

## PURIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE BILINEATOBINA, UNA PROTEÍNA COAGULANTE DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA ARBORÍCOLA *Bothrops bilineatus* (LORO MACHACO)

Gladys Cahuana<sup>a</sup>, Dan Vivas<sup>b\*</sup>, Edith Rodríguez<sup>b</sup>, Armando Yarleque<sup>b</sup>

### RESUMEN

Se ha purificado una enzima coagulante del veneno de la serpiente arborícola *Bothrops bilineatus*, denominada bilineatobina, mediante dos pasos cromatográficos sobre Sephadex G-100 y CM-Sephadex C-50, respectivamente, utilizando en ambos casos como buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0. La enzima fue purificada 24,8 veces con un rendimiento de 16%. El peso molecular obtenido por cromatografía de exclusión molecular fue de 40 kDa mientras que por PAGE-SDS se obtuvo 45 kDa. Se trata de una proteína monomérica con al menos un puente disulfuro y debido a su actividad coagulante sobre el plasma humano citratado, fibrinógeno bovino así como el sustrato cromogénico BApNA; se trataría de una enzima similar a trombina. La actividad amidolítica fue estable hasta los 50°C y el pH óptimo fue de 7,5. La enzima es inhibida por PMSF, lo que sugiere que se trata de una serinoproteasa y su inhibición por la heparina señala una mayor semejanza funcional con la trombina que con proteínas homólogas de otros venenos ofídicos.

**Palabras clave:** Enzima coagulante, veneno, serpiente, *Bothrops bilineatus*. bilineatobina

## PURIFICATION AND CHARACTERISTICS OF BILINEATOBIN, A CLOTTING ENZYME ISOLATED FROM THE VENOM OF THE ARBOREAL PERUVIAN SNAKE *Bothrops bilineatus* (LORO MACHACO)

### ABSTRACT

A clotting enzyme was purified from *Bothrops bilineatus* arboreal snake venom, called bilineatobin, using Sephadex G-100 followed by CM Sephadex C-50, in both two cases with 0,05 M ammonium acetate buffer pH 6,0. The enzyme was purified 24,8 fold with 16% of yield. The molecular weight obtained by molecular exclusion chromatographic was 40 kDa while by SDS-PAGE was 45 kDa. It is a monomeric protein with at least one disulfide bond and because its coagulant activity on fibrinogen, citrated human plasma as well as chromogenic substrate BApNA would be a trombin like enzyme. The amidolytic activity was stable until 60°C and optimum pH was 7,0. In addition the enzyme is inhibited by PMSF suggesting that is a serine proteinase and its inhibition by heparin indicates greater functional similarity to the protein thrombin counterparts in other ophidian poisons.

**Key words:** Coagulant enzyme, venom, snake, *Bothrops bilineatus*. bilineatobin

<sup>a</sup> Dirección actual: Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)- Universidad Pablo de Olavide, CIBERDEM, Sevilla-España, gmcahmac@upo.es

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. devivasr@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

El Perú posee una variada fauna ofídica, en donde se incluye más de 30 especies de serpientes venenosas o víboras; la mayoría de estas pertenecientes a la familia Viperidae que se distribuyen en la costa sierra y selva de nuestro país<sup>1</sup>.

Una sintomatología clásica en el envenenamiento causado por la mordedura de estas serpientes, conocido como ofidismo, es la alteración del sistema homeostático que se manifiesta, en última instancia, en la aceleración o el retraso en el tiempo de coagulación sanguínea de la persona afectada. Esto se debe a la presencia de enzimas en el veneno que actúan a nivel de la cascada de coagulación, agregación y/o adhesión plaquetaria, fibrinógeno o fibrina<sup>2</sup>.

