



SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitéra de extractos vegetales

[SDS PAGE: a useful tool for preliminary screening of antisnake activity of plant extracts]

Francisco CAMARGO¹, Ana María TORRES¹, Gabriela RICCIARDI¹, Armando RICCIARDI¹, Eduardo DELLACASSA²

¹Universidad Nacional del Nordeste/Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes, Argentina.

²Universidad de la República/Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.

Contactos / Contacts: Gabriela RICCIARDI E-mail address: galricci@gigared.com

Abstract

Some results obtained during our research work in the search of anti-snake compounds from plant origin, allow us to propose sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as a valuable method for a fast and reliable screening in order to evaluate plant extracts activity on snake proteins from *Bothrops diporus* (yarára chica). Such approach will allow to process a larger number of plant extracts and to select the active ones.

Venoms used in this study came from *B. diporus* which was previously vacuum dried. Extracts (aqueous, alcoholic and hexanic) were from native plants: *Aristolochia elegans*, *Aristolochia gibertii*, *Asclepia curassavica*, *Cissampelos pareira*, *Dorstenia brasiliensis*, *Eclipta prostrata*, *Iresine diffusa*, *Mikania micrantha*, *M. periplocifolia*, *M. coridifolia*, *Nectandra angustifolia*, *N. megapotamica*, *Sapium haematospermum* and *Trixis divaricata*. The results obtained by SDS-PAGE were compared with those obtained from *in vitro* assays (coagulation and hemolysis inhibition). The correlation between results obtained from electroforetic and *in vitro* assays allowed to suggest SDS-PAGE as a suitable technique to assist in preliminary plant screenings for anti-snake activity by snake venom protein interaction with plant compounds.

Keywords: plant extracts; anti-snake activity; SDS-PAGE; *in vitro* assays; *Bothrops diporus*.

Resumen

El desarrollo de nuestro trabajo de investigación en la búsqueda de compuestos alexitéros de origen vegetal nos permite proponer la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, como método de screening rápido y confiable, para evaluar la actividad de extractos vegetales sobre proteínas del veneno de yarára, de manera de procesar mayor número de muestras vegetales y seleccionar aquellas que son activas. Para el desarrollo de la metodología, se utilizó un pool de veneno de *Bothrops diporus* desecado al vacío y extractos acuosos, alcohólicos y hexánicos de plantas autóctonas *Aristolochia elegans*, *A. gibertii*, *Asclepia curassavica*, *Cissampelos pareira*, *Dorstenia brasiliensis*, *Eclipta prostrata*, *Iresine diffusa*, *Mikania micrantha*, *M. periplocifolia*, *M. coridifolia*, *Nectandra angustifolia*, *N. megapotamica*, *Sapium haematospermum* y *Trixis divaricata*. Se realizaron pruebas *in vitro* (inhibición de la coagulación y hemólisis) para contrastar con los resultados obtenidos por SDS-PAGE. La correlación de los resultados obtenidos con técnicas *in vitro* validadas, permite sugerir el empleo de la técnica de SDS-PAGE como una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitéra de extractos vegetales, propiedad evidenciada por la modificación en el perfil de bandas proteicas cuando se compara el veneno puro con el producto de la interacción extracto vegetal-veneno.

Palabras Clave: extractos vegetales; actividad alexitéra; SDS-PAGE; pruebas *in vitro*; *Bothrops diporus*

Recibido | Received: 25 de Mayo de 2011.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 16 de Agosto de 2011.

Publicado en línea | Published online: 30 de Septiembre de 2011.

Declaración de intereses | Declaration of interests: A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE por el apoyo financiero del proyecto de investigación.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Francisco Camargo, Ana María Torres, Gabriela Ricciardi, Armando Ricciardi, Eduardo Dellacassa. 2011. SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitéra de extractos vegetales. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(5): 429 – 434.

