

BARNETOBINA: UN NUEVO PRINCIPIO COAGULANTE PURIFICADO DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops barnetti*

Dan Vivas Ruiz^{a*}, Rosalina Inga Arellano^a, Julio Mendoza Fernández^a,
Fanny Lazo Manrique^a y Amando Yarlequé Chocas^a

RESUMEN

Se ha aislado una enzima similar a trombina, barnetobina, del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*, mediante dos pasos cromatográficos sobre CM Sephadex C-50 y Sephadex G-100, en ambos casos utilizando acetato de amonio 0,05 M a pH 5,0. La enzima fue purificada 45 veces con un rendimiento de 14% y por PAGE-SDS se obtuvo una sola banda proteica de 52 kDa en condiciones reductoras con 2β-mercaptoetanol y de 48 kDa en condiciones no reductoras, determinándose que la enzima consta de una sola cadena polipeptídica con al menos un enlace disulfuro. El tratamiento con N- glicosidasa (PNGasa F) determinó que es una glicoproteína, con un 45% de contenido total de carbohidratos. La enzima mostró tener actividad coagulante sobre plasma citratado y fibrinógeno. También mostró actividad amidásica sobre BApNA y Chromozym TH. La potencia coagulante sobre fibrinógeno bovino fue equivalente a 131 unidades NIH de trombina/mg. La enzima es inhibida por PMSF y por el inhibidor de tripsina de soya calificándola como una serinoproteasa; el pH óptimo para la actividad amidolítica fue de 8,0 y es estable hasta los 40 °C. Se demostró mediante inmunoelectroforesis e inmunodifusión la antigenicidad de la enzima frente al suero antibotrópico polivalente, así como su neutralización probada sobre plasma citratado (Dosis eficaz: 250 µl de antiveneno/ mg de enzima).

Palabras clave: Veneno, serpiente, enzima similar a trombina, *Bothrops barnetti*, coagulante.

BARNETOBIN: A NEW COAGULANT PRINCIPLE PURIFIED FROM *Bothrops barnetti* PERUVIAN SNAKE VENOM

ABSTRACT

A thrombin- like enzyme, barnetobin, was purified from *Bothrops barnetti*, peruvian snake venom using CM Sephadex C-50 followed by Sephadex G-100, in both two cases with 0,05 M ammonium acetate buffer pH 5,0. The enzyme was purified 45 fold with 14% of yield and the PAGE-SDS showed only protein band of 52 kDa under reducing condition with 2β-mercaptoetanol and 48 kDa under non reducing condition indicating that the enzyme has a single polypeptide chain with disulfide bond. The PNGase treatment showed that it is a basic glycoprotein containing 45% total carbohydrates. The enzyme has coagulant activity on fibrinogen and citrated plasma and amidolytic activity on BApNA and Chromozym TH. The coagulant potency was equivalent to 131 NIH thrombin Units/ mg. In addition the enzyme is inhibited by PMSF and soybean trypsin inhibitor suggesting that is a serine proteinase. The enzyme had optimal amidolytic activity pH was 8,0 and is stable until 40 °C. The antigenicity

^{a*} Laboratorio de Biología Molecular – Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
devivasr@hotmail.com

and neutralization of enzyme was demonstrated by immunodiffusion and immunoelectrophoresis with the polyvalent antithrombotic serum on citrated plasma (Effective Doses: 250 μ l of antivenom/mg of enzyme).

Key words: Venom, snake, enzyme, thrombin like, *Bothrops barnetti*, coagulant.

INTRODUCCIÓN

La alteración del sistema hemostático es una de las principales sintomatologías causadas en el envenenamiento por mordeduras de serpientes Viperidas¹. La actividad proteolítica de muchas enzimas del veneno de estos animales (serinoproteasas y metaloproteasas) está direccionada a los componentes de la coagulación sanguínea. Un grupo particular de estas enzimas son las que poseen acción tipo trombina (similares a trombina o EST) que actúan sobre el fibrinógeno induciendo la formación de una malla anómala de fibrina que es fácilmente degradada por la acción proteolítica de la plasmina, conduciendo a un decremento de la viscosidad sanguínea y de la concentración del fibrinógeno circulante².

