



Biotempo (Lima)

<https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo>

latindex
catálogo



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

COAGULANT AND PHOSPHOLIPASE A2 ACTIVITY OF THE SEA ANEMONE *PHYMANTHEA PLUVIA* (DRAYTON, 1846) AND THE TARANTULA *GRAMMOSTOLA ROSEA* (WALCKENAER, 1837) VENOMS

ACTIVIDAD COAGULANTE Y DE FOSFOLIPASA A2 DE LOS VENENOS DE LA ANÉMONA DE MAR *PHYMANTHEA PLUVIA* (DRAYTON, 1846) Y DE LA TARÁNTULA *GRAMMOSTOLA ROSEA* (WALCKENAER, 1837)

Nathalie Mariel Yafac-Piedra¹ & Fred Garcia-Alayo^{1,*}

¹ Laboratorio de Química. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.

E-mail: nathalie.yafac@urp.edu.pe / fgarciaa@urp.edu.pe

* Corresponding author: fgarciaa@urp.edu.pe

ABSTRACT

The coagulant and phospholipase A2 activity of the sea anemone *Phymanthea pluvia* (Drayton, 1846) and tarantula *Grammostola rosea* (Walckenaer, 1837) venoms from San Bartolo and Matucana, Lima, Peru, respectively, have been studied. The sea anemone venom was obtained by hypotonic shock, while the tarantula venom was extracted from the chelicerae and was "diluted" in saline solution. Electrophoretic analysis of the soluble venom showed the presence of protein bands. The coagulant and phospholipase activities of both venoms were measured. Phospholipase activity was found showing a diffusion halo of 2.76 cm for *P. pluvia* and 3.35 cm for *G. rosea*. The coagulant activity, tested on human citrated plasma, gave a positive result for *P. pluvia*, coagulating the plasma in 10 min and 16 min for *G. rosea*. It is concluded that both the soluble venoms of *P. pluvia* and *G. rosea* have phospholipase and coagulant activity.

Keywords: coagulant – phospholipase – sea anemone – tarantula – venom

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el veneno de la anemona de mar *Phymanthea pluvia* (Drayton, 1846) y de la tarántula *Grammostola rosea* (Walckenaer, 1837) colectadas en San Bartolo y Matucana, Lima, Perú, respectivamente. El veneno de anemona de mar fue obtenido mediante shock hipotónico y el de la tarántula se extrajo de los quelíceros y fue "diluido" en solución salina. El análisis electroforético del veneno soluble mostró la presencia de bandas proteicas. Se midió la actividad coagulante y fosfolipásica de ambos venenos. Se encontró actividad fosfolipásica mostrando un halo de difusión de 2,76 cm para *P. pluvia* y 3,35 cm para *G. rosea*. La actividad coagulante, ensayada sobre plasma citratado humano dio resultado positivo en *P. pluvia* coagulando el plasma en 10 min y en 16 min para *G. rosea*. Se concluye que tanto el veneno soluble de *P. pluvia* como el de *G. rosea* tiene actividad fosfolipásica y coagulante.

Palabras clave: anémoma de mar – coagulante – fosfolipasa – tarántula – veneno

INTRODUCCIÓN

Los cnidarios son un filo que agrupa alrededor de 10.000 especies de animales relativamente simples, que viven exclusivamente en ambientes acuáticos, mayoritariamente marinos, y representan una promisoriosa fuente de potenciales fármacos. Los celenterados producen proteínas y péptidos biológicamente activos, incluidas toxinas formadoras de poros (citolisinas), fosfolipasas, inhibidores de proteinasas y neurotoxinas. Se han reportado que sus toxinas contienen propiedades antitumorales, anti parasítica, antimicrobiana y otras actividades debido a su poderosa acción membrano-lítica, y a la posibilidad de dirigir estas proteínas y péptidos hacia tejidos específicos (Córdoba-Chávez *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha reportado que el veneno de tarántulas contiene varios péptidos pequeños que pueden controlar las propiedades de activación de una amplia gama de canales iónicos con alta afinidad y especificidad siendo estos responsables de la coordinación y el control de muchas funciones corporales, como la transducción de señales en funciones sensoriales, contracciones del músculo liso y también sirven como sensores en la regulación del volumen (Polido *et al.*, 2019). También se sabe que venenos de estas especies poseen actividad coagulante, siendo así un tema de investigación con la esperanza de que puedan usarse como terapéutica biomédica (Gutiérrez *et al.*, 2016).

