



## ARTICULO DE INVESTIGACIÓN

# Efecto citotóxico de fosfolipasas A2 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Colombia

Cytotoxic effect of A2 phospholipases of the venom of *Crotalus durissus cumanensis* from Colombia

Efeito citotóxico da fosfolipase A2 do veneno de *Crotalus durissus cumanensis* da Colômbia

Juan Carlos Quintana-Castillo<sup>1\*</sup>, Isabel Cristina Ávila-Gómez<sup>1</sup>,  
Juan Felipe Ceballos-Ruiz<sup>1</sup>, Leidy Johana Vargas-Muñoz<sup>1</sup>,  
Sebastián Estrada-Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo Infettare, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, sede Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Programa de Ofidismo/Escurpionismo, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

\*Correspondencia: Dirección: Carrera 42 No. 49 - 95, Bloque 8 Tel: (4) 444-60-65

Correo electrónico: [juan.quintanac@ucc.edu.co](mailto:juan.quintanac@ucc.edu.co)

Fecha de recibido: 11-21-2015

Fecha de aceptación: 08-26-2016

### Citar este artículo así:

Quintana-Castillo JC, Ávila-Gómez IC, Ceballos-Ruiz JF, Vargas-Muñoz LJ, Estrada-Gómez S. Efecto citotóxico de fosfolipasas A2 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Colombia. Revista Investig Salud Univ Boyacá. 2017;4(1):16-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.24267/23897325.194>

## RESUMEN

**Introducción.** Los venenos de serpientes representan una fuente importante de proteínas y péptidos, los cuales exhiben diversas actividades biológicas, tales como antibacterianas, antiparasitarias, antivirales, antitumorales, antifúngicas y contra la agregación plaquetaria, entre otras.

Las fosfolipasas A2 presentes en los venenos de serpientes son las proteínas más estudiadas en estos modelos. Se ha demostrado que las fosfolipasas A2, activas e inactivas, poseen actividad catalítica contra células tumorales.

**Objetivo.** Aislar, purificar y caracterizar la fosfolipasa A2 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* para evaluar su actividad antitumoral in vitro.

**Materiales y métodos.** El aislamiento, la purificación y la identificación de la crotoxina B se hizo mediante la cromatografía de exclusión molecular, la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography, *RP-HPLC*) y la espectrometría de masas. El efecto citotóxico sobre células tumorales (K562) y células normales (células mononucleares de sangre periférica) se determinó utilizando la técnica de MTT.

**Resultados.** La separación y posterior identificación de la crotoxina B del veneno de *C. d. cumanensis* de Colombia, permitieron evidenciar que esta fosfolipasa A2 posee efecto citotóxico sobre las células mononucleares de sangre periférica con una dosis de  $18,23 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$ , mientras que, para las células K562, fue de  $2,34 \pm 0,199 \mu\text{g/ml}$ .

**Conclusiones.** Los resultados sugieren la posibilidad de utilizar la crotoxina B aislada del veneno de *C. d. cumanensis* como un posible recurso terapéutico para su aplicación en humanos.

**Palabras clave:** *Crotalus durissus cumanensis*; citotoxicidad; fosfolipasas A2; crotoxina B.

## ABSTRACT

**Introduction.** Snake venoms are an important source of proteins and peptides, which display various biological activities such as antibacterial, antiparasitic, antiviral, antitumor, antifungal and against platelet aggregation, among others.

Phospholipases A2 present in snake venoms are the most studied proteins in these models. Active and inactive A2 phospholipases have been shown to possess catalytic activity against tumor cells.

**Objective.** To isolate, purify and characterize the phospholipase A2 of the venom of *Crotalus durissus cumanensis* to evaluate its in vitro antitumor activity.

**Materials and methods.** Isolation, purification and identification of crotoxin B was done with Size Exclusion Chromatography, Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC, and Mass Spectrometry. The cytotoxic effect on tumor cells (K562) and normal cells (peripheral blood mononuclear cells) was determined using the MTT technique.

**Results.** The separation and subsequent identification of crotoxin B, found in the venom of *C. d. cumanensis* from Colombia, showed that this phospholipase A2 has a cytotoxic effect on peripheral blood mononuclear cells at a dose of  $18.23 \pm 0.57 \mu\text{g} / \text{ml}$ , whereas for K562 cells, it was  $2.34 \pm 0.199 \mu\text{g}/\text{ml}$

**Conclusions.** The results suggest the use of crotoxin B, isolated from the venom of *C. d. cumanensis*, as a possible therapeutic resource for human application.

**Keywords:** *Crotalus durissus cumanensis*; cytotoxicity; phospholipases A2; crotoxin B.

## RESUMO

**Introdução.** Os venenos da serpentes constituem uma importante fonte de proteínas e péptidos, os quais exibem várias actividades biológicas, tais como agentes antibacterianos, antiparasitárias, antivirais, antitumorais, antifúngicas e contra a agregação de plaquetas, entre outros.

As fosfolipasas A2 presentes no veneno da serpentes são as proteínas mais estudadas nestes modelos. Tem sido demonstrado que as fosfolipasas A2, activas e inactivas, possuem actividade catalítica contra células tumorais.

**Objetivo.** Isolar, purificar e caracterizar a fosfolipase A2 do veneno da *Crotalus durissus cumanensis* para avaliar a sua actividade anti-umoral in vitro.

**Materiais e métodos.** O isolamento, a purificação e identificação da crotoxina B foi realizada por cromatografia de exclusão molecular, cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography, *RP-HPLC*) e espectrometria de massa. O efeito citotóxico sobre células tumorais (K562) e células normais (células mononucleares do sangue periférico) foi determinada usando a técnica de MTT.

**Resultados.** A Separação e subsequente identificação da crotoxina B do veneno da *C. d. cumanensis* da Colômbia, permitiu constatar que esta fosfolipase A2 tem um efeito citotóxico em células mononucleares de sangue periférico, com uma dose de  $18,23 \pm 0,57 \mu\text{g}/\text{ml}$ , enquanto que para as células K562, foi  $2,34 \pm 0,199 \text{ ug}/\text{ml}$ .