Lista de abreviaciones: MCD- dosis coagulante mínima; TC- tiempo de coagulación normal; MHD- dosis hemolítica mínima; PM: peso molecular; ME- mercaptoetanol.

INTRODUCCIÓN

El estudio de plantas y/o compuestos con actividad alexitera en Argentina es de suma importancia ya que los accidentes ofídicos son un serio problema de Salud Pública, siendo las serpientes del género *Bothrops* las causantes del 97% de los mismos y específicamente *B. diporus* “yarára chica” del 80%. (Roques et al., 2007).

El veneno de esta especie posee acción proteolítica, coagulante y vasculotóxica y, hasta ahora, la única terapia existente frente a un accidente es la utilización del suero antiveneno obtenido por inmunización en caballos, lo cual no está exento de peligros (shock anafiláctico, hipertermia, enfermedad del suero entre otras), necesita condiciones de mantenimiento, administración por parte de personal idóneo, además de tener en cuenta que dicho antiveneno tiene baja efectividad sobre las acciones locales producidas por el veneno inmediatamente luego de la picadura (dolor, edema, hemorragia local y necrosis) (Makhija, 2010).

Existe además en la región, una fuerte tradición de uso, por parte de las comunidades indígenas de plantas para contrarrestar los efectos producidos por venenos animales (Jolis, 1789; Sánchez Labrador, 1910; Martínez Crovetto, 1970; Montenegro, 2007). Las plantas son maceradas y aplicadas sobre las heridas, en forma de cataplasmas, también como decocciones o bebidas alcohólicas para ser ingeridas o lavar el área afectada. Como ejemplo, Estes (1985), hace referencia a plantas utilizadas como tratamiento ya sea aplicadas sobre el sitio de la mordedura (hojas machacadas de *Dorstenia contrayerba* o *Cissampelos pareira*), ingestión del jugo de hojas secas y tallos (*Mikania guaco*) entre otras.

Aun en nuestros días, algunas comunidades practican la medicina tradicional para tratar una variedad de dolencias, utilizando ciertas plantas para el tratamiento de picaduras de serpientes venenosas. Para contrarrestar los efectos del veneno se suelen masticar hojas o cortezas, pero la práctica más difundida incluye la ingestión y el uso tópico de los extractos en la zona de la mordedura (Ricciardi, 2005). En este trabajo se propone el uso de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como un método rápido y confiable para predecir la interacción entre extractos vegetales y el veneno de *B. diporus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veneno

Se trabajó con veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) desecado y conservado a -20 °C de acuerdo a lo indicado por Otero et al. (2000a). En el momento de uso, el veneno se reconstituyó con solución fisiológica, expresando su concentración en términos de peso seco.

Material vegetal

Los ejemplares de las especies estudiadas fueron recolectados en la provincia de Corrientes (Argentina), guardando un ejemplar de cada uno de ellos en el herbario CTES, del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), entidad dependiente de la Universidad Nacional del Nordeste: *Aristolochia elegans* Mast. (Tressens et al., 7097), *Aristolochia gibertii* Hook. (Tressens et al., 6832), *Asclepias curassavica* L. (A.M. Torres 11), *Cissampelos pareira* L. (Tressens et al., 7092 y 6831), *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Tressens et al., 7093), *Eclipta prostrata* (L.) L. (M. Dematteis, 1912), *Iresine diffusa* Humb. & Bonp. ex Willd. var. *diffusa* (Tressens et al., 7099), *Mikania cordifolia* (L.f.) Willd. (Dematteis et al., 2461), *M. micrantha* Kunth. (Dematteis et al., 2462), *M. periplocifolia* Hook. et Arn. (M. Dematteis, 1911), *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees (Tressens et al., 7094), *N. megapotamica* (Spreng.) Mez (S.G.Tressens, G. Ricciardi, A.M.Torres, 7104), *Sapium haemospermum* Müll (Tressens et al., 7098) y *Trixis divaricata* (Kunth) Spreng. (M. Dematteis et al., 1908).