Las fosfolipasas A2 (FLA2) forman una familia de enzimas claves en el recambio de los fosfolípidos de membranas y en la generación de diversas sustancias bioactivas: lisofosfolípidos, ácidos grasos libres y mediadores lipídicos de la inflamación. Son responsables de la movilización de ácidos grasos poliinsaturados liberados desde la posición Sn2 de los glicerofosfolípidos, lo cual incluye el ácido araquidónico (AA). El metabolismo del ácido araquidónico puede seguir su metabolismo en múltiples e interrelacionadas rutas, promoviendo la generación y la liberación de una amplia variedad de sustancias biológicamente activas (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2002).

Los componentes de los venenos son toxinas de naturaleza proteica que suelen tener actividad sobre los canales iónicos, actividad antibacteriana, antimicótica, procoagulante, curarizante, anticancerígena y pueden actuar de forma diversa sobre el sistema inmune (D'Suze *et al.*, 2014). Los principales componentes de los venenos que presentan actividad coagulante son: (a) serinproteinasas que convierten el fibrinógeno en fibrina (denominadas enzimas 'tipo trombina'); (b) serinproteinasas que activan la protrombina; (c) metaloproteinasas dependientes de

zinc que activan la protrombina; (d) metaloproteinasas que activan el factor X de la cascada de coagulación; y (e) serinproteinasas que activan el factor V de la cascada de coagulación (Markland, 1998). La determinación de la actividad coagulante de los venenos se basa en la adición de soluciones de veneno a muestras de plasma que contienen citrato de sodio como anticoagulante (Gutiérrez *et al.*, 2016).

En el Perú solamente el veneno de *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) ha sido estudiado parcialmente (Quiroz-Garrido, 2005; Retuerto *et al.*, 2007; Landucci *et al.*, 2012) al igual que el de *Phymactis papillosa* (Lesson, 1830) (Cuya & Escobar, 2017), sin obtenerse más información sobre venenos en otras especies de anemonas disponibles en nuestro país.

El presente trabajo planteó como objetivo evaluar la actividad coagulante y de fosfolipasa A2 del veneno de la anémona de mar *Phymanthea pluvia* (Drayton, 1846) y de la tarántula *Grammostola rosea* (Walckenaer, 1837)

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Siete ejemplares de *P. pluvia* fueron recolectadas de la playa San Bartolo, Lima, Perú (12°23'29,4"S; 76°46'45,4"W). Los ejemplares colectados fueron colocados en un contenedor con agua de mar y trasladados inmediatamente al laboratorio.

El ejemplar *G. rosea* fue recolectado de Matucana, Lima, Perú (11°50'26,4"S; 76°22'43,1"W) poniéndola en un contenedor con sustrato de coco a 70% de humedad para evitar su estrés. Posteriormente, fue trasladada inmediatamente al laboratorio.

Extracción del veneno

Para la obtención del veneno de *P. pluvia*, siete ejemplares se sometieron por shock hipotónico, para lo cual, estos se colocaron en un beaker con 30 mL de agua destilada durante 60 min (Figura 1). Luego el material fue filtrado en papel Whatman 2,0 y posteriormente centrifugado a 12000 rpm por 30 min obteniéndose el veneno crudo soluble.

Para la obtención del veneno de *G. rosea*, el ejemplar fue adormecido con cloroformo para posteriormente extraer sus quelíceros. Luego, ambos quelíceros fueron diluidos con ayuda de un mortero en solución salina 0,9%. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm por 30 min obteniéndose el veneno crudo soluble.