La investigación sobre las enzimas similares a trombina es amplia y a la fecha se conocen más de 40 ESTs distribuidas en varios géneros de serpientes. La mayoría de ellas son glicoproteínas de una sola cadena que tienen la capacidad de liberar los fibrinopéptidos A o B de las cadenas A _{α} y B _{β} del fibrinógeno respectivamente^{3, 4}. Además, estas enzimas poseen actividad similar a la tripsina, actividad amidolítica y actividad esterásica, pero no tienen efecto sobre ninguno de los componentes de la cascada de la coagulación⁴.

Bothrops barnetti, conocida comúnmente como **sancarranca**, es una serpiente venenosa de la zona norte del Perú, localizada en los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Cajamarca Piura y Tumbes, siendo la principal causante de los accidentes ofídicos para estos departamentos⁵.

En el presente trabajo, describimos el hallazgo y posterior purificación de una enzima similar a trombina a la que hemos denominado barnetobina, procedente del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* y detallamos algunas de sus propiedades bioquímicas más relevantes.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Veneno de *Bothrops barnetti*, fue obtenido de especímenes criados en el serpentario del Instituto Nacional de Salud, INS (Lima-Perú). El veneno fue liofilizado y mantenido a -20°C hasta su uso. El suero equino antitrombótico polivalente fue obtenido del Centro Nacional de Productos Biológicos-INS

Agarosa, fibrinógeno bovino, N-glicosidasa F, benzoil arginil p-nitroanilida (BAPNA), estándares de peso molecular e inhibidores de proteasas fueron adquiridos de Sigma Chemical Company (USA). El tosil-gly-pro-arg-4-nitranilina acetato (Chromozym TH) fue adquirido de Roche Diagnostic (Germany).

Purificación

Veneno total liofilizado (80 mg) fue diluido en 2 ml de buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0 y centrifugado a 1000 rpm por 15 min a 20 °C para remover los componentes insolubles. El sobrenadante fue aplicado a una columna cromatográfica de CM- Sephadex C-50 (30 x 1,5 cm). La columna fue equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0, a un flujo de 5 ml/hora; después de esto, fue eluída con dos cambios de concentración de NaCl (0,3 y 0,6M, respectivamente). En las fracciones colectadas se determinó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm y la actividad coagulante, usando como sustrato fibrinógeno bovino.

Aquellas fracciones que mostraron actividad fueron juntadas, concentradas y dializadas para aplicarlas en una columna de filtración sobre Sephadex G-100 (30 x 1,0 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5,0, a un flujo de 8ml/hora; en cada fracción obtenida se determinó la actividad coagulante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Fue llevada a cabo usando el método de Laemmli⁶ bajo condiciones reductoras y no reductoras, usando una cámara vertical MINI-GEL System (Sigma); las corridas se realizaron por 1 hora. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. Los estándares de peso molecular usados fueron: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisosima (14,3 kDa).

Actividad coagulante sobre plasma

Muestras de sangre periférica fueron colectadas de personas voluntarias en 3,8% de citrato de sodio (9:1) y centrifugados a 3000 rpm a 15°C por 15 min para la obtención de plasma. La actividad coagulante fue medida por el método de Copley⁷ usando plasma humano citratado. La mezcla de reacción contenía 0,2 ml del sustrato y 0,1 ml de cloruro de sodio 0,9% tamponado a pH 7,4; preincubándose por 10 minutos a 37 °C para luego agregar 0,1 ml del veneno crudo o de la enzima purificada. Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de proteína utilizada.

Potencia coagulante

El tiempo de coagulación del fibrinógeno fue medido por la mezcla de 0,1 ml de muestra con 0,2ml de fibrinógeno bovino (5mg/ml en Tris HCl 0,05 M pH 7,4) e incubado a 37 °C. La potencia coagulante fue determinada por el método de Baughman⁸ y expresada en unidades NHI equivalentes de trombina.