Las hojas, tallos y raíces de cada especie, se secaron por venteo a temperatura y humedad ambientes (20 - 30° C y 60 - 80% humedad), se molieron y tamizaron (tamiz 12) convenientemente para luego preparar los siguientes extractos:

- 1) **Extracto acuoso:** maceración durante 24 h. con agua destilada (10 g en 100 mL), filtrado y desecado en rotavapor hasta residuo sólido (Melo et al., 1994).
- 2) **Extracto alcohólico:** maceración durante 48 h. con etanol 96% (10 g en 100 mL), filtrado y desecado en rotavapor hasta residuo sólido (Otero et al., 2000b).
- 3) **Extracto hexánico:** maceración durante 48 h. con *n*-hexano (10 g en 100 mL), filtrado y desecado en rotavapor hasta residuo sólido.

Los extractos se conservaron en desecador al vacío hasta su uso, en que se reconstituyeron con el solvente correspondiente para preparar las soluciones de trabajo.

Electroforesis SDS-PAGE

Se siguió la técnica de Pilosof y Bartholomai (2000) para el gel de separación al 10% y de stacking al 4% (Buffers electrodo, pH 8,3; gel stacking, pH 6,8; gel, pH 8,8; muestra, pH 6,8), con el agregado de urea, para lograr mayor nitidez en la separación de las bandas, y de mercaptoetanol (ME) al final de la preparación y no a los buffers. Se utilizaron patrones de peso molecular bajo (PM): 94KDa, 67KDa, 43KDa, 30KDa, 20,1KDa, 14,4KDa, preparados según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

SOLUCIONES

Veneno patrón: a 1 mg veneno se agregaron 300 μ L de buffer muestra y 15 μ L de ME.

Extracto vegetal patrón: a 1,2 mg extracto se agregaron 50 μ L de buffer muestra y 2,5 μ L ME

Veneno más extracto: 1 mg veneno, en 40 μ L de solución fisiológica, se puso en contacto con una solución de 7 mg de extracto en 60 μ L de agua, alcohol o hexano de acuerdo a cada caso estudiado. Se incubó durante 30 minutos a 37° C; y luego se agregaron 100 μ L de buffer muestra y 10 μ L ME.

Todas las soluciones se calentaron a 100° C durante 5 minutos para producir la desnaturalización.

Patrón de siembra:

Calle 1: 5 μ L, patrones de PM

Calle 2: 5 μ L, patrón de veneno de yarará (16 μ g)

Calle 3: 3,5 μ L, veneno + extracto (1:7)

Calle 4: 5 μ L, extracto patrón (116 μ g) para observar que no existan bandas de proteínas vegetales que puedan dificultar la interpretación.

Se trabajó a intensidad de corriente constante de 15 mA por gel y la coloración se realizó con Coomassie blue R.

Inhibición de la actividad procoagulante del veneno

La medida de esta actividad se realizó mediante la técnica del plasma recalcificado con modificaciones a las técnicas de Theakston and Reid (1983), Gené et al (1989), Alam et al (1994) y Iovine y Selva (1985). Se añadieron 10 μ L de solución fisiológica para obtener el tiempo de coagulación (TC), 10 μ L de solución de veneno, para la dosis hemolítica mínima (DCM) y 10 μ L del sobrenadante del veneno con el extracto incubado a 37° C durante 30 minutos (relación 1:10) para cuantificar la capacidad del extracto de inhibir la actividad coagulante del veneno, a los 0,2 mL de plasma y 0,2 mL de CaCl₂ 0,025M. Los extractos que

fueron activos en este sentido, mostraron una prolongación del TC luego del agregado del extracto a la MCD. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se compararon las medias de la inhibición de los extractos mediante el LSD test ($p < 0,05$) y se consideraron activos aquellos que presentaron una inhibición media de al menos el 30% de la actividad del veneno.