Prueba rápida de Biuret

Se tomaron 100 μ l de cada veneno y se trasladó a un tubo eppendorf, se agregó 1 gota del reactivo de Biuret para evidenciar la presencia de proteínas. El viraje de color azul a violeta comprobó el resultado positivo para la presencia de proteínas.

Cuantificación de proteínas

Para estimar la cantidad de proteína en el veneno soluble, se utilizó tres concentraciones distintas del veneno agregando a cada uno de estos 1 mL de reactivo de Biuret. Se midió la absorbancia a 545 nm.

Electroforesis PAGE-SDS

Se preparó un gel de poliacrilamida al 15% siendo las muestras preparadas bajo condiciones reductoras. La corrida electroforética se realizó por 1 h a 100 voltios. Luego el gel fue tenido con azul brillante de Coomassie 0,1% por 20 min, para luego ser decolorado hasta evidenciar las bandas proteicas.

Prueba de actividad de la fosfolipasa A2

Se empleó el método de Habermann & Hardt (1972) que mide la formación de un halo claro producto de la

hidrólisis de la lecitina por la Fosfolipasa. Se preparó agar Mueller Hinton agregando emulsión de yema de huevo al 85% a una temperatura de 50°. Luego, se homogenizó la mezcla y se repartió en placas. Después de la gelificación se agregaron discos de difusión asépticos de 3mm de diámetro para luego adicionarle en ellos el veneno crudo, se utilizó agua destilada en una placa como control.

La placa control y las placas conteniendo veneno, se incubaron a 37°C por tiempos relativos de 5 h, 10 h y 18 h, midiéndose a continuación con un Vernier, el diámetro (mm) del halo. Para la evaluación de los resultados en placa se aplicó análisis de regresión lineal, considerándose como válidas aquellas concentraciones en donde el coeficiente de determinación R^2 sea igual o superior a 0,90.

Prueba de actividad coagulante

Se siguió el método descrito por Gutiérrez *et al.* (2016), usando plasma humano citratado, para ellos se extrajo sangre humana en un tubo con citrato de sodio al 3,2%, este se centrifugó por 10 min a 3500 rpm, obteniéndose la fracción sobrenadante correspondiente. Para los ensayos, se preincubó 0,2mL del plasma por 10 min a 37°C para posteriormente agregar 0,1mL del veneno e inmediatamente medir el tiempo en minutos en que coagula el plasma.



Figura 1. Extracción de veneno de *Phymanthea pluvia* por shock hipotónico.

Aspectos éticos

Los especímenes son especies de vida libre y no se encuentran en peligro de extinción. A ambos se les proporcionó un entorno adecuado, así como alimentación y cuidados para preservar su salud y bienestar. Los autores declaran que se cumplió con toda la normatividad ética del país.

RESULTADOS

Prueba rápida de Biuret

La prueba rápida con el reactivo de Biuret resultó ser positivo para el veneno de *G. rosea*, virando el color azul a violeta. En cambio, para *P. pluvia* no hubo viraje de color (Figura 2).

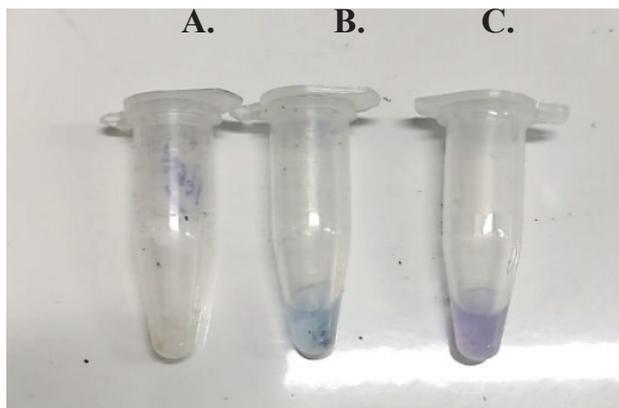


Figura 2. Prueba rápida de Biuret. **A.** Veneno soluble; **B.** Resultado negativo para *Phymanthea pluvia*; **C.** Resultado positivo para *Grammostola rosea*.