Dentro de este panorama, es muy conocida la presencia de las enzimas similares a trombina (TLE, del inglés thrombin like enzyme). Las TLEs son serinoproteasas que actúan sobre las moléculas del fibrinógeno produciendo monómeros de fibrina de forma parecida a la trombina<sup>3,4</sup>. Sin embargo, hay diferencias, sobre todo de tipo funcional, entre las TLEs y la trombina; la más importante es que las TLEs sólo pueden degradar una de las cadenas de la molécula del fibrinógeno (A $\alpha$  o B $\beta$ ) produciendo de esta manera un coágulo inestable que es rápidamente removido por los procesos fibrinolíticos secundarios conduciendo a una incoagulabilidad sanguínea.<sup>2,5</sup>

No obstante, las TLEs han despertado interés en el campo farmacológico, ya que pueden ser empleadas como herramientas terapéuticas, principalmente en el tratamiento de los trastornos homeostáticos<sup>5</sup>. Además, estas moléculas no son usualmente inhibidas por la heparina, principal inhibidor de la trombina, lo que permite el análisis de los niveles de fibrinógeno en sangre heparinizada<sup>2</sup>.

A la fecha se han caracterizado más de 50 TLEs procedentes de diversos venenos ofídicos, de las cuales cinco pertenecen a especies peruanas. *Bothrops bilineatus* es una serpiente arborícola llamada comúnmente loro machaco. Tiene interés estudiar los principales componentes del veneno de esta serpiente porque se considera que al alimentarse de aves y otras especies de alto movimiento, su ponzoña debe contener principios altamente selectivos para inmovilizarlas. Por tanto, en esta investigación se describe a una enzima similar trombina denominada bilineatobina recientemente caracterizada.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

Se utilizó veneno liofilizado de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus* de la zona del alto Marañón, Departamento de Amazonas, a partir de ejemplares mantenidos en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la UNMSM.

Las sustancias: Fibrinógeno bovino, benzoil arginil p-nitroanilida (BAPNA), benzoil arginil etil-éster (BAEE) y tosyl arginil metil-éster (TAME) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company- USA. El plasma humano citratado fue obtenido de sangre venosa de personas saludables voluntarias.

### Purificación de la enzima

60 mg de veneno liofilizado fueron disueltos en 1,5 ml de buffer acetato de amonio 0,05M pH 6,0, separándose los restos insolubles por centrifugación a 4000 rpm, por 10 min a 20°C. El sobrenadante fue aplicado a una columna de filtración molecular Sephadex G-100 SF (1,5 x 46,5 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0. La elución se realizó a temperatura ambiente recolectándose fracciones de 2 ml. La cuantificación de proteínas de

cada fracción fue realizada midiendo su absorbancia a 280 nm; la actividad enzimática de cada fracción fue determinada analizando su actividad amidolítica sobre BApNA.

Las fracciones con actividad amidolítica fueron juntadas (7 mL) y aplicadas a una columna de intercambio catiónico CM-Sephadex C-50 (1,1 x 18,5 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 6,0. La elución se realizó a 25°C; se colectaron fracciones de 2 mL; aquellas fracciones con actividad amidolítica fueron reunidas y utilizadas para la caracterización bioquímica de la enzima.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (PAGE-SDS)**

Fue llevada a cabo usando el método de Laemmli<sup>6</sup> bajo condiciones reductoras, utilizando una cámara vertical MINI-GELSystem (Sigma); las corridas se realizaron por 45 min a 100 voltios. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. Los estándares de peso molecular usados fueron: albúmina sérica bovina (66 kDa), pepsina (34,7 kDa), y lisozima (14,3 kDa).

### **Determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión**

Fue calculado de acuerdo al método de Andrews (1965)<sup>7</sup> mediante el uso de una columna de Sephadex G-100 (1,5 cm x 46,5 cm) usando como proteínas patrones: albúmina sérica bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12,4 kDa).

### **Actividad coagulante**

Se prepararon mezclas de reacción en tubos (50 x 75 mm) que contenían 0,2 mL de plasma humano citratado o fibrinógeno bovino (5mg/mL en buffer Tris HCl 0,05M pH 7,4), adicionándose luego 0,05 mL de la enzima. La mezcla se incubo a 37°C midiéndose el tiempo de coagulación total en segundos. La actividad específica corresponde a la inversa del tiempo de coagulación sobre la cantidad de proteína empleada en mg.