Actividad caseinolítica

La actividad proteolítica fue medida usando caseína al 2% en buffer tris HCl 0,01 M pH 8,5, midiéndose luego de la reacción la concentración de productos ácidos solubles a 280 nm según el método de Takahashi y Ohsaka⁹.

Actividad sobre sustratos sintéticos

La actividad amidolítica fue medida sobre los sustratos benzoil arginil p-nitroanilina (BApNA), de acuerdo al método de Erlanger¹⁰, y tosyl-glycyl-prolyl-arginyl-4-nitranilina acetate (Chromozym TH) de acuerdo al método de Svendsen¹¹. La actividad se determinó por absorbancia a 405 nm. Una unidad de actividad amidolítica fue definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de sustrato por minuto.

Efectos del pH y la temperatura

La determinación del pH óptimo para la actividad amidolítica fue determinado por la variación del pH entre un rango de 4 a 10. La enzima fue diluida en buffer acetato de sodio (0,2 M pH 4,0-6,0), buffer fosfato de sodio (0,2 M pH 6,0-7,0) y buffer Tris HCl (0,2M 8,0-10,0). Asimismo, la tolerancia de la enzima a la temperatura fue determinada entre el rango de 20 a 90 °C. La enzima fue preincubada por 15 min a valores de temperatura establecidos para luego medir su actividad amidolítica.

Deglicosilación de la proteína

20 μl de la enzima purificada fue diluida en buffer de reacción (50 μl Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) y posteriormente se agregaron 2,5 μl de solución denaturante (SDS 2% y 1M 2-β mercaptoetanol) para luego someter la mezcla a calentamiento por 5 min a 100 °C e inmediatamente enfriarla. Se agregaron 2,5 μl de solución detergente (IGEPAL® 15%) y por último se añadió 2 μl de N-glicosidasa F (2 unidades/mg de proteína). La muestra fue incubada a 37 °C por 24 horas y la proteína deglicosilada fue evaluada por PAGE-SDS.

Efecto de los inhibidores de proteasas

La enzima purificada (25 μ l) fue preincubada con 25 μ l de inhibidor proteolítico correspondiente (tabla 2), la actividad residual fue determinada con BAPNA y la reacción fue detenida agregando ácido acético al 60%. La absorbancia se midió a 405 nm.

Ensayos de inmunogenicidad y neutralización

La inmunogenicidad fue evaluada mediante inmunodifusión e inmunolectroforesis de acuerdo a Ouchterlony y Nilsson¹². Asimismo, la neutralización de la actividad coagulante sobre plasma humano citratado fue evaluada mediante la obtención de la Dosis Eficaz del suero antibotrópico polivalente, siguiendo el Manual del Instituto Clodomiro Picado¹³.

RESULTADOS

Purificación de barnetobina.

La figura 1 muestra el perfil electroforético del veneno de *B. barnetti* sobre CM-Sephadex C-50. Se obtuvo cinco picos (Bb I-V) y se monitoreó las actividades amidolítica y coagulante para las fracciones eluidas. Solo el pico Bb III mostró tener actividad amidolítica y coagulante. Estas fracciones fueron juntadas y dializadas para ser aplicadas en una columna de Sephadex G-100. En este paso sólo tres picos fueron resueltos (Bb III 1-3), y la actividad similar a trombina se encontró en el pico Bb III 1 (figura 2).

La enzima se mostró como una entidad homogénea migrando como una sola banda en análisis de PAGE-SDS bajo condiciones reductoras y no reductoras, lo que indica que se trata de una proteína monomérica. El peso molecular estimado en condiciones no reductoras fue de 48 kDa mientras que en condiciones reductoras fue de 52 kDa (figura 3). Asimismo, la barnetobina, luego del tratamiento con N-glicosilasa F, mostró una reducción notable de su peso molecular, ya que el valor calculado fue de 29 kDa (figura 4). Adicionalmente, los análisis de inmunodifusión e inmunolectroforesis ensayados, mostraron a la enzima como una única banda homogénea (figura 5).