**Conclusões.** Os resultados sugerem a possibilidade de utilizar crotoxina B isolada a partir do veneno da *C. d. cumanensis* como recurso para o potencial uso terapêutico em humanos.

**Palabras clave:** *Crotalus durissus cumanensis*; citotoxicidade; fosfolipasas A2; crotoxina B

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad crónica progresiva que se caracteriza por la proliferación descontrolada y acelerada de células que han perdido la capacidad de controlar su replicación (1,2). La citotoxicidad es la propiedad de causar la muerte en sistemas celulares mediante anticuerpos, células o toxinas en algunos casos (3).

Los venenos de serpientes representan una fuente importante de proteínas y péptidos con actividades biológicas como antibacterianas, antiparasitarias, antivirales, antitumorales, antifúngicas y contra la agregación plaquetaria, entre otras; las fosfolipasas A2 (PLA2) son las proteínas más estudiadas en estos modelos (1,4-8).

Las fosfolipasas A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) conforman una superfamilia caracterizada por su capacidad para hidrolizar fosfolípidos, específicamente en la posición sn-2 del enlace éster, produciendo ácidos grasos y lisofosfolípidos. Las fosfolipasas A2 secretadas (sPLA2) tienen varias características en común: masa molecular pequeña (13 a 15 kDa), numerosos puentes disulfuro, residuos catalíticos histidilo y aspártico, y una región de unión a calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) muy conservada (9). Las fosfolipasas A2 de los venenos ofídicos exhiben una variedad de actividades fisiológicas, como miotoxicidad, neurotoxicidad, anticoagulación, edema, cardiotoxicidad (10-12), antibacteriana

(13), antiviral (5), antiparasitaria (8), antitumoral (1) y contra la agregación plaquetaria (14).

En los estudios recientes con modelos experimentales, se ha demostrado que las fosfolipasas A2, activas o inactivas, poseen actividad catalítica contra células tumorales (15-17). Por tanto, se convierten en una alternativa viable que debe ser completamente validada para futuras aplicaciones como agentes antitumorales. Por esta razón, en el presente trabajo se aislaron, purificaron y caracterizaron las fosfolipasas A2 del veneno de *C. d. cumanensis* para evaluar *in vitro* su actividad antitumoral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Venenos, productos químicos y reactivos

A partir de especímenes mantenidos en el Serpentario de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) e incluidos en la colección COLBIOFAR 149 registrada ante el Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, se obtuvieron los venenos de *C. d. cumanensis* por ordeño manual de 25 ejemplares de diferentes localidades de Colombia, de los departamentos del Meta, Tolima, Cundinamarca y Magdalena. Una vez extraídos, los venenos se centrifugaron (3.000 rpm, 15 minutos), y los sobrenadantes resultantes se liofilizaron y almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **Aislamiento y caracterización de proteínas de los venenos**

La fosfolipasas A2 de cascabel fue purificada a partir del veneno crudo de *C. d. cumanensis* mediante cromatografía de exclusión molecular, en un sistema de cromatografía BioRad (modelo Econo). Para esta purificación, se emplearon 100 mg de veneno de cascabel disueltos en solución tampón fosfato salino (PBS), con pH 7,2, que fueron separados inicialmente con una columna equilibrada de Sephacryl S-200 (1,0 m x 2,6 cm) a un flujo de 1,0 ml/minuto y verificando la salida de proteínas a una lectura de 280 nm. Una vez obtenidas las fracciones, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La fosfolipasa A2 (crotoxina B) se purificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography, *RP-HPLC*) en una columna C-18 (5 poro  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm marca Restek Bellefonte, Pensilvania, USA); y las fosfolipasas A2 se eluyeron en un gradiente lineal (0-100 %) de acetonitrilo (v/v) en 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético a un flujo 1,0 ml/minuto.

## **Electroforesis y determinación de la masa molecular**

Los venenos de *C. d. cumanensis* y *B. asper* y las proteínas de cada una de las fracciones obtenidas

se separaron bajo condiciones no reductoras por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12 % (18) y tinción con azul de Coomassie brillante G-250. La masa molecular de cada pico se estimó según marcadores (rango: 97,4 a 14,4 kDa, BioRad, Philadelphia, PA, USA) y se confirmó por infusión directa en un espectrómetro de masas por electrospray ESI (espectrómetro IonTrap®, series 6310, Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). La masa molecular se dedujo por deconvolution empleando el software ChemStation V (Agilent Technologies, USA).

**Identificación de proteínas por HPLC-nESI-MS/MS**  
Las proteínas aisladas mediante RP-HPLC de las fracción II de *C. d. cumanensis* fueron alquiladas, reducidas y digeridas con tripsina 0,1 ng (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a 30 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, los productos de la digestión se inyectaron en un sistema LC/MS/MS® (1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) en una nanocolumna C-18 (Agilent Zorbax 300SB-C18®, 150 x 0,075 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) a un flujo de 0,2  $\mu\text{l}$ /minuto y acoplada a un espectrómetro de masas MSD IonTrap® (series 6310, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Los espectros de masas MS/MS se obtuvieron bajos las siguientes condiciones: modo positivo, rango dinámico de 200 a 1.200 Da; electrospray en 2 kV, 230 °C de temperatura de secado

y la trampa de accionamiento a 200  $\mu$ s. Para la deconvolution de los espectros MS/MS en estado cargado, se utilizó el programa ChemStation G2070-91126 (Agilent Technologies, USA).

### **Búsqueda en base de datos**

Los espectros resultantes fueron procesados por deconvolution y analizados con ayuda del programa Spectrum Mill (Agilent Technology) en la base de datos NCBIInr y frente a Mascot online (MatrixScience). Se indicó la digestión con tripsina, señalando la carbamidometilación (C) como modificación fija, y carbamilo (C), carbamilo (N-terminal), carboximetilación (C), oxidación (HW) y oxidación (M), como modificaciones variables.