### **Actividad amidolítica**

La actividad sobre BApNA fue determinada por el método de Erlanger y col. (1961)<sup>8</sup>. Para la mezcla de reacción se colocó 2 mL de BApNA  $9 \times 10^{-4}$  M, 0,45 mL de buffer Tris HCl 0,05M a pH 7,5 y 0,5 mL de la enzima, incubándose por 10 min a 37°C y agregando luego 0,5 mL de ácido acético al 60%. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm. Se calculó la actividad específica por la cantidad de micromoles de p-nitroanilina liberada por minuto por mg de proteína.

### **Actividad esterásica**

Se determinó por el método de Schwert y Takenaka (1965)<sup>9</sup>, utilizando 0,1 mL de TAME y BAEE 4mM y 2,8 mL de buffer Tris-HCl 0,05M pH 7,5. Esta mezcla se incubó por 3 min a 37°C adicionándose luego 0,1 mL de la enzima y registrándose los incrementos de absorbancia a 247 nm.

### **pH óptimo**

Se utilizó buffer acetato de amonio 0,05M en un rango de pH de 6,0 a 7,0 y buffer Tris HCl 0,05M, en un rango de 7,5 a 9,0 y con intervalos de 0,5 unidades. Para esta prueba se utilizó BApNA como sustrato, midiéndose la actividad en los valores de pH indicados.

### **Termoestabilidad**

Se colocaron 110  $\mu$ L de la enzima en viales de plástico con tapa a temperaturas de 37, 45, 60, 75 y 90 °C, respectivamente, siendo luego enfriados bruscamente y mantenidos en un depósito con hielo por 3 minutos y luego se midió la actividad amidolítica con 50  $\mu$ L de la proteína tratada.

### Acción de algunos agentes químicos

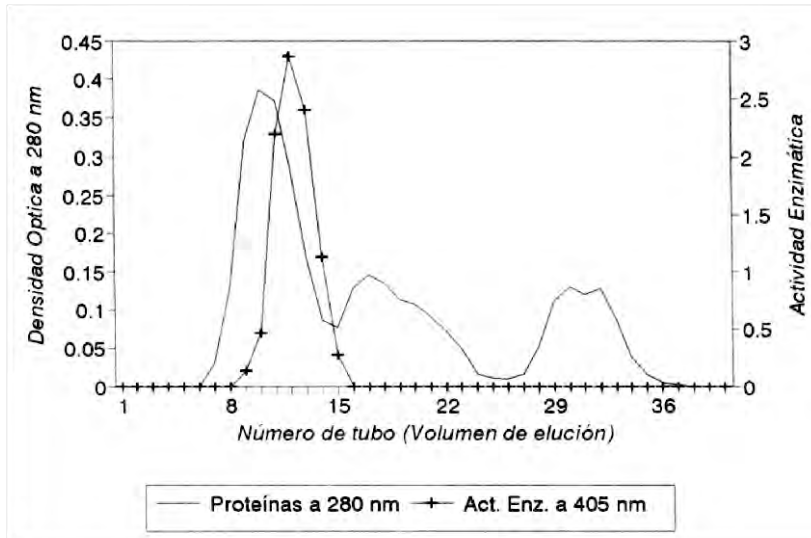
La enzima purificada (110  $\mu$ L) fue preincubada con 50  $\mu$ L de inhibidores proteolíticos: EDTA, TLCK, mercaptoetanol, yodoacetato, inhibidor de tripsina de soya, hirudina, antitrombina III, PMSF y heparina en rangos variables de concentración. La actividad residual fue determinada sobre BApNA a 405 nm.

## RESULTADOS

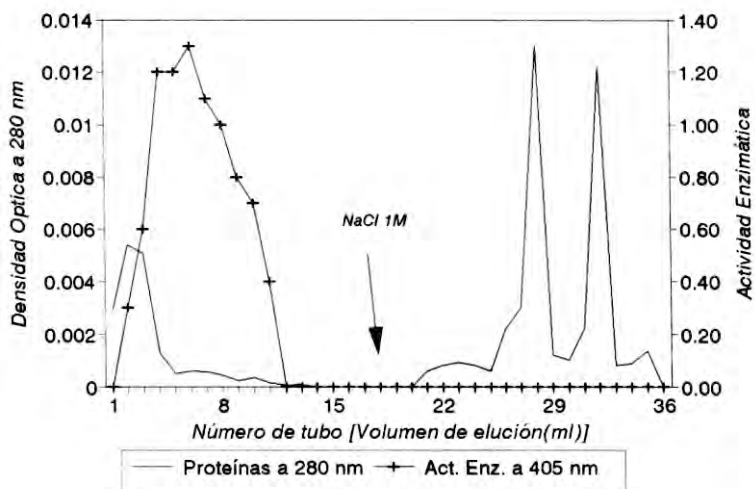
### Purificación de la enzima

Al pasar el veneno de *Bothrops bilineatus* por una columna de Sephadex G-100 se obtuvo tres picos mayores de proteína; la actividad amidolítica fue detectada en la caída del primer pico (figura 1), recuperándose un total de 12,15 mg que representa el 19,17% de la proteína total aplicada. Estas fracciones fueron juntadas y aplicadas a una columna de intercambio catiónico CM- Sephadex C-50, donde se resolvió un solo pico en el volumen isocrático y dos cuando se realizó la elución con 0,6 M de NaCl; en este segundo paso la actividad amidolítica se presentó en el pico de proteína de elución isocrática (figura 2) lográndose recuperar 0,410 mg de proteína que representa un 0,64% de la proteína total.

Cuando la segunda fracción con actividad amidolítica fue analizada por PAGE-SDS (figura 3) bajo condiciones reductoras (con el agente 2- $\beta$ -mercaptoetanol) se obtuvo una sola banda homogénea con un patrón de migración equivalente a los 45 kDa. Asimismo, al evaluar el peso molecular de la proteína por medio de cromatografía de filtración molecular, se obtuvo un valor de 40 kDa (figura 4).

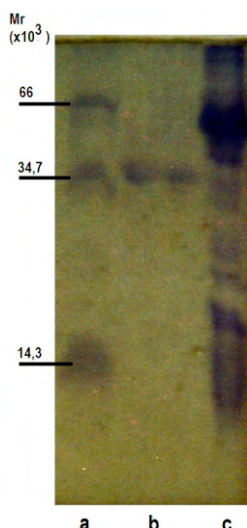


**Figura 1.** Primer paso de purificación de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus* por cromatografía de filtración molecular G-100.

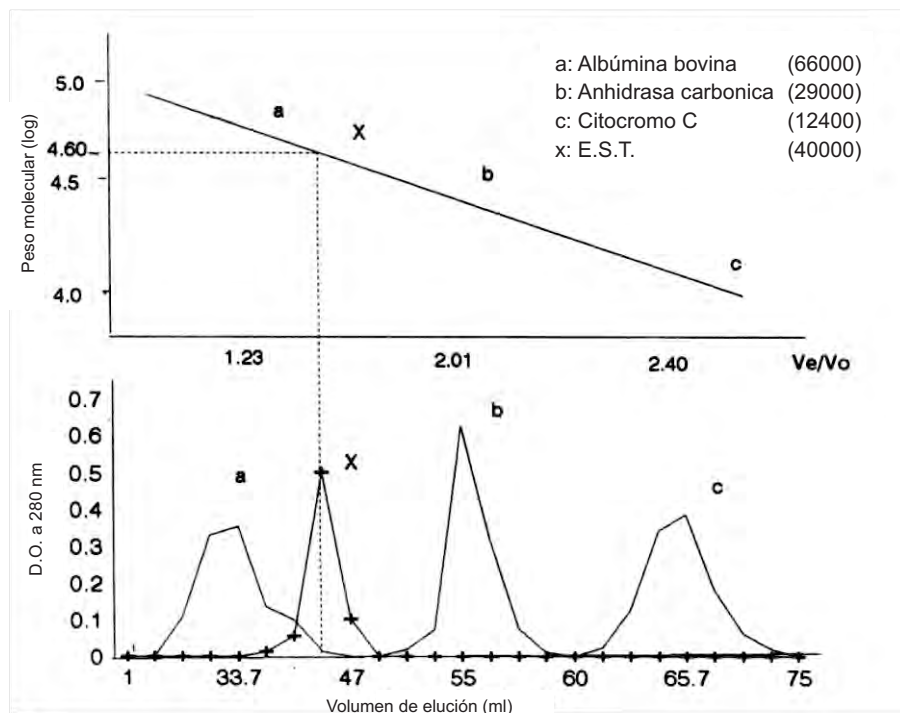


**Figura 2.** Segundo paso de purificación de la enzima coagulante del veneno de *Bothrops bilineatus* por cromatografía de intercambio catiónico CM-Sephadex C-50

Bilinetobina tuvo actividad coagulante sobre el fibrinógeno bovino (8,080 U/mg), superior al del veneno total (0,167 U/mg) observándose que para el plasma citratado los valores fueron de 4,25 U/mg y 0,056 U/mg, respectivamente. De la misma manera, el BApNA fue hidrolizado 24,8 veces más rápido por la enzima purificada que por el veneno total (tabla 1).



**Figura 3.** Análisis por PAGE-SDS de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*. (a) patrones de peso molecular. (b) enzima coagulante en condiciones reductoras 45 kDa. (c) Veneno total de *Bothrops bilineatus*



**Figura 4.** Determinación del peso molecular de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus* por cromatografía en Sephadex en G-100.

Por otro lado, tanto la enzima purificada como el veneno total no tuvieron efecto alguno sobre los sustratos BAEE y TAME, es decir, bilineatobina, no muestra una actividad esterásica.

**Tabla 1.** Actividad del veneno crudo y la enzima coagulante purificada sobre diferentes sustratos sintéticos.

SUSTRATO	pH	Actividad específica (U/mg de proteína)	
		Veneno crudo	Enzima
Plasma	7,4	0,056	4,15
Fibrinógeno bovino	7,5	0,167	8,080
BAPNA	7,5	0,018	0,445
TAME	8,0	NP	NP
BAEE	8,0	NP	NP

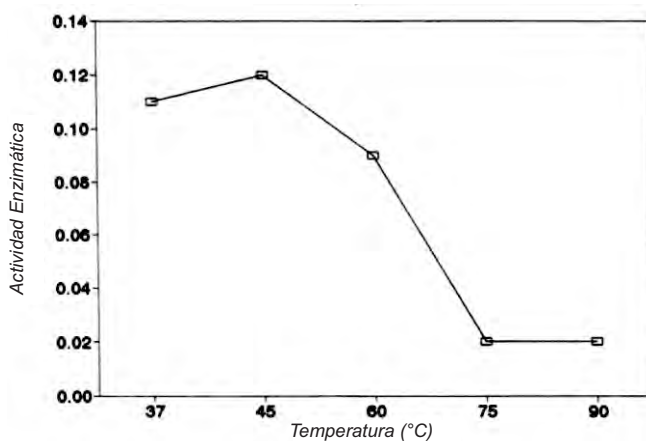


Figura 5. Termoestabilidad de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*.

### Efectos del pH y temperatura

La actividad residual usando BApNA como sustrato indica que la actividad amidolítica de la enzima es estable hasta los 60°C. En tanto que un aumento de preincubación a 75°C produce una disminución de la actividad en un 90% (figura 5). Por otro lado, la enzima mantiene su actividad amidolítica en un rango de pH de 7,0 a 8,5. A pH 9,0 la actividad enzimática disminuye en un 70% (figura 6).

### Efecto de algunos agentes químicos

En la tabla 2 se muestra el efecto de algunos inhibidores proteolíticos sobre la actividad de la enzima. El PMSF (4 mM) produjo una inhibición total de la actividad enzimática, en tanto que la heparina (166,66 U/ml) causó una inhibición del 65,9% de la actividad inicial. En cambio, el EDTA (1 mM) y el mercaptoetanol (20 mM), no tuvieron acción inhibitoria alguna; un resultado similar se produce cuando se emplea antitrombina III, yodoacetato, TLCK, hirudina y el inhibidor de tripsina de soja que no disminuyen de manera significativa la actividad sobre el BApNA.

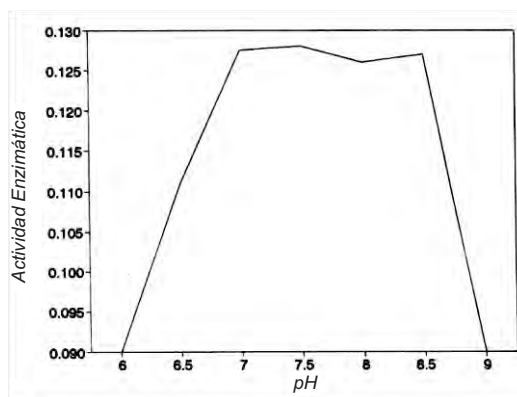


Figura 6. Curva de pH óptimo de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo reporta la purificación y la caracterización de una enzima coagulante del veneno de *Bothrops bilineatus* a la que hemos denominado bilineatobina. Se trata de una enzima similar a trombina que eluye en condiciones isocráticas de un intercambiador catiónico CM Sephadex C-50 (figura 2) lo que indicaría que a pH 5,0 la proteína tiene una alta densidad de carga negativa, es decir, una posible naturaleza ácida.

El peso molecular obtenido por filtración molecular fue de 40 kDa (figura 3) en tanto que por PAGE-SDS, bajo condiciones reductoras, se obtuvo un valor 45 kDa (figura 4); esa diferencia obtenida podría indicar la presencia de carbohidratos asociados a la estructura proteica que normalmente afectan la migración electroforética y dan la característica microheterogeneidad de las enzimas similares a trombina<sup>5</sup>. Asimismo, los resultados por PAGE-SDS con el agente reductor sugieren que la proteína es monomérica.

La enzima posee una actividad coagulante sobre el fibrinógeno bovino y el plasma humano citratado, también muestra actividad amidolítica sobre amidas cromogénicas, como el BApNA (tabla 1), siendo este último un excelente sustrato para seguir su purificación o su cinética ya que la liberación de p-nitroanilina es fácilmente detectable a 405 nm y es un modelo sintético del enlace peptídico sobre el cual actuaría la enzima en el fibrinógeno plasmático teniendo como aminoácido principal, la arginina<sup>5,10</sup>.

Por otro lado, bilineatobina posee especificidad sobre los sustratos cromogénicos, ya que sólo atacaría los enlaces amida del BApNA; y no los enlaces éster etílico o metílico presentes en el BAEE y TAME, respectivamente (tabla 1); dicha especificidad es poco usual en las TLEs<sup>10</sup>. Asimismo, el hecho de encontrar mayor actividad coagulante sobre fibrinógeno bovino que sobre el plasma humano citratado (tabla 1) podría estar asociado al hecho de que este último debe contener cantidades no determinadas de heparina, la cual actuaría reduciendo la actividad enzimática, comportamiento también inusual para enzimas de este tipo<sup>5</sup>

**Tabla 2.** Efecto de diversos agentes químicos sobre la actividad de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*

Inhibidores	Concentración final	Actividad enzimática (%)
Sin agente		100
EDTA	1mM	98,2
TLCK	4mM	107,8
Mercaptoetanol	20mM	103
Iodoacetato	2mM	107,8
Inhibidor de tripsina de soya	20mg/ml	101,8
Hirudina	3,33 U/ml	98,2
Antitrombina III	6,66 U/ml	101,8
PMSF	4 mM	5,3
Heparina	166,66 U/ml	34,1
	33,33 U/ml	44,9
	16,66 U/ml	63,5
	3,33 U/ml	103