Cuantificación de proteínas

Tabla 1. Absorbancia (545nm) de concentraciones del veneno soluble de *Phymanthea pluvia* y *Grammostola rosea* utilizando como blanco el reactivo de Biuret.

	<i>Phymanthea pluvia</i>	<i>Grammostola rosea</i>
Concentración (%)	Absorbancia (Abs)	545nm
50	0,004	0,009
75	0,062	0,096
100	0,128	0,172

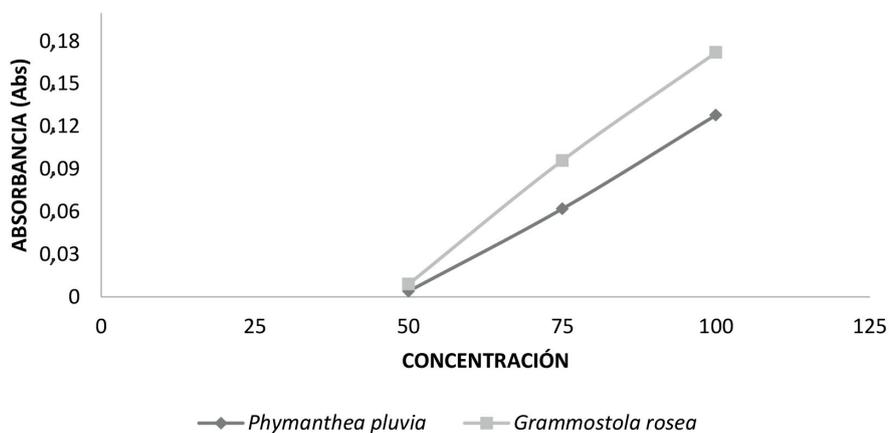


Figura 3. Perfil de cuantificación de proteínas del veneno soluble de *Phymanthea pluvia* y *Grammostola rosea* medido a 545 nm.

Electroforesis PAGE-SDS

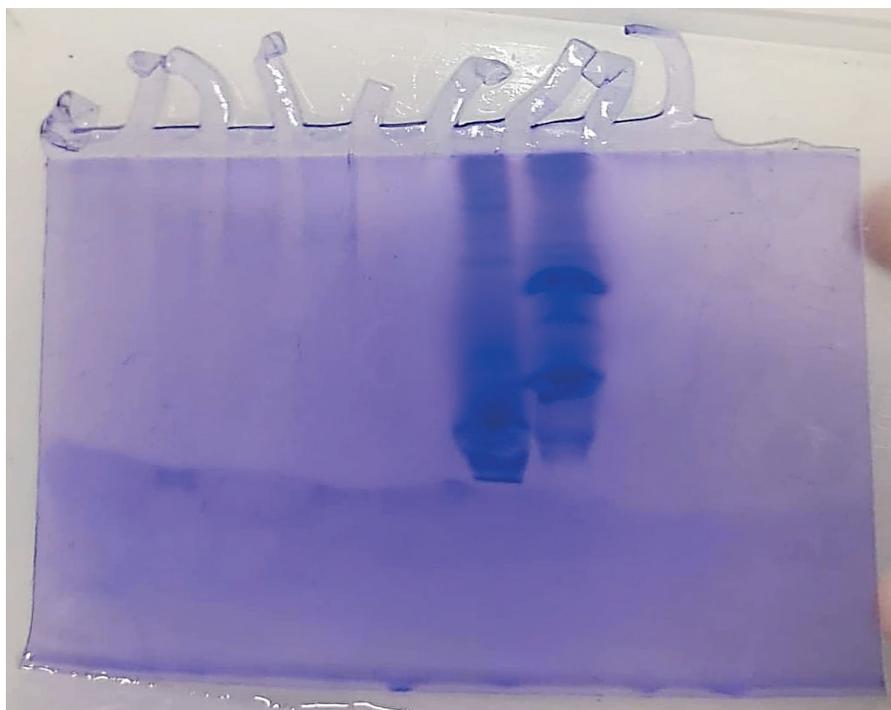


Figura 4. PAGE – SDS del veneno soluble de:
A. *Grammostola rosea*; **B.** *Phymanthea pluvia*. Observándose 5 y 4 bandas proteicas respectivamente

Prueba de actividad de la fosfolipasa A2

Se observó un aumento progresivo del halo de hidrólisis

hasta las 18 h. de incubación, midiendo un máximo de 6,01 cm y 5,04 cm para *P: pluvia* y *G. rosea* respectivamente.