Inhibición de la actividad hemolítica

La medida de esta actividad se realizó en placas de agar sangre-fosfatidilcolina según la técnica de Gutiérrez et al (1988) y Otero et al (1995). De esta forma se obtuvo la MHD sembrando el veneno y la capacidad de los extractos para inhibir las fosfolipasas del veneno sembrando el sobrenadante del veneno (MHD) preincubado con los extractos (relación 1:10) durante 30 minutos a 37° C. La actividad se midió por la disminución de los halos de hemólisis luego de incubar las placas 20 h a 37° C en cámara húmeda. Los ensayos se realizaron por triplicado. Para la evaluación estadística de los resultados, se hicieron las mismas consideraciones que para las medidas de la inhibición de la actividad procoagulante.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistica 7.1 (Stat Soft, Inc., Tulsa, UK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos demostraron que existe una fuerte correlación entre la actividad alexitera *in vitro* detectada por inhibición de la coagulación y de la hemólisis del veneno por los extractos de plantas estudiados, y las variaciones del perfil proteico del veneno de yarará detectadas por SDS-PAGE.

Con respecto a las actividades *in vitro*, en la Tabla 1 se muestran los extractos que son activos inhibiendo la coagulación o la hemólisis producida por el veneno de yarará chica.

Todos los perfiles electroforéticos coinciden con la actividad observada por estas técnicas. Para mostrar las correlaciones, se seleccionaron las imágenes de las electroforesis correspondientes a:

- extracto alcohólico de hojas y tallos de *C. pareira* que resultó activo para ambas actividades *in vitro* (Figura 1)
- extracto alcohólico de raíz de *A. elegans*, activo inhibiendo la actividad procoagulante del veneno (Figura 2)

-extracto alcohólico de hojas y tallos de *Trixis divaricata* que no presentó actividad (Figura 3).

Figura 1. SDS-PAGE *Cissampelos pareira*

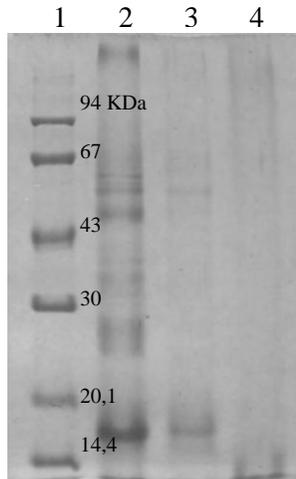


Figura 2. SDS-PAGE: *Aristolochia elegans*

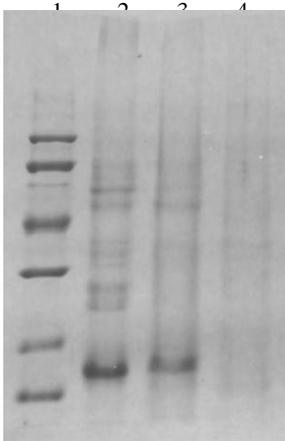
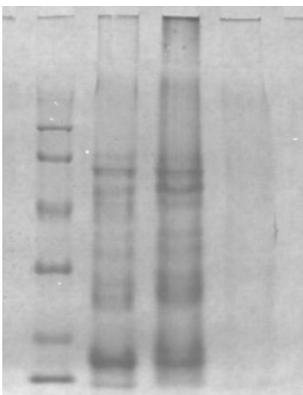


Figura 3. SDS-PAGE: *Trixis divaricata*



calle 1, patrones de PM, 2: patrón veneno de *B. diporus*, 3: veneno preincubado con extracto y 4: patrón de extracto

Los pesos moleculares fueron calculados utilizando la gráfica de la migración (en mm) en función del log del PM, teniendo en cuenta los patrones de PM conocidos utilizados. Para el perfil del veneno se encontraron 11 bandas con valores promedio para las bandas proteicas del veneno de yarará chica de 70,6 KDa, 64,8 KDa, 59,4 KDa, 52,3 KDa, 40,9 KDa, 38,2 KDa, 34,5 KDa, 29,1 KDa, 26,1 KDa, 18,9 KDa y 16,6 KDa, tomando como base la migración en todos los geles corridos.