La exposición de bilineatobina a la acción de los agentes quelantes como el EDTA y agentes reductores como el 2 $\beta$ -Mercaptoetanol y el yodoacetato (tabla 2), demuestra que la enzima no depende de iones metálicos ni de enlaces disulfuros transversales para actuar sobre el sustrato BApNA; por lo tanto, no se trataría de una metaloproteasa y que su actividad depende de la integridad estructural de la proteína. En cambio, el efecto inhibitorio del PMSF indica que la enzima es una serinoproteasa<sup>(3,4,5,10)</sup>. Por otra parte, la falta de inhibición con TLCK e inhibidor de tripsina de soya, sugiere que en el sitio activo de la enzima no es crucial la participación de los residuos de histidina, lo cual es típico en la estructura del sitio activo de las TLEs de veneno de serpientes por que ellas pertenecen a la familia génica tripsina/kalicleína<sup>4,5,10</sup>.

Es también interesante el hecho de que la enzima sea insensible al efecto de los inhibidores de la trombina como la antitrombina III y la hirudina, pero sí es afectada por la heparina, un inhibidor clásico de la trombina. Esta inhibición pone en evidencia que bilineatobina es una entidad proteica peculiar dentro de las TLEs y que funcionalmente actuaría como la trombina<sup>3,4,5,10</sup>. Si tenemos en cuenta que a lo largo de la evolución de las TLEs, ellas han logrado diferenciarse de la trombina, en este caso estaríamos frente a una proteína como bilineatobina más próxima a la principal proteína coagulante de los mamíferos, que es la trombina. Adicionalmente podemos señalar que la mayoría de las TLEs son muy termoestables y que mantienen hasta un 50% de estabilidad después del tratamiento a 90° C; en cambio, bilineatobina no muestra esta alta resistencia ya que se inactiva rápidamente después de los 60°C.

Las investigaciones realizadas con veneno de serpientes arborícolas muestran una gran versatilidad de sus componentes proteicos ya que en el caso de las mambas africanas del género *Dendroapsis* sus ponzoñas son neurotóxicas, en tanto que *Akgistrodon acutus*, la serpiente acuática de los 5 pasos, tiene un veneno altamente cardiotoxico<sup>11</sup>. Si consideramos que las aves son la principal fuente alimentaria de *Bothrops bilineatus* y que dichas presas son por lo menos 10 veces más rápidas que el ofidio, la ponzoña debe contener principios activos con un alto grado de eficacia para inmovilizar y matar a dichas presas. Bilineatobina sería uno de estos componentes cuyas características peculiares merecen ser estudiadas más ampliamente.

### CONCLUSIONES

- El veneno de la serpiente *Bothrops bilineatus* contiene una enzima similar a trombina, la cual es posible aislarla por combinación de dos pasos cromatográficos: de filtración e intercambio iónico.
- La enzima es una serinoproteína monocaténaria de mediano peso molecular (45 kDa).
- La enzima es estable en un rango de pH de 7,5 a 8,5 con un pH óptimo de 7,5 y su actividad amidolítica se ve incrementada hasta los 40°C.
- La enzima tiene la capacidad de coagular el fibrinógeno y el plasma humano citratado y posee características peculiares con respecto a las enzimas similares a trombina.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este estudio agradecen a la International Foundation for Science (IFS) de Suecia, institución que permitió la apertura de la línea sobre proteínas coagulantes de origen ofídico, apoyando investigaciones como la presente.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Ascencios, H. y Cutti, F. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú." *Bol. Lima* 1995; 97, pp.91-96.
2. Stocker, K. Medical Use of snake venoms protein. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.
3. 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.
4. Pirkle, H. Thrombin-like enzymes from snake Venoms: An updated inventory. *Thromb. haemost.* 1998; 79: 675-683.
5. 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.
6. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
7. Andrews, P. the gel filtration behavior of protein related to their molecular weight over a wide range. *Biochem Journal.* 1965. 91:595-606.
8. 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.
9. Schwert, G. and Takenaka, Y. Aspect no photometric determination of tripsin and chymotripsin. *Biochem. Biophy, Acta.* 1965 16: 170.
10. 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.
11. Huang QQ, Teng MK, Niu LW. Purification and characterization of two fibrinogenclotting enzymes from five-pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 1999; 37(7):999-1013.