Tabla 2. Mediciones del halo de hidrólisis de *Phymanthea pluvia* y *Grammostola rosea* en tiempos de incubación relativos.

Tiempo de incubación (h)	Halo de hidrólisis (cm)	
	<i>Phymanthea pluvia</i>	<i>Grammostola rosea</i>
5	1,33	1,44
10	2,76	3,35
18	6,01	5,04

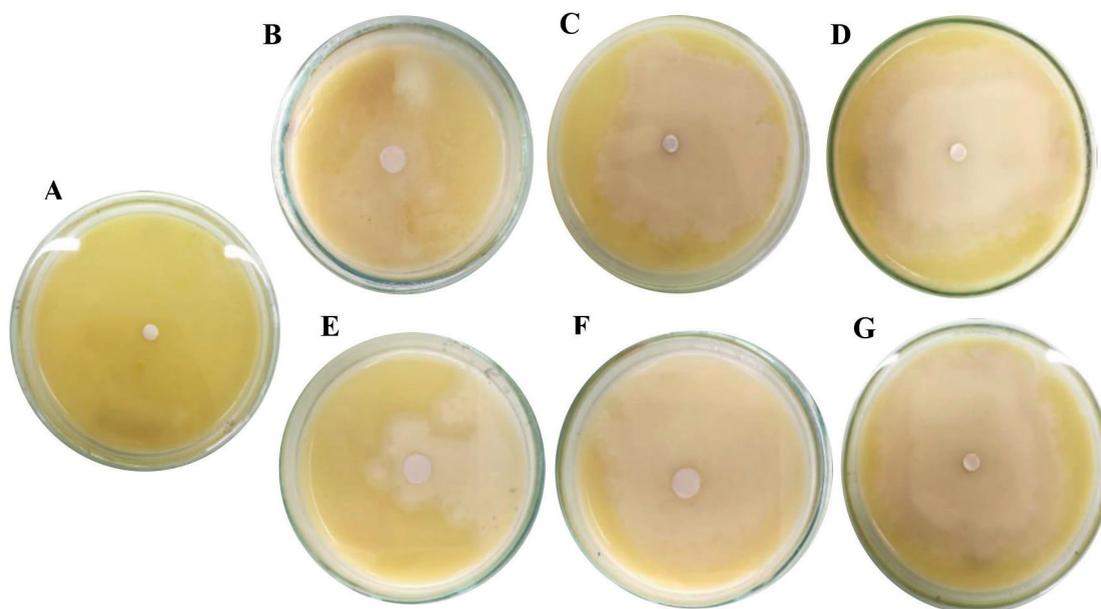


Figura 5. Halo de hidrolisis de la lecitina por acción de Fosfolipasa A2.
A. Control con agua destilada; **B.** 5 h, *Phymanthea pluvia*; **C.** 10, *P. pluvia*; **D.** 18 h *P. pluvia*;
E. 5 h, *Grammostola rosea*; **F.** 10 h, *G. rosea*; **G.** 18 h, *G. rosea*.

