Venenos* (pág. 41). Lima - Perú: Fondo Editorial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Zugasti, A., Cepeda, A., & Morlett, J. (2009). Características bioquímicas y toxicológicas del veneno. *Acta Química Mexicana - Revista de Divulgación Científica*.
- A. P. (s.f.). *Charles Lucien Jules Laurent Bonaparte letters, 1825-1857*. Recuperado el 11 de 12 de 2013, de American Philosophical Society 1743 Nullo Discrimine: <http://www.amphilsoc.org/mole/view?docId=ead/Mss.B.B642.1.7-ead.xml>
- Acosta de Pérez, O. -M.-L.-T. (s.f.). *Aislamiento y caracterización parcial de PLA2*. Corrientes: Grupo de Investigación de la Cátedra Patología Médica - Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE.
- Aimals exóticos, A. (s.f.). *El veneno de las serpientes*. Recuperado el 20 de Mayo de 2013, de Mundo Animal: <http://www.mundo-animal.com/animales-exoticos/reptiles/el-veneno-de-las-serpientes/>
- Amarita, F. (03 de Abril de 2005). *Cromatografía de Intercambio Iónico (Técnicas)*. Recuperado el 29 de Mayo de 2013, de Galeon - Lactobacilo ssp: <http://www.galeon.com/lactobacilo/tecnicas.htm#Cromatografia> de intercambio ionico
- Ana María Maldonado Alconada, J. V. (s.f.). *Electroforesis desnaturalizante en geles de*. Córdoba: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, .
- Angulo, Y., Olamendi-Portugal, T., Alape-Girón, A., Possani, L. D., & Lomonte, B. (2002). Structural Characterization and phylogenetic relationships of myotoxin II from Atropoides (Bothrops) nummifer snake venom, a Lys49 phospholipase A2 homologue. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1268-1270.

- Animal, F. (s.f.). *Veneno de Serpiente*. Recuperado el 3 de Mayo de 2013, de Serpentipedia: Enciclopedia Especializada: <http://www.serpientepedia.com/veneno-serpiente/>
- Barrera Cartujano, B., Rivera Guadarrma, L., Mendoza Jiménez, M., & Mondragón, G. (2008). “*Caracterización bioquímica de la PLA2 del veneno de B. ammodytoides*”. México.
- Berg, O., Gelb, M., Tsai, M., & Jain, M. (2011). Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chem. Rev.* 101 (9): 2613–54, 2640.
- Budnik, L. T., & Mukhopadhyay, A. K. (2002). Lysophosphatidic Acid and Its Role in Reproduction. *Biology Of Reproduction* 66, 859-865 - Institute for Hormone and Fertility Research, University of Hamburg, D-22529 Hamburg, Germany, 860.
- Burke, J. E., & Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling. *Journal Of Lipid Research*, 237-238.
- CAMPBELL JA., L. W. (1989). *The venomous reptiles of Latin America*. University Press: New York.
- CAMPBELL, G. &. (2001). *Bothrocophias myersi*. Recuperado el 7 de Mayo de 2013, de The Reptile Database: <http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrocophias&species=myersi>
- CAMPBELL, G. &. (2010). *Bothrocophias myersi* . Recuperado el 7 de Mayo de 2013, de The Reptile Database: <http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrocophias&species=myersi>
- Chippaux, J. P. (2009). *Venom*. Recuperado el 11 de 12 de 2013, de Snakes-Uncovered: <http://www.snakes-uncovered.com/Venom.html>
- Cilla García, D. A. (2013). *Estudios de Fotólisis e hidrólisis de metrafenona*. La Rioja: Universidad de la Rioja.
- CITES, C. S. (Abril de 2012). *CITES - Data Base*. Recuperado el 5 de Mayo de 2013, de CITES: <http://www.unep-wcmc-apps.org/isdb/CITES/Taxonomy/tax-gs-search2.cfm/isdb/CITES/Taxonomy/tax-gs-search2.cfm?displaylanguage=esp&GenName=&SpName=Bothrocophias+myersi>
- Clavijo Diaz, A. (2002). Soluciones amortiguadoras de pH . En A. Clavijo Diaz, *Fundamentos de química analítica: Equilibrio iónico y Análisis químico* (págs. 260-261). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