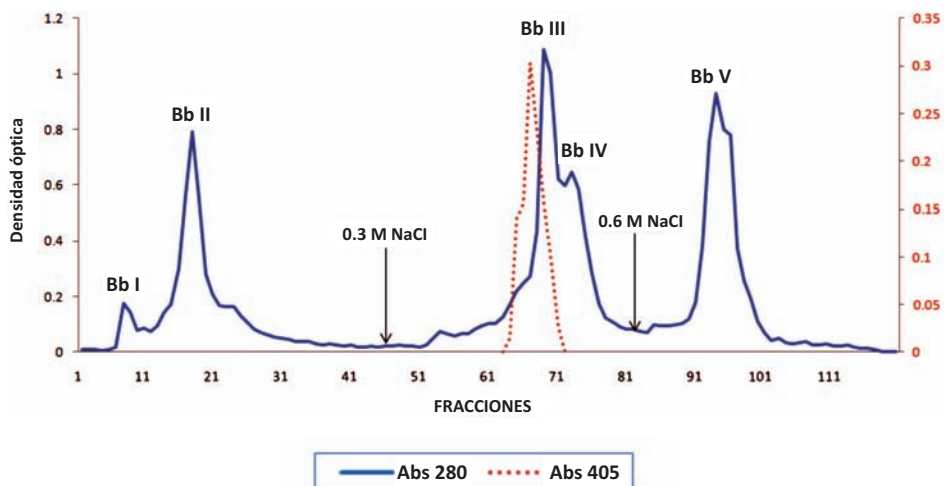


Figura 1. Primer paso de purificación de barnetobina del veneno de *Bothrops barnetti* por cromatografía de intercambio iónico CM Sephadex c-50

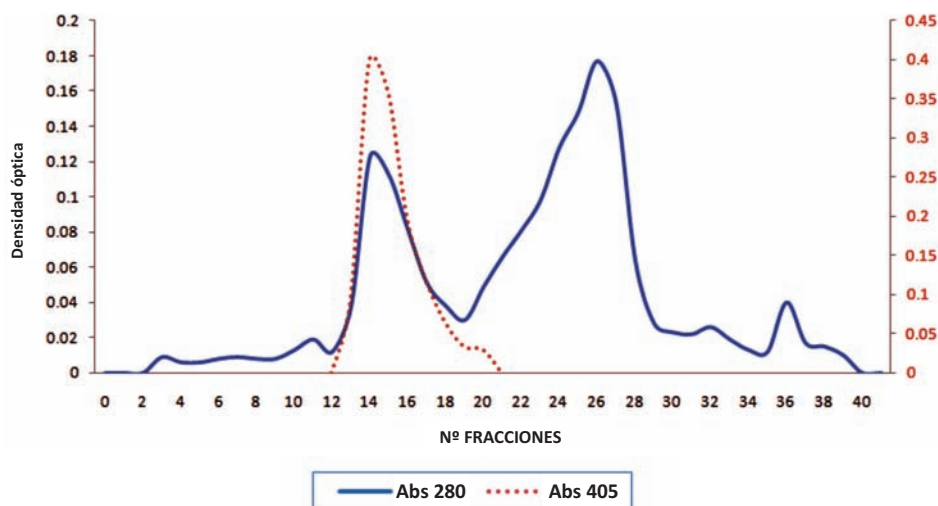


Figura 2. Segundo paso de purificación de barnetobina por cromatografía de filtración molecular Sephadex G-100.