Es evidente la desaparición de las bandas correspondientes a las fosfolipasas (18 kDa) en los extractos que inhiben la actividad hemolítica *in vitro*, así como la disminución de algunas otras bandas en los que inhiben la actividad coagulante: 52,3 kDa activadoras de protrombina; 29 kDa que puede corresponder a botroaltermina (lectina tipo C inhibidora de trombina) y botrocetina (coaglutinina de plaquetas).

Los extractos de *E. prostrata*, *N. angustifolia* y *C. pareira*, que evidenciaron ambas actividades fueron los que mayores diferencias aportaron entre el perfil del veneno y el de veneno: extracto preincubado. Puede observarse claramente que en la calle 3 de *A. elegans* hubo disminución de bandas en la zona de los 28 KDa mientras que las bandas de las fosfolipasas se mantuvieron con igual intensidad, lo que se condice con los resultados expresados en la Tabla 1. En el caso del extracto alcohólico de partes aéreas de *T. divaricata* no hubo disminución de ninguna banda del perfil proteico, por lo que es previsible que este extracto no tenga actividad *in vitro* siempre y cuando esta actividad esté mediada por una interacción con las proteínas del veneno.

CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos permiten afirmar que, para las especies ensayadas, la electroforesis SDS-PAGE provee una herramienta de gran ayuda en el screening rápido de la actividad alexitica de extractos de plantas, lo cual fue corroborado mediante ensayos *in vitro*. La observación de modificaciones en el perfil proteico del veneno de yarará, mediante la técnica SDS-PAGE, puede tomarse como un indicio fehaciente de la interacción entre el extracto vegetal y las proteínas del veneno. Este tipo de información permite predecir que se trata de un extracto con probabilidades de inhibición de alguna de las actividades del veneno, por lo que el resultado es indicativo de que el extracto debe ser estudiado con mayor detenimiento y con metodologías más específicas.

Tabla 1
Inhibición de actividades procoagulantes y hemolíticas por extractos

Especie	AP	AH	SP		Especie	AP	AH	SP
<i>Cissampelos pareira</i>					<i>Mikania micrantha</i>			
1	No	No	No		1	No	No	No
2	Si	Si	Si		2	Si	Si	Si
3	No	No	No		5	Si	Si	Si
4	No	No	No		3	No	No	No
<i>Aristolochia elegans</i>					4	No	No	No
1	No	No	No		6	No	No	No
2	No	No	No		<i>M. cordifolia</i>			
3	No	No	No		1	No	No	No
4	Si	No	Si		2	Si	Si	Si
<i>A. gibertii</i>					5	Si	No	Si
1	No	No	No		3	No	No	No
2	Si	No	Si		4	No	No	No
3	No	No	No		6	No	Si	Si
4	Si	No	Si		<i>M. periplocifolia</i>			
<i>Dorstenia brasiliensis</i>					1	No	No	No
1	No	No	No		2	Si	Si	Si
2	No	No	No		5	Si	No	Si
3	No	No	No		3	No	No	No
4	Si	No	Si		4	No	Si	Si
<i>Trixis divaricata</i>					6	No	Si	Si
1	No	No	No		<i>Nectandra angustifolia</i>			
2	No	No	No		1	No	No	No
3	No	No	No		2	Si	Si	Si
4	No	No	No		5	Si	Si	Si
5	Si	No	Si		<i>N. megapotamica</i>			
6	No	No	No		1	No	Si	Si
<i>Eclipta prostrata</i>					2	No	No	No
1	No	No	No		5	No	No	No
2	No	No	No		<i>Sapium haematospermum</i>			
5	Si	Si	Si		1	No	No	No
<i>Asclepia curassavica</i>					2	Si	No	Si
1	No	No	No		7	No	No	No
2	No	No	No		8	Si	No	Si
5	Si	No	Si					
<i>Iresine diffusa</i>								
1	No	No	No					
2	Si	No	Si					