El puntaje mínimo para la intensidad de cada pico fue del 50 %, masas monoisotópicas, tolerancia de las masas de 2,5 Da y en un modo de búsqueda de identidad. Los diferentes péptidos se confirmaron mediante la selección de Require bold red.

Búsqueda en BLAST de los péptidos identificados  
Los péptidos identificados fueron sometidos a una búsqueda mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) para determinar la homología con otras proteínas.

### **Hemólisis indirecta**

Método de gel de agarosa. La hemólisis indirecta se evaluó utilizando geles de agarosa que contenían glóbulos rojos y yema de huevo como sustrato (19,20), y asumiendo la mínima dosis hemolítica indirecta (MIHD), como la dosis de veneno que produce un halo hemolítico de 20 mm de diámetro en un tiempo de 20 horas. Como control negativo se utilizó solución tampón PBS con pH 7,2.

Hemólisis en suspensión. Se incubaron diferentes dosis del veneno de *C. d. cumanensis*, de las fracciones I y II y de la fosfolipasas A2 (crotoxina B), con glóbulos rojos humanos frescos durante 30 minutos a 37 °C en presencia de 250  $\mu$ l de suero humano inactivado, plasma humano inactivado, yema de huevo o PBS. Pasado este tiempo, se centrifugaron y se determinó el porcentaje de lisis por la liberación de hemoglobina, mediante registro de la absorbancia a 540 nm, utilizando como control de hemólisis se utilizó Triton X-100 al 2 %.

### **Actividad citotóxica**

Las células mononucleares humanas de sangre periférica se separaron por centrifugación (400g, 30 minutos) en Histopaque 1077® (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), lavadas con solución tampón PBS y se transfirieron a placas de 96 pozos a una concentración de 3,0 x 10<sup>5</sup> células/pozo, y K562 (ATCC CCL 243) a una concentración de 3,0 x 10<sup>5</sup>

células/pozo. Luego, se incubaron con diferentes concentraciones del veneno de *C. d. cumanensis* o de algunas de sus fracciones componentes (fracciones I y II y crotoxina B), y se cultivaron (37 °C; 5 % de CO<sub>2</sub>, 2% de suero fetal bovino) (SFB) por espacio de 24 horas. Pasado este tiempo, se añadieron 40 µl de MTT y se incubaron por tres horas en condiciones iguales a las descritas. La reacción se detuvo por la adición de 130 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y se hicieron las lecturas en un lector de microplacas a 420 nm y se calculó la dosis citotóxica 50 % mediante regresión lineal (21).

### **Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de la media de tres repeticiones experimentales, y las diferencias entre las medias se determinaron mediante análisis de varianza, seguido de la prueba de Dunnett para establecer comparaciones entre grupos y diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Aislamiento de fracciones y de la fosfolipasa A2 del veneno de *C. d. cumanensis***

Se obtuvieron, por cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200, cuatro fracciones principales que, una vez evaluadas para actividad de fosfolipasas A2, mostraron que la fracción II

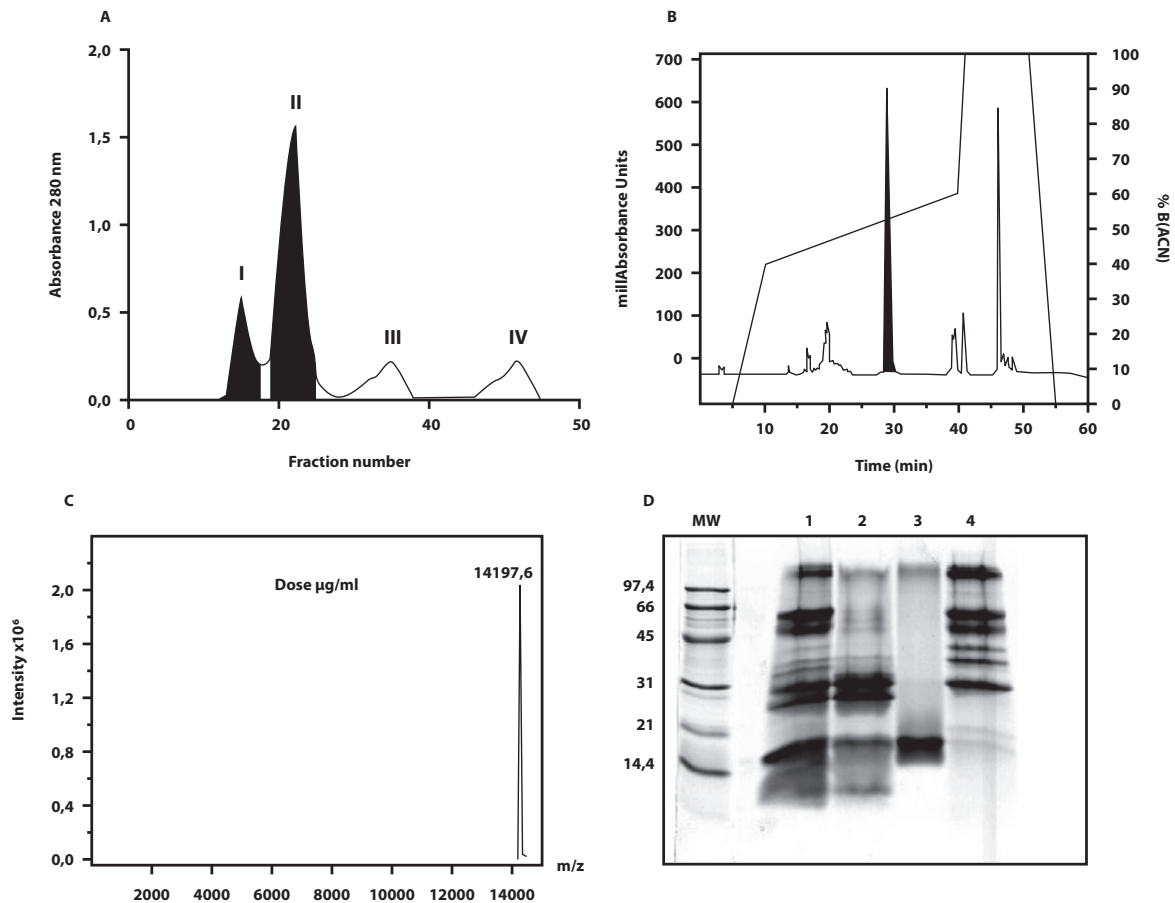
fue la única con dicho efecto (figura 1A). La separación de esta por HPLC en una columna C18, evidenció la presencia de 10 subfracciones y, de ellas, la subfracción IV presentó actividad de fosfolipasa A2 (figura 1B).