Actividad de la enzima

La barnetobina fue capaz de coagular el plasma humano citratado y el fibrinógeno bovino, con una potencia coagulante de 121,1 NHI unidades/mg. Asimismo, la enzima mostró tener actividad arginil éster hidrolasa sobre los sustratos sintéticos BApNA y Chromozyn TH (tabla 1). Sin embargo, la enzima no mostró tener actividad caseinolítica.

pH óptimo y temperatura

La actividad amidolítica (hidrólisis del BApNA) muestra la esperada dependencia en forma de campana del pH a 37 °C, con una actividad máxima centrada en 8, 1. Cerca de un 50 % de la actividad máxima fue reflejada a pH 9,5 y cerca de 20% a pH 5,5. La óptima temperatura de la actividad catalítica de barnetobina sobre el sustrato BApNA mostró una alta hidrólisis en proporciones progresivas de los 25 hasta los 40 °C. La enzima perdió hasta el 50 % de su máxima actividad a los 60 °C, siendo completamente inactivada a los 80 °C.

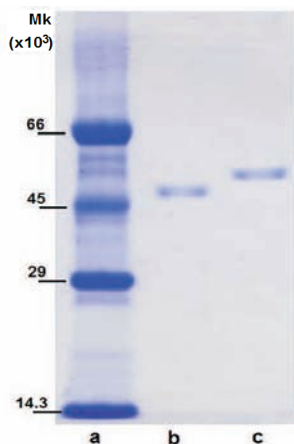


Figura 3. Análisis por PAGE SDS de barnetobina. (a) patrones de peso molecular, (b) barnetobina en condiciones no reductoras 48 kDa y (c) reductoras, 52 kDa,

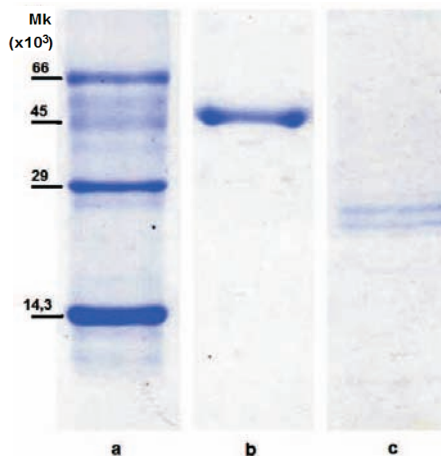


Figura 4. Deglicosilación de barnetobina, a: marcadores de peso molecular, b: enzima nativa, c: enzima tratada con PNGasa F.

Inhibidores enzimáticos

La actividad enzimática no fue inhibida por el quelador de metal EDTA, tampoco por el TLCK, ni los inhibidores iodoacetato y ácido glutámico. Sin embargo, la actividad fue severamente inhibida por el PMSF (50%) y el inhibidor de tripsina de soya (20%). El polisacárido heparina, inhibidor específico de la trombina, no tiene efecto alguno sobre la actividad de barnetobina. El agente β -mercaptoetanol no tuvo efecto alguno sobre la actividad enzimática, pese a que reduce a la proteína.

Inminogenicidad y neutralización de la enzima

Finalmente, los ensayos de inmunodifusión e inmunoelectroforesis mostraron arcos de precipitación de la enzima purificada con el antiveneno botrópico, lo que demuestra su reactividad antigénica. En cuanto a la efectividad del suero antibotrópico para neutralizar a la enzima coagulante, el antiveneno analizado fue capaz de neutralizar tanto la actividad coagulante del veneno como de la enzima purificada a una dosis eficaz (DE) de 146,7 y 250 μ l de antiveneno/mg de proteína, respectivamente.

Tabla 1. Actividades de la barnetobina sobre distintos sustratos.

Sustrato	pH	Actividad específica (UA/ mg de proteína)		Incremento de actividad (veces)
		Veneno	EST	
Fibrinógeno bovino	7,4	0,64 ¹	23,88 ¹	37,3
Plasma humano	7,4	0,69 ¹	26,66 ¹	38,6
BApNA	8,0	0,02 ²	1,05 ²	45
Chromozym TH	8,3	0,81 ²	10,6 ²	12

UA: ¹Inversa del tiempo de coagulación en segundo
²(umoles de p-nitroanilina liberada/ minuto)

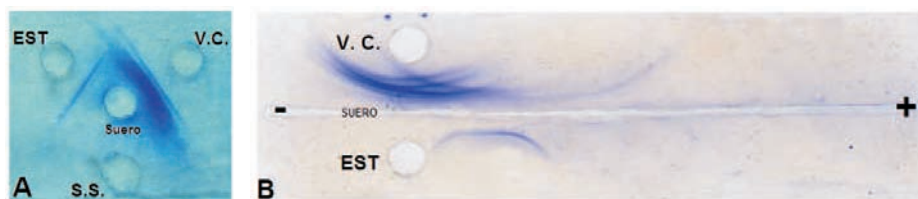


Figura 5. Reconocimiento de barnetobina (EST: enzima similar a trombina) por el suero antibotrópico polivalente (INS). **A:** inmunodifusión, **B:** inmunolectroforesis.

DISCUSIÓN

Esta es la primera investigación hecha sobre una proteína coagulante purificada del veneno de una especie ofídica que, además de ser típica de la costa norte del Perú, también se le puede encontrar en regiones de la sierra y de la selva (departamentos de La Libertad, Lambayeque, Cajamarca, Piura y Tumbes). Se trata de un hecho singular puesto que el hábitat de las serpientes aún cuando, puede ser amplio en territorio, generalmente está limitado por condiciones climáticas que en este caso, resultan ser muy variables por lo que, es muy interesante evaluar la ecología de esta serpiente a la luz de su localización geográfica⁵.

La técnica empleada fue idónea para obtener la barnetobina al estado homogéneo, por lo que esta enzima constituye un hallazgo más sobre una proteína coagulante presente en el veneno de ofidios sudamericanos. El peso molecular de la EST en estudio, está en el rango de 48 a 52 kDa, lo que la ubica entre las enzimas de este grupo con los mayores pesos encontrados³. La estructura unicitenaria encontrada para esta enzima es común en todas las ESTs estudiadas⁴. Además, se logró evidenciar la presencia de puentes S-S en la proteína, los cuales son reducidos por el β -mercaptoetanol, no tienen un papel crucial en la actividad enzimática, lo que indicaría que dichos puentes estarían ubicados en un dominio alejado del sitio activo.

El tratamiento de barnetobina con PNGasa, mostró que la enzima posee una glicosilación de tipo N (asociado al aminoácido asparagina¹⁴) y que sus carbohidratos asociados representan cerca del 45% del peso de la proteína; esto significa que la enzima está protegida por una gran masa molecular de azúcares que probablemente contribuyen a su estabilidad y protección frente a una eventual proteólisis, como ya se ha demostrado para otras proteínas del mismo tipo¹⁵. Esta propiedad es de mucha importancia debido a que las ESTs están involucradas en el evento de captura y muerte de la presa debido a que produce una rápida coagulación sanguínea inmediatamente después de ocurrida la mordedura¹. Hasta la fecha no se había reportado una proteína coagulante de venenos de serpientes que presente un contenido alto de carbohidratos similar a lo que se presenta en este trabajo.

Tabla 2. Efecto de algunos inhibidores de proteasas sobre la enzima similar a trombina de *Bothrops barnetti*.

Agente	Concentración final	Actividad (%)
Control	-	100
Fenil metil sulfonil floruro (PMSF)	5mM	55,3
Inhibidor de tripsina de soya	1 mg	80,4
Etilen diamino tetracético (EDTA)	5mM	115,6
Tosyl lisil clorometil cetona (TLCK)	5mM	118,2
Glutation	5mM	94,5
Iodo acetato	5mM	119
Ácido glutámico	5mM	109,8
Heparina	5 unidades	95,1
2 β-mercaptoetanol	5 Mm	97,2

El estudio del efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática mostraron que barnetobina se comporta al igual que la mayoría de las enzimas similares a trombina reportadas³; actuando en un significativo rango de pH (pH óptimo de 8,0) y una temperatura óptima de 40 °C. La fuerte inhibición de la actividad enzimática por parte del inhibidor PMSF, así como la significativa inhibición del inhibidor de la tripsina de soya, sugieren fuertemente que Barnetobina se comporte al igual que la trombina, pero una notable diferencia con esta última radica en que no es inhibida por el mucopolisacárido heparina⁴.

El veneno de *B. barnetti* demostró ser reconocido, mediante inmunodifusión e inmunoelectroforesis, por el suero antibotrópico polivalente; de la misma manera, la barnetobina fue reconocida como un agente antigénico lo que indica que, esta proteína genera respuesta inmune contra su estructura (figura 5). En cuanto a la neutralización de la actividad coagulante de la enzima purificada, ésta fue más baja que la del veneno crudo (250 µl de antiveneno/ mg de enzima) lo que indica que, la neutralización de la actividad coagulante del veneno total no ocurriría necesariamente sólo contra barnetobina, sino también contra otros factores procoagulantes que estarían presentes en la ponzoña. Obviamente, este tema debe ser más profundamente investigado en otro estudio.

CONCLUSIONES

- El veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* posee una enzima similar a trombina (barnetobina) y es posible purificarla mediante dos pasos cromatográficos usando una columna de CM Sephadex C-50, seguida de una columna de Sephadex G100 a pH 5,0.
- Estructuralmente la enzima es una glicoproteína unicatenaria de mediano peso molecular (48 kDa) con actividad coagulante sobre plasma humano y fibrinógeno bovino y actividad amidolítica sobre BApNA y Chromozym TH.
- La enzima es una serinoproteasa con una potencia coagulante equivalente de 131 NIH U/mg de trombina.
- La enzima es estable en rango de pH de 7 a 9,5 con un pH óptimo de 8,0 y su actividad amidolítica es progresiva hasta los 40°C, y posee al menos un puente disulfuro.
- El suero antibotrópico polivalente neutraliza la actividad coagulante del veneno de *Bothrops barnetti* y la enzima similar a trombina purificada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Superior de Investigaciones de la UNMSM así como al Instituto Nacional de Salud por el apoyo brindado en la realización de este trabajo. El presente trabajo fue parte de la Tesis del autor principal para obtener el Título Profesional de Biólogo.

REFERENCIAS

1. Stocker, K.. Medical Use of snake venoms protein. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.
2. Ouyang, C.; Teng, C. and Huang T. Characterization of snake venoms components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* 1992; 30(9): 945-966.
3. Pirkle, H.. Thrombin-like enzymes from snake Venoms: An updated inventory. *Thromb. haemost.* 1998; 79: 675-683.
4. Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M. and Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 843-856.
5. Ascencios, H. y Cutti, F. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú." *Bol. Lima* 1995; N°97, pp.91-96.
6. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
7. Copley, A. Studies of snake venoms on the blood coagulation. The thromboserpentin enzyme in the venoms. *Thrombos Res* 1973; 2: 487-508.
8. Baughman, D.J.. Thrombin assay, In: Methods in enzymology, proteolytic enzymes. G.E. Periman & L. Lorand Eds. Academic Press. New York-London 1970: 145-157.
9. Takahashi, T. and Oohsaka, A.. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochim. biophys. Acta* 1970; 198: 293-307.
10. Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 95: 271-278.
11. Svendsen, L.. Aktivitatsbestimmung proteolytischen enzyme mit synthetischen substanzen (Activity determination of proteolytic enzyme with synthetic substances). Chromogene substrate in der Gerinnunsanalytik, Aktuelle Diagnostik, Boheringer Mannheim. 1977: Pp 14-17.

12. Ouchterlony, O. and Nilsson, L.. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental Immunology*. 1967; I (34): 655-660.
13. Instituto Cloromido Picado. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Manual de Laboratorio. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. 2007; Pág.21-22.
14. Norris, G.; Stillman, T.; Anderson, B. and Baker, E.. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure* 1994; 2(11): 1049-1059
15. Silva-Junior, F.; Guedes, H.; Garvey, C.; Aguiar, A.; Bourguignon S.; Di Cera, E. and Giovanni-De-Simone S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the Bothrops jararacussu venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon* 2007; 50(1): 18-31.