- Dr. Christian ESPINOZA, C. (2010). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *The Lancet*, Volume 375, Issue 9725., 1536-1544.
- Dr. Espinoza, C. -C. (2010). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *The Lancet*, Volume 375, Issue 9725., 1536-1544.
- Exploradores por Naturaleza, Z. d. (Dirección). (2011). *Serpiente X roja en el Zoológico de Cali* [Película].
- García, G. A., & García, A. (10 de Agosto de 2009). *PLA2: Grandres familias y mecanismos de acción*. Recuperado el 3 de Mayo de 2013, de Repertorio de Medicina y Cirugía. Volumen 18 N 4: <http://repertorio.fucsalud.net/repertorio/pdf/vol18-04-2009/1-FOSFOLIPASAS.pdf>
- Gómez, D. (2011). Evaluación de la dosis letal media (DL50) del veneno de *Bothrocophias* (Squamata: Serpientes). En F. Z. Cali, *Saberes para la Conservación* (pág. 18). Santiago de Cali: Conservación de Especies y Ecosistemas. Zoológico de Cali.
- González Benito, J. (s.f.). *Caracterización de Materiales y Defectos - Técnicas de separación cromatográfica*. Madrid: Universidad Carlos III de Madrid.
- Grégory Alfonso García Morán, M., & Gaitán, Á. A. (2008). Aspectos biomédicos de las fosfolipasas A2. *Revista MedUnab (Médica de la Universidad Autónoma de Bucaramanga)*, 1; 21.
- Gutierrez, J. (1995). Clinical toxicology of snakebite in Central America . En W. J. Meier J, *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (págs. 645-648). Boca Ratón: Meier J, White J, Editors.
- Halfman, C. J. (1997). Chemical Mediators of Acute Inflammation. En C. J. Halfman, *Laboratory Medicine and PathoPhysiology* (pág. Capítulo 2).
- Harvey, A. L. (2006). Chapter 52: Snake Venom Peptides. En A. J. Kastin, *Handbook of Biologically Active Peptides* (págs. 355-357). San Diego, California: Elsevier.
- III, B. (2009). *Trabajo práctico N° IV - Extracción de RNA y DNA bacteriano*. Recuperado el 20 de Mayo de 2013, de Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata: <http://www.biol.unlp.edu.ar/bioquimica3/TP4-09.pdf>

- Izrailev, S., Zhou, F., & Schulten, K. (31 de Julio de 2006). *Phospholipase A2*. Recuperado el 22 de Mayo de 2013, de Theoretical and Computational Biophysics Group: http://www.ks.uiuc.edu/Research/smd_imd/pla2/
- Jiménez, K., Zavaleta, A., Izaguirre, V., & Yarleque, A. (2005). Biología celular y molecular de las fosfolipasas A2. *Ciencia e Investigación VIII - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM*, 17-29.
- Kini, M. (s.f.). *SNAKE VENOM PHOSPHOLIPASE A2 ENZYMES: STRUCTURE, FUNCTION AND MECHANISM*. Singapore: National University Of Singapore - Dept. Of Biological Sciences.
- LODISH, B. M. (2005). En B. M. LODISH, *Molecular Cell Biology, 5° Edición (Español)*. Buenos Aires: Panamericana.
- Maldonado Alconada, A. M., & Jorrín Novo, J. V. (2006). *Electroforesis desnaturalizante en geles de poli(acrilamida). Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana*. Córdoba: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071.
- Martins, M. (2010). *Bothrocophias myersi*. Recuperado el 7 de Mayo de 2013, de The IUNC Red List of Threatened Species: <http://www.iucnredlist.org/details/summary/178511/0>
- Quevedo, B., Ramirez-Ávila, J., & López, E. (2010). Purification of phospholipase A2 from Bothrops atrox venom. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23-27.
- Ramírez-Avila, J., Quevedo B, E., López, E., & Renjifo J, M. (2004). Purification and partial characterization of phospholipases A2 from Bothrops asper (barba amarilla) snake venom from Chiriguana (Cesar, Colombia). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 242-245.
- Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., & Chow, V. T. (14 de 12 de 2011). *Therapeutic Application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A2*. Recuperado el 12 de 12 de 2013, de Bioinformation - Discovery at the interface of physical and biological sciences: <http://www.bioinformation.net/008/97320630008048.pdf>
- *Separación de proteínas por cromatografía de exclusión molecular - PRÁCTICA 6*. (s.f.). Recuperado el 20 de Mayo de 2013, de Bioquibi: <http://bioquibi.webs.ull.es/practicas/6.pdf>
- Serpientes de Colombia. (2010). *Viperidae*. Recuperado el 28 de 12 de 2013, de Serpentario Nacional - Serpientes de Colombia: <http://www.serpientesdecolombia.com/serpientes/viperidae/>

- Shen, Y., Lee, Y.-S., & Soelaiman, S. (2002). Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylyl cyclase exotoxins. *The Embo Journal*, 6722.
- Sorokin, A. (6 de Septiembre de 2011). *Glomerulonephritis and Cellular Regulation of Prostaglandin Synthesis*. Recuperado el 22 de Mayo de 2013, de InTechOpen - Medical College of Wisconsin: <http://www.intechopen.com/books/an-update-on-glomerulopathies-etiology-andpathogenesis/>
- Stabeli, R. G., Simões-Silva, R., Kayano, A. M., Gimenez, G. S., & Moura, A. A. (2012). Purification Of Phospholipases A2 From American Snakes Venoms. En C. 1, *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. Porto Velho - Brazil: Leonardo de Azevedo Calderón.
- Uetz, P. &. (2008). *Reptile DataBase. Reptarium*. Recuperado el 28 de 12 de 2013, de Reptile DatabBase: <http://reptile-database.reptarium.cz/>
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2006). Soluciones amortiguadoras (buffers). En D. Voet, J. Voet G, & C. W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry* (págs. 35-37). Madrid: Editorial Medica Panamericana.
- Waters Corporation. (06 de 2008). *Tarjeta de inicio rápido del sistema acquity uplc*. Recuperado el 1 de 12 de 2013, de Waters.com: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720002688es.pdf>
- Waters Corporation. (10 de 2012). *ACQUITY UPLC BEH SEC COLUMNS AND STANDARDS*. Recuperado el 17 de 12 de 2013, de Waters.com: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720003385en.pdf>
- Yolanda C. Valdés Rodríguez, 1. M. (2002). Origen e importancia de la PLA2. *Revista Cubana de Farmacia*, 122.