### **Electroforesis y masa molecular**

La electroforesis del veneno de *C. d. cumanensis* mostró las fracciones I y II, y la crotoxina B; la fracción 1 (carril 4) posee proteínas con pesos moleculares entre los 25 y los 80 kDa, mientras que la fracción II (carril 2) presenta bandas con pesos moleculares en el rango de 21 a 14 kDa. El paso por la columna C-18 por RP-HPLC, mostró una sola banda que corresponde a la crotoxina B (figura 1D, carril 3), cuya masa molecular es de 14.197,6 Da (figura 1C).



**Figura 1.** Aislamiento y purificación de la crotoxina B. A. Perfil cromatográfico de elución en Sephacryl S-200 a 280 nm del veneno de *C. d. cumanensis*: las áreas sombreadas corresponden a las fracciones utilizadas. B. Perfil cromatográfico de elución por RP-HPLC en una columna C-18 a 280 nm de la fracción II del veneno de *C. d. cumanensis*: el área sombreada corresponde a la crotoxina B. C. Espectro de masas y resultado de la deconvolution de las masas de la crotoxina B aislada del veneno de *C. d. cumanensis*. D. Electroforesis en SDS-PAGE al 12 % bajo condiciones no desnaturalizantes: MW marcador de peso molecular; carril 1, veneno total; carril 2, fracción II; carril 3, crotoxina B, y carril 4, fracción I.



### Identificación de proteínas

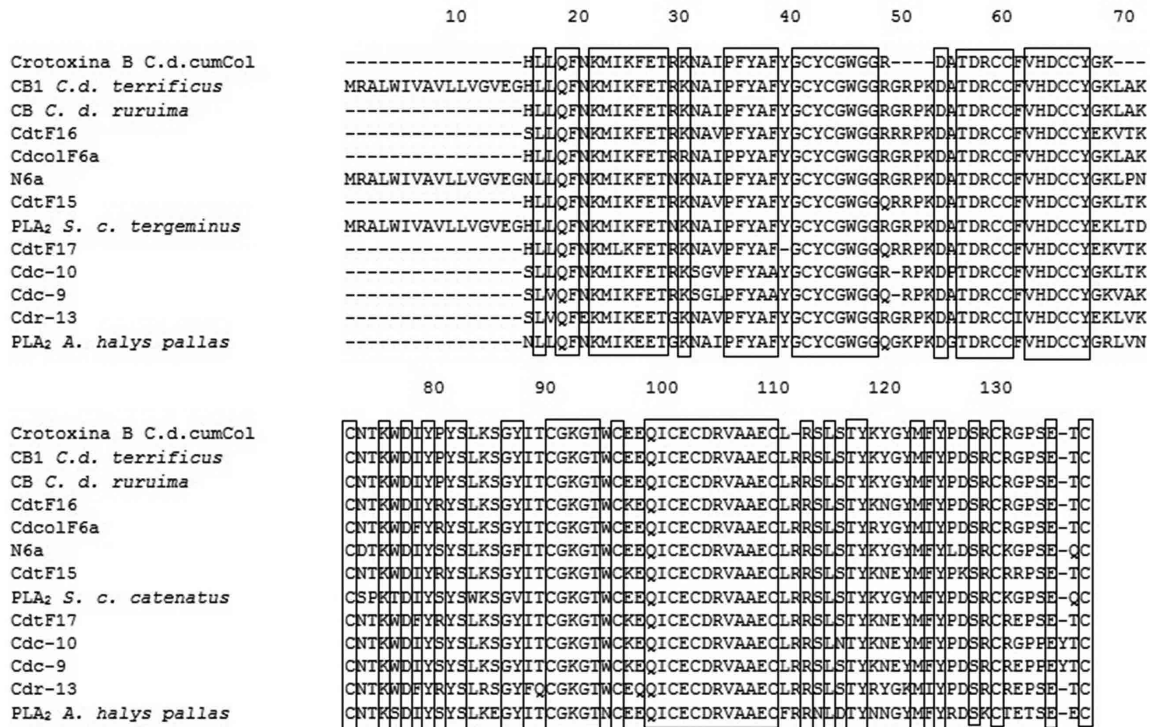
El análisis de masas en tándem MS/MS permitió identificar los siguientes péptidos de la subfracción IV aislada por RP-HPLC: HLLQFNK, MIKFETR KNAIPFYAFYGCYCGWGGR, DATDR, CCFVHDCCYGK, CNTKWDIYPYSLK, SGYITCGK, GTWCEEQICECDR, VAAECLR, SLSTYK, YGYMFYPDSR, CRGPSETC

(tabla 1). Su análisis demuestra que la fosfolipasa A2 aislada corresponde a la crotoxina B de *C. d. terrificus*, con una similitud del 100 % (22). Además, los péptidos identificados se sometieron a alineamiento en el programa Clustal, para determinar su porcentaje de homología con otras fosfolipasas A2 (figura 2).

**Tabla 1.** Identidad de la crotoxina B aislada por RP-HPLC de la fracción II del veneno de *C. d. cumnensis*: masa molecular determinada por nESI; masa monoisotópica de los péptidos y su carga, y secuencias determinadas por MS/MS en tándem.