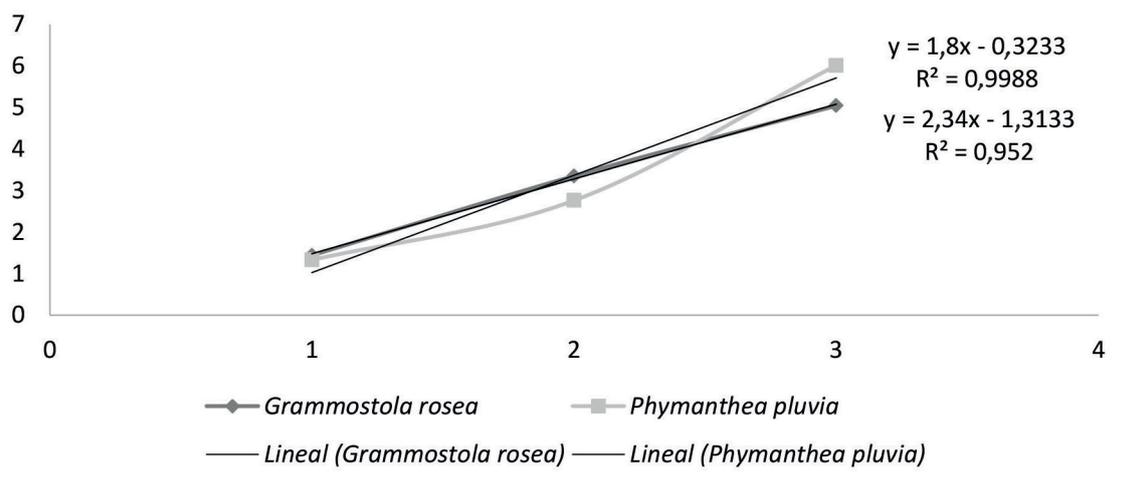


Figura 6. Curva de la actividad fosfolipásica A2 en *Grammostola rosea* y *Phymanthea pluvia* con análisis de regresión lineal ($R^2 \geq 0,90$).

Prueba de actividad coagulante

El veneno soluble de *P. pluvia* y *G. rosea* fue capaz de

coagular el plasma humano citratado en 10 min y 13 min respectivamente.

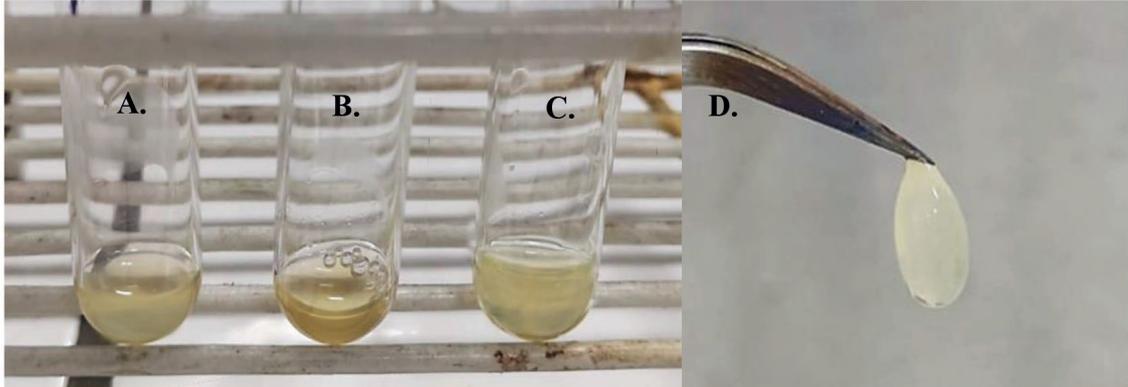


Figura 7. Pruebas de coagulación. **A.** Actividad coagulante positivo en *Grammostola rosea*; **B.** Plasma citratado; **C.** Actividad coagulante positivo en *Phymanthea pluvia*; **D.** Coagulo.

DISCUSIÓN

Cuya & Escobar (2017) obtuvieron el veneno de *P. papillosa* por shock hipotónico por 60 min, siendo luego filtrado y centrifugado. En esta investigación se siguió el mismo protocolo y se obtuvo el veneno soluble de la especie *P. pluvia*.

En la prueba rápida de Biuret, solo para *P. pluvia* resultó negativo esto puede deberse a que las cantidades de polipéptidos y proteínas sean muy mínimas y por ende la prueba de Biuret no logró ser efectiva.