AP: actividad procoagulante; AH: Actividad hemolítica; SP: SDS-PAGE (modificaciones del perfil del veneno);
 1: extracto acuoso de hojas; 2: extracto alcohólico de hojas; 3: extracto acuoso de raíz; 4: extracto alcohólico de raíz;
 5: extracto hexánico hojas; 6: extracto hexánico de raíz; 7: extracto acuoso de tallos; 8: extracto alcohólico de tallos

AGRADECIMIENTOS:

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE por el apoyo financiero del proyecto de investigación. A la Lic. Sara Tressens y el Dr. Massimiliano Dematteis del IBONE (Instituto de Botánica del Nordeste) por la identificación botánica de las especies vegetales.

BIBLIOGRAFÍA:

Alam MI, Auddy B, Gomes A. 1994. Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the Indian medicinal plant sarsaparilla (*Hemidesmus indicus*). *Toxicon* 32: 1551 - 1557.

- Esteso SC. 1985. **Ofidismo en la República Argentina**. Ed. ARPON.
- Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon** 27: 841 - 848.
- Gutiérrez JM, Avila C, Roms E, Cerdas L. 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon** 26: 411 - 413.
- Iovine E, Selva AA. 1985. **El Laboratorio en la Clínica. Metodología analítica, fisiopatología e interpretación semiológica**. 3ª Ed. Ed. Panamericana: 168 - 169.
- Jolis J. 1789. **Saggio sulla storia naturale della provincia del Gran Chaco e sulle pratiche, e su' costumi dei popoli che l'abitano**. Tomo 1. Ed. Faenza.
- Makhija IK, Khamar D. 2010. Anti-snake venom properties of medicinal plants. **Der Pharmacia. Lettre** 2: 399 - 411.
- Martínez Crovetto RN. 1970. La Etnobotánica de los grupos aborígenes del Nordeste Argentino. **Bol Soc Arg Bot** 11: 211 - 215.
- Melo P, Do Nascimento M, Mors W, Suarez Kurtz G. 1994. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** 32: 595 - 603.
- Montenegro P. 2007. **Materia Médica Misionera**. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Misiones.
- Otero R, Nuñez V, Osorio RG, Gutiérrez JM, Giraldo CA, Posada LE. 1995. Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapana equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). **Toxicon** 33: 809 - 815.
- Otero R, Nuñez V, Jiménez S, Fonnegra R, Osorio R, García M, Díaz A. 2000a. Snakebites and ethnobotany in the northwest región of Colombia Part. II Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **J Ethnopharmacol** 71: 505 - 524.
- Otero R, Fonnegra R, Jiménez S, Nuñez V, Evans N, Alzate S, García M, Saldarriaga M, Del Valle G, Osorio R, Díaz A, Valderram R, Duque A, Vélez H. 2000b. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part. I: Traditional use of plants. **J Ethnopharmacol** 71: 493 - 504.
- Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B. (Eds). 2000. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. CYTED-Eudeba, Universidad de Buenos Aires, pp. 159-166.
- Ricciardi AIA. 2005. **Plantas con tradición de uso como alexíteras en la medicina popular**. Curso de Actualización y Perfeccionamiento "Vegetales de importancia médica y Toxicológica. Control, Legislación y Fiscalización". Confederación Farmacéutica Argentina y Asociación Amigos del Museo de Farmacobotánica; Buenos Aires, Argentina.
- Roques L, Abriata G, Martínez D. 2007. Envenenamiento por animales ponzoñosos. **Bol Epidemiol Periódico** 9: 19.
- Sánchez Labrador J. 1910 - 1917 **El Paraguay católico**. Buenos Aires: Impr. Coni Hermanos.
- Theakston R, Reid H. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. **Bull WHO** 61: 949 - 956.