MH <sup>+</sup> (MONOISOTOPIC Mass)	MS/MS-DERIVED SEQUENCE	DATA BASE ID	SPECIE	Z	SCORE		REFERENCE
					SPECTRUM MILL	MASCOT	
899.70	HLLQFNK	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	1 <sup>+</sup>		40	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
463.18	MIKFETR	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	2 <sup>+</sup>		49	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
2287.02	KNAIPFYAFYGCYCGWGGR	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	3 <sup>+</sup>	17,53	55	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
577.34	DATDR	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	1 <sup>+</sup>		45	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
1505.54	CCFVHDCCYGK	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	2 <sup>+</sup>	11,72	47	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
1687.82	CNTKWDIYPYSLK	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	3 <sup>+</sup>	17,5	43	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
443.51	SGYITCGK	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	2 <sup>+</sup>		42	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
1742.66	GTWCEEQICECDR	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	2 <sup>+</sup>	16,63	46	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
409.99	VAAECLR	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	2 <sup>+</sup>		45	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
698.60	SLSTYK	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	1 <sup>+</sup>		22	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
1298.55	YGYMFYPDSR	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	2 <sup>+</sup>	10,39	62	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008
483.73	CRGPSETC	2QOG_B	<i>C.d. terrificus</i>	2 <sup>+</sup>		80	Marchi-Salvdor, D.P., et al 2008

**Figura 2.** Alineamiento de la crotoxina B de *C. d. cumanensis* de Colombia. Los recuadros representan los aminoácidos conservados: CB1 *C. d. terrificus* número de acceso SP|P62022.1; crotoxina B *C. d. ruruima* número de acceso SP|P86169.1; CdtF16 *C. d. terrificus* número de acceso SP|POCAS6.1; Cdc01F6a *C. d. collilineatus* número de acceso SP|POCAS2.1; N6a *S. c. tergeminus* número de acceso GB|AAR14164.1; CdtF15 *C. d. terrificus* número de acceso SP|POCAS5.1; fosfolipasas A2 *S. c. catenatus* número de acceso gb|ABY77918.1; CdtF17 *C. d. terrificus* número de acceso SP|POCAS7.1; Cdc-10 *C. d. cumanensis* número de acceso SP|P86806.1; Cdc-9 *C. d. cumanensis* número de acceso SP|P86805.1; Cdr13 *C. d. ruruima* número de acceso SP|POCAS4.1; y, PLA2A. *halys pallas* número de acceso PDB|1BJJ\_A.

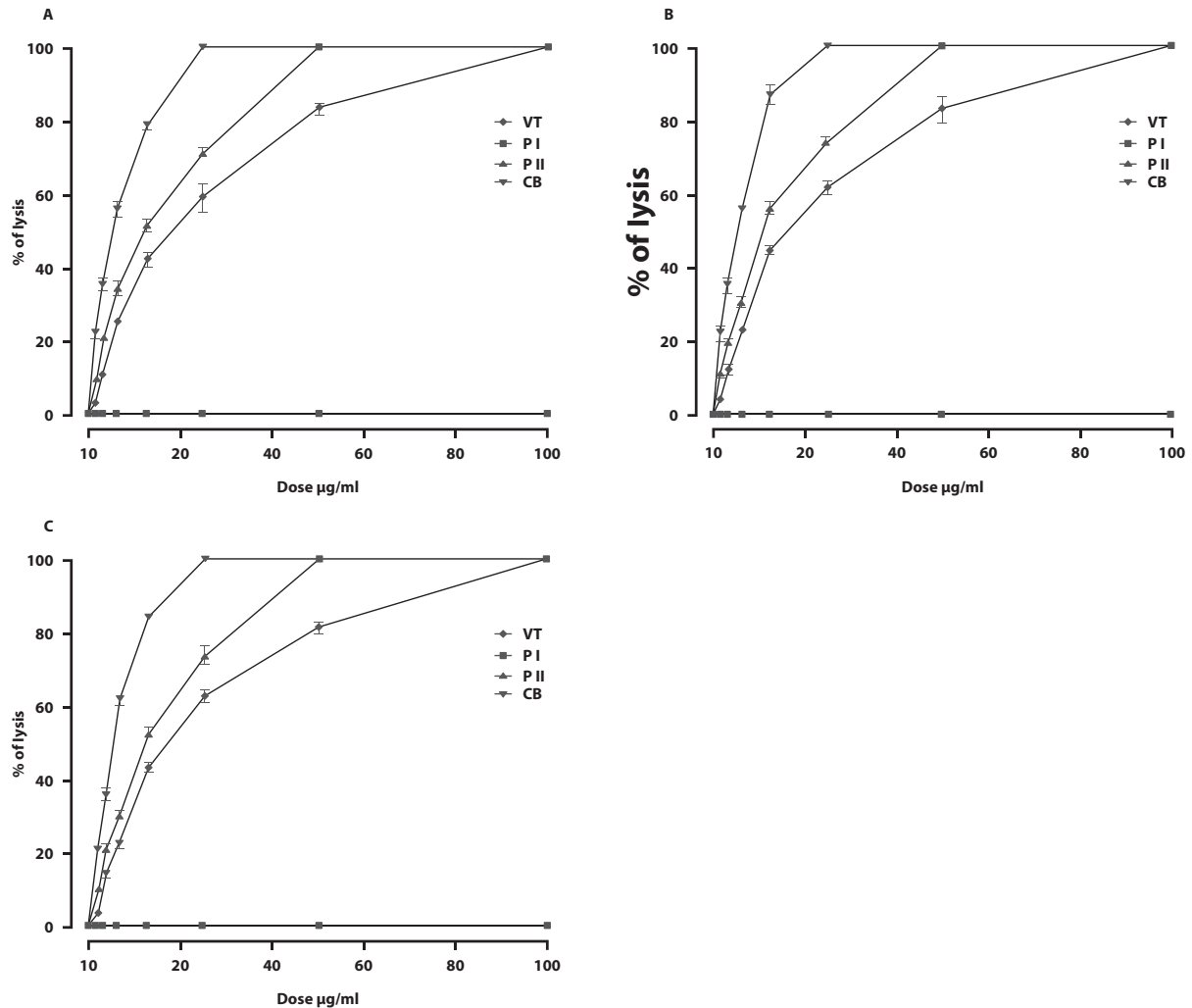


## Hemólisis indirecta

Método de gel de agarosa. La fracción II (complejo crotoxina) presentó una dosis hemolítica indirecta mínima (DHIm) de 25  $\mu\text{g}$ , la fracción I no presentó tal actividad y, con la crotoxina B, dicha dosis fue de 12,25  $\mu\text{g}$ .