Se conoce que en otros estudios se han determinado la actividad fosfolipásica mediante el método turbidimétrico de Marinetti (1965), utilizando una solución de yema de huevo al 2% en buffer Tris-HCl 50 mM, incubándolo y midiendo el tiempo de retraso de coagulación de la solución a 100 °C. En esta investigación se aplicó el método de Habermann & Hardt (1972) midiendo la formación del halo producto de la hidrólisis de la lecitina en placa con agar y yema de huevo. Se obtuvieron así mediciones de 3,03 cm como promedio para *P. pluvia* y, un promedio de 3,27 cm para *G. rosea*, con coeficiente de determinación (R^2) >0,90, lo cual permite considerar estos datos como válidos y corroborativos

Los péptidos y proteínas son los componentes más destacados de varias clases de toxinas de anemonas que han sido aisladas y caracterizadas. Béress (1982) determinó el rango de peso molecular de proteínas de anemona de mar,

siendo estas de 3 a 300 kDa. Entre estas se encontraron polipéptidos de bajo peso molecular (2-8 kDa) con actividad neurotóxica (Norton, 1991); polipéptidos con peso molecular entre 10 y 25 kDa teniendo estas enzimas como la hemolisina (Anderluh *et al.*, 2000) y proteínas con peso molecular entre 40 y 80 kDa con actividad fosfolipásica (Hessinger & Lenhoff, 1974; Grotendorst & Hessinger, 1999). Siguiendo estos patrones, Quiroz-Garrido (2005) obtuvo resultados de PAGE-SDS con bandas de 94 kDa a 14,4 kDa para la especie *A. chilensis*. Teniendo estos datos, es posible comparar los pesos moleculares con la especie *P. pluvia*, es por ello que se recomienda utilizar patrones y estándares moleculares para la determinación de los pesos moleculares.

Un estudio en *Grammostola rosea* (Walckenaer, 1837) por Laino *et al.* (2011), determinó proteínas de peso molecular 68 kDa y otras dos de 99 y 121 kDa, con una banda predominante de 93 kDa, y otra minoría de 249 kDa en una corrida electroforética; para el caso de *G. rosea* se obtuvieron cinco bandas proteicas las cuales se podría comparar con los resultados de este autor.

Gutiérrez *et al.* (2016) afirman que la dosis coagulante mínima puede expresarse como la cantidad absoluta de veneno, o bien como la concentración de veneno una vez agregado al plasma o al fibrinógeno. Se debe tener presente que la actividad coagulante de los venenos varía de acuerdo con la especie de origen del plasma (Suchyna *et al.*, 2000; Clement *et al.*, 2007). Por su relevancia clínica, recomienda utilizar plasma humano. En este caso,

se utilizó plasma humano con 3,2% de citrato de sodio, obteniéndose un tiempo de coagulación de 10 min del veneno de *P. pluvia* y 13 min del veneno de *G. rosea*.

De esta manera podemos corroborar la importancia de especies marinas como su diversidad, ya que estas no son actualmente estudiadas; al igual que especies de la familia de los Terafósidos y con sus propiedades coagulantes poder realizar estudios especializados en un futuro para la mejora de la calidad de vida humana.

El veneno de la anemona *P. pluvia* y de la tarántula *G. rosea* tienen actividad fosfolipásica y coagulante. *P. pluvia* causó una mayor hidrólisis a comparación de *G. rosea*, provocando un halo con un máximo de 6,01 cm. *G. rosea* obtuvo un tiempo mayor de coagulación siendo de 13 min y *P. pluvia* de 10 min. Se comprobó la presencia de proteínas en *P. pluvia* en la corrida de electroforesis PAGE – SDS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderlüh, G.; Podlessek, Z. & Macek, P. 2000. A common motif in propeptides of Cnidarian toxins and nematocyst collagens and its putative role. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1476: 372–376.
- Béress, L. 1982. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure and Applied Chemistry*, 54: 1981–1994.
- Cuya, A. & Escobar, E. 2017. Estudio bioquímico del veneno de la anémone de mar *Phymactis papillosa* (Actiniidae). *Revista peruana de biología*, 24: 303-310.
- Córdoba-Chávez, A.; Borbón-Alpizar, H.; Alvarado-Mesén, J.; Zamora-Rodríguez, M.; Soto-Fallas, R.M. & Abrego-Ramírez, D. 2017. Actividad hemolítica de la Anémone Marina *Aiptasia Pallida* (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 30: 97-105.
- Clement, H.; Odell, G.; Zamudio, F.Z.; Redaelli, E.; Wanke, E.; Alagón, A. & Possani, L.D. 2007. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the spider *Grammostola rosea* that blocks sodium channels. *Toxicon*, 50: 65-74.
- D'Suze, G., Castillo, C., Sevcik, C., Brazón, J., Malave, C., Hernandez, D., Zerpa, N., 2014. *Scorpionism and dangerous scorpion species in Venezuela*. En: *Springer Handbooks of Toxicology. Scorpion Venoms*. Gopalakrishnakone, P. (Ed). Springer Verlag: Heidelberg, Germany.
- Habermann, E. & Hardt, K.L. 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipase. *Analytical Biochemistry*, 50: 163-173.
- Hessinger, D. & Lenhoff, H.M. 1974. Degradation of red cell membrane phospholipids by sea anemone nematocyst venoms. *Toxicon*, 12: 379–383.
- Laino, A.; Cunningham, M.; Heras, H. & García, F. 2011. *In Vitro* lipid transfer between lipoproteins and midgut-diverticula in the spider *Polybetes pythagoricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 160: 181-186.
- Gutiérrez, J. M.; Rucavado, A.; Solano, G.; Lomonte, B.; Herrera, M.; Segura, Á. & León, G. 2016. *Estrategias y Avances en el estudio de toxinas de interés para la Biomedicina*. Puebla, México: Dirección Fomento Ed. 1: 19-40.
- Grotendorst, G. & Hessinger, D. 1999. Purification and partial characterization of the phospholipase A2 and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon*, 37: 1779-1796.
- Landucci, E.; Dias, Q.; Marangoni, F.; Vilca-Quispe, A.; Valeriano-Zapana, J.; Torres-Huaco, F.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S. & Ponce-Soto, L. 2012. Purification and inflammatory edema induced by two PLA2 (Anch TX-I and Anch TX-II) from sea anemone *Anthothoe chilensis* (Actiniaria: Sagartiidae). *Comparative Biochemistry & Physiology B Biochemistry & Molecular Biology*, 161: 170-177.
- Marinetti, G. 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 98: 554-565.
- Markland, F.S. 1988. *Fibrin(ogen)olytic enzymes from snake venoms*. In: Pirkle, H. & Markland Jr., F.S. (Eds.). *Hemostasis and Animal Venoms*. Marcel Dekker, New York, pp. 149-172.
- Norton, R.S. 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon*, 29: 1051-1084.

- Polido, G.; Shi, X.; Xu, D.; Guo, C.; Thai, R.; Patterson, J.P. & Holland, G.P. 2019. Investigating the interaction of *Grammostola rosea* venom peptides and model lipid bilayers with solid-state NMR and electron microscopy techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1861: 151-160.
- Quiroz-Garrido, Y.M. 2005. *Estudio de las toxinas de la anémona de mar Anthothoe chilensis (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae)*. Tesis EP Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/1404>
- Retuerto, F.; Arbaiza, E.; Quiroz-Garrido, Y.; Estrada, R. & Zavala, J. 2007. Actividad biológica del veneno de *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae). *Revista Peruana de Biología*, 14: 277-282.
- Suchyna, T. M.; Johnson, J.H.; Hamer, K.; Leykam, J.F.; Gage, D.A.; Clemo, H.F. & Sachs, F. 2000. Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *The Journal of general physiology*, 115: 583-598.
- Valdés-Rodríguez, Y.C.; Bilbao-Díaz, M.; León-Álvarez, J.L. & Merchán-González, F. 2002. Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Revista Cubana de Farmacia*, 36: 121-128.

Received August 30, 2020.

Accepted October 7, 2020.