Hemólisis en suspensión. La prueba de hemólisis con diferentes sustratos demostró que el efecto de lisis proteolítica es independiente del sustrato utilizado (yema de huevo, plasma o suero humano); sin embargo, para obtener un 100 % de lisis proteolítica en todos los casos, se necesitaron 25  $\mu\text{g/ml}$  de crotoxina B, resultando así, en una concentración menor con respecto al veneno total y la fracción II (figura 3).

**Figura 3.** Actividad hemolítica indirecta en suspensión. A. Lisis proteolítica utilizando como sustrato yema de huevo. B. Lisis proteolítica utilizando como sustrato plasma humano inactivado. C. Lisis proteolítica utilizando como sustrato suero humano inactivado.

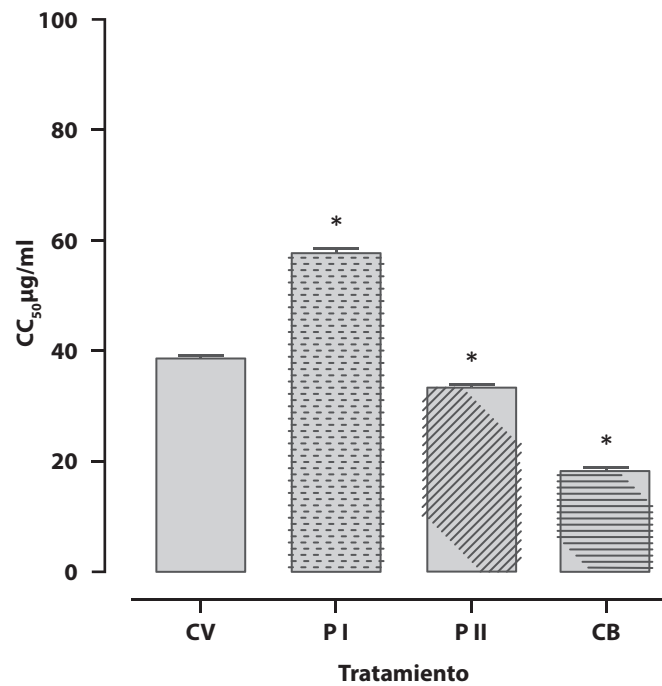


VT: veneno total de *C. d. cumanensis*; P I: fracción I; P II: fracción II; CB: crotoxina B

### Actividad citotóxica

El efecto citotóxico sobre las células mononucleares de sangre periférica inducido por el veneno de *C. d. cumanensis*, por la fracción II y por la crotoxina B, fue de  $38,59 \pm 0,57$ ,  $33,60 \pm 1,09$  y  $18,23 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente (figura 4).

**Figura 4.** Medias de la dosis citotóxica 50 (CC50) sobre las células mononucleares de sangre periférica

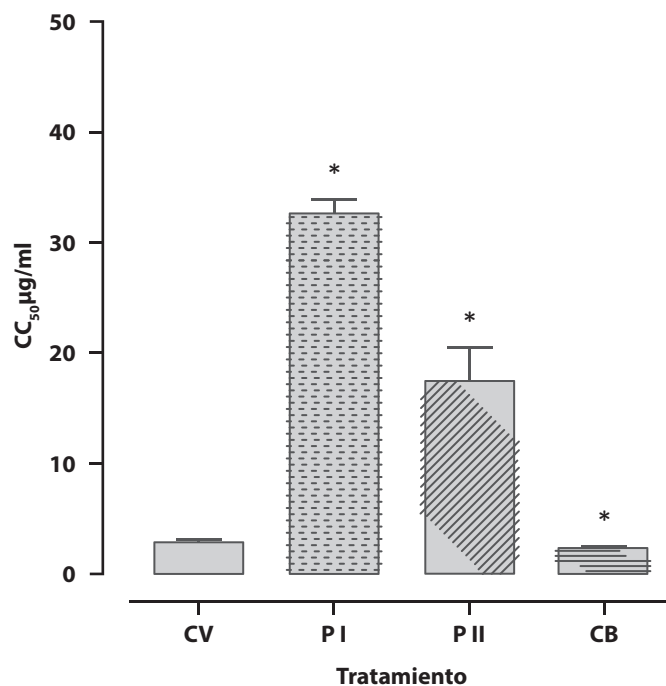


CV: *Crotalus*, veneno; PI: fracción I; PII: fracción II; CB: crotoxina B

\* Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,001$ )

La dosis citotóxica 50 (CC50) para las células K562 del veneno de *C. d. cumanensis*, de la fracción I, de la fracción II y de la crotoxina B fue de  $2,76 \pm 0,217$ ,  $33,20 \pm 1,27$ ,  $19,34 \pm 3,03$  y  $2,34 \pm 0,199 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente (figura 5).

**Figura 5.** Medias de la dosis citotóxica 50 (CC50) para las células K562

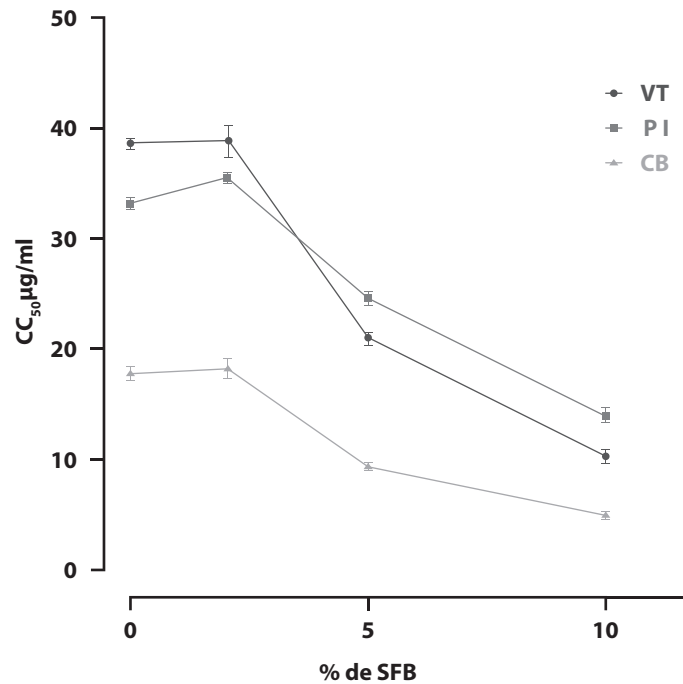


CV: *Crotalus*, veneno; PI: fracción I; PII: fracción II; CB: crotoxina B

\* Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

El uso de concentraciones al 2, 5 y 10 % de suero fetal bovino (SFB) en los cultivos de células mononucleares de sangre periférica y células K562, demostró que la concentración es inversamente proporcional a la dosis citotóxica 50 (CC50) (figura 6).

**Figura 6.** Dosis citotóxica 50 (CC50) para las células mononucleares de sangre periférica



VT: veneno total, fracción II; CB: crotoquina B

\* Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) entre las diferentes dosis utilizadas de suero fetal bovino.



## DISCUSIÓN

Los venenos de serpientes son una compleja mezcla de proteínas que ocasionan diversos signos y síntomas, y en algunos casos pueden conducir a la muerte, la cual puede deberse a su neurotoxicidad, como en el caso de *C. d. cumanensis* (cascabel) (23-26).

Las fosfolipasas A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) conforman una superfamilia caracterizada por su capacidad para hidrolizar fosfolípidos, específicamente, la posición sn-2 del enlace éster, produciendo ácidos grasos y lisofosfolípidos. Las fosfolipasas A2 secretadas (sPLA2) tienen varias características en común: baja masa molecular (13-18 kDa), numerosos puentes disulfuro, residuos catalíticos histidilo y aspartilo y una región de unión a calcio (Ca<sup>2+</sup>) altamente conservada (11). Las fosfolipasas A2 de los venenos de serpientes exhiben una variedad de actividades fisiológicas, tales como miotoxicidad, neurotoxicidad, actividad anticoagulante, la actividad edematizante, cardiotoxicidad, actividad antibacteriana, efecto antiparasitario y actividad agregante de las plaquetas (4,12,13,27,28).

En este trabajo se aisló e identificó la crotoxina B del veneno de *C. d. cumanensis*. Esta fosfolipasa A2 hace parte del complejo crotoxina, formado por la crotoxina A (subunidad ácida) y la crotoxina B (subunidad básica) unidas de forma covalente

(29), y es responsable de la neurotoxicidad del veneno de las cascabeles suramericanas (30,31). El análisis de masas en tándem de la crotoxina B permitió identificar la crotoxina B la cual resultó ser homóloga con la crotoxina B1 aislada de *C. d. terrificus* PDB ID:P62022.1 (22) y con la crotoxina B aislada de *C. d. ruruima* PDB ID:P86169.1 (27). Sin embargo, las múltiples isoformas identificadas en el análisis proteómico, sugieren una gran diversidad de esta toxina dentro de una misma especie y con otras especies, como la observada en las diferentes isoformas aisladas de otras subespecies de *C. durissus* (32-34).

Se ha evaluado el efecto anticancerígeno de diversas toxinas y venenos ofídicos, como fuentes de nuevas moléculas en la lucha contra el cáncer (35-39). Además, la citotoxicidad de los venenos y las fosfolipasas A2 resulta ser un problema para su futuro uso biomédico. Sin embargo, en este trabajo se demostró que una línea tumoral resultó ser más sensible que las células sanas a la dosis citotóxica 50 (CC50), lo cual nos lleva a pensar en la posibilidad de una mayor selectividad sobre las células tumorales. Además de su citotoxicidad, el efecto anticancerígeno de estas toxinas podría estar relacionado con autofagia de las células tumorales (40). La escasa toxicidad y la ausencia de neurotoxicidad residual de la crotoxina B en estudios con animales, refuerzan su uso en seres humanos como ya ha sido previamente demostrado (35,36,41).

Varios autores han observado, en las células tumorales y los glóbulos rojos, que la citotoxicidad depende del suero (42). En el presente estudio, los mononucleares de sangre periférica aislados y la línea celular K562 se cultivaron con suero fetal bovino al 2, al 5 y al 10 % y, en todos los casos, la dosis citotóxica 50 de crotoxina B disminuía a medida que aumentaba la concentración del suero, lo cual demuestra una relación entre su actividad y la concentración del suero; sin embargo, con las fosfolipasas A2 inactivas se ha observado que la citotoxicidad no es mediada totalmente por el efecto enzimático y podría estar asociada con la región carboxi-terminal 115-129 de estas proteínas (43).

Finalmente, los resultados del presente estudio sugieren la posibilidad de utilizar las fosfolipasas A2 aisladas del veneno de *C. d. cumanensis*, como un posible recurso terapéutico para su aplicación en humanos.

## REFERENCIAS

1. Calderon LA, Sobrinho JC, Zaqueo KD, de Moura AA, Grabner AN, Mazzi MV, et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:203639.
2. Weinberg R. *The biology of cancer*. Second edition. EE.UU: Taylor and Francis Group; 2013. 960 p.
3. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol*. 2004;2:51-62.
4. Andriao-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Diaz C, Lomonte B, et al. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*. 2000;82:755-63.
5. Cecilio AB, Caldas S, Oliveira RA, Santos AS, Richardson M, Naumann GB, et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A(2) from snake venom and their antiviral activities against dengue virus. *Toxins*. 2013;5:1780-98.
6. Muller VD, Russo RR, Cintra AC, Sartim MA, Alves-Paiva RdeM, Figueiredo LT, et al. Crotoxin and phospholipases A(2) from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. *Toxicon*. 2012;59:507-15.

7. Murillo LA, Lan CY, Agabian NM, Larios S, Lomonte B. Fungicidal activity of a phospholipase-A2-derived synthetic peptide variant against *Candida albicans*. *Rev Esp Quimioter*. 2007;20:330-3.
8. Quintana JC, Chacón AM, Vargas L, Segura C, Gutiérrez JM, Alarcón JC. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and crotoxin B. *Acta Trop*. 2012;124:126-32.
9. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: Classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488:1-19.
10. Evangelista IL, Martins AM, Nascimento NR, Havt A, Evangelista JS, de Noroës TB, et al. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. *Toxicon*. 2010;55:1061-70.
11. Kini RM. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 2003;42:827-40.
12. Landucci EC, de Castro RC, Toyama M, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, et al. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:1289-94.
13. Barbosa PS, Martins AM, Havt A, Toyama DO, Evangelista JS, Ferreira DP, et al. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*. 2005;46:376-86.
14. Kini RM, Evans HJ. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. *J Biol Chem*. 1987;262:14402-7.
15. de Moura AA, Kayano AM, Oliveira GA, Setubal SS, Ribeiro JG, Barros NB, et al. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matto-grossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. *Biomed Res Int*. 2014;195356.
16. Nelson J, Barlow K, Beck DO, Berbert A, Eshenroder N, Francom L, et al. Synergistic effects of secretory phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* with cancer chemotherapeutic agents. *Biomed Res Int*. 2013;565287.
17. Samel M, Vija H, Kurvet I, Kunis-Beres K, Trummal K, Subbi J, et al. Interactions of PLA2-s from *Vipera lebetina*, *Vipera berus*

- berus and *Naja naja oxiana* venom with platelets, bacterial and cancer cells. *Toxins*. 2013;5:203-23.
18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
  19. Gutiérrez JM, Ávila C, Rojas E, Cerdas L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 1988;26:411-3.
  20. Habermann E, Hardt KL. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analyt Biochem*. 1972;50:1963-5.
  21. Lomonte B, Gutiérrez JM, Romero M, Nunez J, Tarkowski A, Hanson LA. An MTT-based method for the in vivo quantification of myotoxic activity of snake venoms and its neutralization by antibodies. *J Immunol Methods*. 1993;161:231-7.
  22. Bouchier C, Ducancel F, Guignery-Frelat G, Bon C, Boulain JC, Menez A. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the two subunits of Crotoxin. *Nucleic Acid Res*. 1988;16:9050.
  23. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*. 1985;23:631-6.
  24. Cupo P, Azevedo-Marques MM, Hering SE. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82:924-9.
  25. Martins AM, Toyama MH, Havt A, Novello JC, Marangoni S, Fonteles MC, et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon*. 2002;40:1165-71.
  26. Oshima-Franco Y, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. *Toxicon*. 1999;37:1341-57.
  27. Costa AF, Dantas RT, Toyama MH, Diz Filho E, Zara FJ, Rodrigues MG, et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon*. 2010;55:795-804.

28. Murakami MT, Arruda EZ, Melo PA, Martínez AB, Calil-Elias S, Tomaz MA, et al. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. *J Mol Biol.* 2005;350:416-26.
29. Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric beta-neurotoxin. *J Mol Biol.* 2011;412:176-91.
30. Faure G, Bon C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon.* 1987;25:229-34.
31. Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:1560-3.
32. Fagundes FH, Oliveira M, Huancahuire-Vega S, Romero-Vargas FF, Ponce-Soto LA, Marangoni S. cDNA and deduced primary structure of basic phospholipase A2 with neurotoxic activity from the venom secretion of the *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43:262-70.
33. Ponce-Soto LA, Baldasso PA, Romero-Vargas FF, Winck FV, Novello JC, Marangoni S. Biochemical, pharmacological and structural characterization of two PLA2 isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* snake venom. *Protein J.* 2007;26:39-49.
34. Ponce-Soto LA, Lomonte B, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Biological and structural characterization of crotoxin and new isoform of crotoxin B PLA(2) (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom. *Protein J.* 2007;26:221-30.
35. Costa LA, Miles H, Araujo CE, González S, Villarrubia VG. Tumor regression of advanced carcinomas following intra- and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: Preliminary report of two cases. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1998;20:15-25.
36. Costa LA, Miles HA, Diez RA, Araujo CE, Coni CM, Cervellino JC. Phase I study of VRCTC-310, a purified phospholipase A2 purified from snake venom, in patients with refractory cancer: Safety and pharmacokinetic data. *Anticancer Drugs.* 1997;8:829-34.
37. Finn R. Snake venom protein paralyzes cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:261-2.

38. He JK, Wu XS, Wang Y, Han R, Qin ZH, Xie Y. Growth inhibitory effects and molecular mechanisms of crotoxin treatment in esophageal Eca-109 cells and transplanted tumors in nude mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34:295-300.
39. Kim DS, Jang YJ, Jeon OH, Kim DS. Saxatilin, a snake venom disintegrin, suppresses TNF- $\alpha$ -induced ovarian cancer cell invasion. *J Biochem Mol Biol.* 2007;40:290-4.
40. Yan CH, Yang YP, Qin ZH, Gu ZL, Reid P, Liang ZQ. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28:540-8.
41. Newman RA, Vidal JC, Viskatis LJ, Johnson J, Etcheverry MA. VRCTC-310--a novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. *Invest New Drugs.* 1993;11:151-9.
42. Vadas P. Group II phospholipases A2 are indirectly cytolytic in the presence of exogenous phospholipid. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1346:193-7.
43. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* 2003;42:885-901.



Este obra está bajo una licencia de Creative Commons  
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional