Interferencia de una fracción hemoaglutinante de veneno crotálico en la adsorción del virus de parainfluenza-3 (VPIB-3)

Interference of a hemagglutinant fraction of crotalic venom in the adsortion of parainfluenza-3 (PI-3) virus

Arcelia Alvarado Islas* Ángel Horacio Sandoval Trujillo** Octavio de Paz Villafán*
Blanca Lilia Barrón Romero*** Eliseo Hernández Baumgarten† Víctor R. Tenorio Gutiérrez*
Álvaro Aguilar Setién‡

Abstract

An isolated protein fraction of venom of *Agkistrodon piscivorus* with hemagglutinant property was evaluated in its capacity to inhibit *in vitro* the bovine parainfluenza-3 (PI3) virus, either by its capacity to block cell receptors or its adherence to the hemagglutinin viral spicules. Fraction AL27 acting as a receptor block, at a concentration ≤ 1.062 µg/mL, inhibited any damage or destruction of Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) cell cultures by the PI-3 virus (titer $10^{5.6}$ $TCID_{50\%}$), maintaining a cell viability between 69.43 and 84.86%. The adherence capacity of AL27 to viral hemagglutinin spicules of PI3 virus was determined by incubating both reactants 1:1 (1 mL AL27 at concentration ≤ 1.062 µg/mL + 1 mL PI-3 virus titer $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$) at 37°C for 1 hour, and a probable adherence to the viral hemagglutinin spicules was detected by electron microscope. The inactivation of PI-3 virus by AL27 was deduced by the reduction of the viral titer from $10^{5.6}$ to $10^{2.0}$ $TCID_{50\%}$. The apparent identity between AL27 and PI-3 virus was determined by recognition of the common protein 21 kDa when performing a Western blot using hyper-immune anti-*Agkistrodon piscivorus* serum. This outcome shows the possibility of using AL27 fraction as an antiviral agent. .

Key words: CROTALIC VENOM, HEMAGGLUTINANT FRACTION, LECTINS, ANTIVIRALS, BOVINE PARAINFLUENZA-3 (PI-3) VIRUS.

Resumen

Se evaluó una fracción proteínica con actividad hemoaglutinante (fracción AL27), aislada del veneno de la serpiente *Agkistrodon piscivorus*, en su aptitud para inhibir *in vitro* al virus de parainfluenza-3 bovino (VPIB-3), ya sea por su capacidad de bloquear receptores celulares o por su adherencia a las espículas de la hemoaglutinina viral. La adición de ≤ 1.062 µg/mL de AL27 en cultivos MDBK, previa a la infección con el VPIB-3 (título $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$), impidió el daño o destrucción de los tejidos, manteniendo la viabilidad celular entre 69.43% y 84.86%. Asimismo, tras la mezcla de ambos reactantes en proporción 1:1 (1 mL AL27 en concentración ≤ 1.062 µg/mL + 1 mL VPIB-3 con título $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$) e incubación a 37°C durante 1 h, se detectó al microscopio electrónico una aparente unión de AL27 con las espículas de hemoaglutinina virales. El bloqueo del VPIB-3 por AL27 se dedujo mediante la reducción del título viral de $10^{5.6}$ a $10^{2.0}$ $DICC_{50\%}$. Además, se detectó probable identidad entre AL27 y VPIB-3, por el reconocimiento de una proteína común de 21 kDa al realizar un Western blot con suero hiperinmune anti-*Agkistrodon piscivorus*. Los resultados muestran la factibilidad de que la fracción AL27 pueda ser empleada como agente antiviral.

Palabras clave: VENENO CROTÁLICO, FRACCIONES HEMOAGLUTINANTES, LECTINAS, ANTIVIRALES, VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINO (VPIB-3).

Recibido el 6 de marzo de 2006 y aceptado el 12 de septiembre de 2006.
Nota: Este trabajo es el resultado de la tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, de la primera autora, por la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X).
*Departamento de Epizootiología, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGARPA, Km 15.5, Carretera México-Toluca, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.
**División de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Edificio A, 2º piso, Col. Villa Quietud, México, D. F.
***Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio esq. Plan de Ayala s/n, México, D. F.
†Laboratorio de Microscopía Electrónica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Campo 1, Cuautitlán-Izcalli, Estado de México, México.
‡Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 300, Col. Doctores, 03025, México, D. F.
Autora responsable: Arcelia Alvarado Islas, Km 15.5, Carretera México-Toluca, Palo Alto, 05110, México, D. F., Tel. 5570-0616, Fax: 5570-4073, correo electrónico: arce_ai@yahoo.es
Proyecto Z0006B financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, bajo la responsabilidad del Dr. Álvaro Aguilar Setién; Proyecto 4212941P financiado por INIFAP-SAGARPA, bajo la responsabilidad de la primera autora.

Introduction

Bovine parainfluenza-3 (PI-3) virus control is limited to immunoprophylaxis; nevertheless, it could be extended by chemoprophylaxis and chemotherapy. There are antiviral drugs such as amantadin,* rimantadin** and zanamivir, used for viral control of human influenza A (agent that is similar in signs presentation and function of some of the PI-3 structural proteins).[1] The first two substances interfere with the viral replication cycle, avoiding pH changes, that the virion requires to pour its content into the cytosol, while zanamivir blocks the neuraminidase active site and interrupts the sialic acid cuts and inhibits liberation and dissemination of virions.[2]

Experimentally, a lectin isolated from several plant seeds (concavaline A) has been evaluated as an antiviral agent, since it has demonstrated capability of capturing gp120 protein and reducing viral titer of the human immunodeficiency virus (VIH-1).[3] Taking the analogy of evading infection by replication cycle interruption, the objective of this study was to avoid *in vitro* infection with PI-3, interfering with the viral adsorption mechanism to the cell, by the use of crotalic origin hemoagglutinating lectin known as AL27, since in a previous study it was found to be innocuous *in vitro* as well as *in vivo*.[4]

Hemoagglutinins or lectins are characterized by acting as platelet agglutination inducers, since they possess union sites with cell membrane sialic acid receptors; mechanism by which they can go through the membrane.[5] These hemoagglutinins are found abundantly in serpent poison of *Agkistrodon* and *Crotalus* genus, amongst others.[6,7] Hemoagglutinin spicules of Influenza A and PI-3 viruses are recognized by the sialic acid receptors of the carrier cells;[1] therefore, it is feasible that crotalic poison hemoagglutinin may be recognized by the same receptors and act as blocker or competitor agents that may prevent infection. In the same manner, crotalic hemoagglutinins could inhibit or capture viral particles, since there is affinity of crotalic hemoagglutinins with carbohydrate residues located in the viral spicule union site.[8]

Material and methods

Tissue culture

Single layer MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) cell lines were placed in sterile bottles with 175 cm^2* culture area or in sterile flat-bottom polystyrene microplates with 96 wells,** at a concentration of 2×10^5 cells/mL in culture media MEM (EAGLE Minimum Essential Medium),*** complemented with 10% inac-

Introducción

El control del virus de parainfluenza-3 bovino (VPIB-3) se limita a la inmunoprofilaxis; sin embargo, podría ser ampliado a la quimioprofilaxis o quimioterapia. Existen fármacos antivirales como la amantadina,* rimantadina** y zanamivir, utilizadas para el control del virus de influenza A humana (agente con gran semejanza en la presentación de signos y función de algunas proteínas estructurales al VPIB-3).[1] Las dos primeras sustancias interfieren en el ciclo de la replicación viral, evitando los cambios en el pH, que requiere el virión para verter su contenido en el citosol, mientras que el zanamivir bloquea el sitio activo de la neuraminidasa e interrumpe el recorte del ácido siálico e inhibe la liberación y difusión de los viriones.[2]

Experimentalmente se ha evaluado una lectina aislada de semillas de diversas plantas (concavalina A) como agente antiviral, que ha mostrado capacidad de capturar a la proteína gp120 y reducir el título del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1).[3] Retomando la analogía de evadir la infección por interrupción del ciclo de replicación, en este trabajo se pretende evitar *in vitro* la infección del VPIB-3, interfiriendo en el mecanismo de adsorción del virus a la célula, mediante el uso de una lectina hemoaglutinante de origen crotálico denominada AL27, la cual, en un estudio previo, resultó inocua tanto *in vitro* como *in vivo*.[4]

Las hemoaglutininas o lectinas se caracterizan por actuar como inductores de la aglutinación de plaquetas, al poseer sitios de unión con receptores ácido siálico de la membrana celular, mediante este mecanismo pueden traspasar la membrana.[5] Estas hemoaglutininas se encuentran en gran abundancia en el veneno de serpiente de los géneros *Agkistrodon* y *Crotalus*, entre otros.[6,7] Las espículas de hemoaglutinina de los virus de influenza A y VPIB-3 son reconocidas por los receptores ácido siálico de las células portadoras,[1] por lo que es factible que las hemoaglutininas de los venenos crotálicos puedan ser reconocidas por los mismos receptores y actúen como agentes bloqueadores o competidores que eviten la infección. Asimismo, las hemoaglutininas crotálicas podrían inhibir o capturar a las virales, dada la afinidad de las hemoaglutininas crotálicas con los residuos de carbohidratos ubicados en el sitio de unión de la espícula viral.[8]

*Symadine, Novartis Farmacéutica, España.
**Flumadine, Pharmaceutical Industry GMP/DMF, Estados Unidos de América.

tivated bovine† fetal serum and 10 000 UI/µg/mL penicillin-streptomycin mix.‡

Viral strain

Bovine parainfluenza-3 virus (PI-3) was replicated by inoculation with 1 mL of IMSS strain, titer $10^{5.6}$CCID$_{50\%}$ (cell culture infective dose $_{50\%}$) in MDBK 100% confluent culture media, incubated at 37°C for 1 h. After discarding the inoculum and replacing it for sterile MEM medium, incubation was continued during 24 h more, in which time 80% cytopathic effect was obtained. Infected cells were subjected to three freezing and thawing cycles to release intracellular particles and clarified by centrifugation at 3 500 g during 10 min in a refrigerated centrifuge.° The obtained viral suspension was concentrated by centrifugation at 10 000 g, for 1 h, in a refrigerated centrifuge.°° The pellet was resuspended in sterile saline solution (NaCl 0.15 M, 7.2 pH) and frozen until used at –70ºC.

Crotalic poison

Lyophilized poison of *Agkistrodon piscivorus* was reconstituted at a proportion of 10 mg/mL of H_2O HPLC grade,°°° filtering with a 0.22 µm porosity nylon membrane.^

*Hyperimmune anti-*Agkistrodon piscivorus *serum*

Two rabbits were inoculated with 1.75 mg/30 g body weight[4] dose of *A. piscivorus* poison, diluted in 0.5 mL sterile saline solution and added with complete Freund adjuvant in a proportion of 1:1, applying two challenges at seven-day intervals; a third one with a dose increase to 2.0 mg and two more challenges at doses of 4.0 mg/30 g body weight, at 14-day intervals. Serum was collected from both animals at seven-day intervals, beginning with the application of the second challenge and until 28 days after the last inoculation.

Immune response was determined by plate hemoagglutination.[9] Poison of *A. piscivorus* was reconstituted to the proportion of 6.25 mg/mL with Tyrodes regulating solution (glucose 5 mM, NaCl 0.15 M, NaH_2PO_4. H_2O 0.36 mM, $NaHCO_3$ 20 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, KCl2 mM, 7.4 pH). A total of 50 µL/well of saline solution was deposited in "V"* bottom microplates. In the first well of each line 50 µL of *A. piscivorus* antiserum was placed, performing double dilutions from 1:2 up to 1:256. After that 50 µL/well of reconstituted *A. piscivorus* poison were added; as well as 50 µL of 2.5% rabbit red blood cells. Plates were incubated for 20 min at room temperature and hemoagglutination inhibition was looked for.

Material y métodos

Cultivo de tejidos

Se emplearon monoestratos celulares de la línea MDBK (Madin Darby Bovine Kidney-Riñon-Bovino Madin Darby) y se sembraron en botellas con área de cultivo de 175 cm^2* o microplacas de poliestireno estériles de fondo plano, de 96 pozos,** a concentración de 2×10^5 células/mL en medio de cultivo MEM (Medio Mínimo Esencial EAGLE),*** complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado† y mezcla penicilina-estreptomicina de 10 000 UI/µg/mL.‡

Cepa viral

El virus de parainfluenza-3 bovino (VPIB-3) se replicó por inoculación con 1 mL de la cepa IMSS, título de $10^{5.6}$DICC$_{50\%}$ (dosis infectantes en cultivos celulares $_{50\%}$) en cultivos MDBK 100% confluentes, con incubación a 37°C por 1 h. Tras desechar el inóculo y reemplazarlo por medio MEM estéril, se continuó la incubación por 24 h más, tiempo en que se obtuvo 80% de efecto citopático. Las células infectadas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación para liberar a las partículas intracelulares y clarificación por centrifugación a 3 500 *g* durante 10 min en centrífuga refrigerada.° La suspensión viral obtenida fue concentrada por centrifugación a 10 000 *g*, por 1 h, en centrífuga refrigerada.°° El botón se resuspendió en solución salina estéril (NaCl 0.15 M, pH de 7.2) y se congeló hasta su uso a –70ºC.

Veneno crotálico

El veneno liofilizado de *Agkistrodon piscivorus* se reconstituyó a proporción de 10 mg/mL de H_2O grado HPLC,°°° filtrándose con membrana de nailon de 0.22 µm de porosidad.^

*Suero hiperinmune anti-*Agkistrodon piscivorus

Se inocularon dos conejos con dosis de 1.75 mg/30 g de peso corporal[4] del veneno de *A. piscivorus*, diluido en 0.5 mL de solución salina estéril y adicionado en

*Nunc No. Cat. 184502, Rochester, Nueva York.
**Nunc No. Cat. 167008, Rochester, Nueva York.
***No. Cat. ME-055, In vitro, S.A., México.
†Sigma No. Cat. F2442, Aldrich CEIME, Alemania.
‡No. Cat. A-01, In vitro, S.A., México.
°Beckman TJ-6, Beckman Instruments INC, Estados Unidos de América.
°°High Speed 18, MSE Instruments INC, Estados Unidos de América.
°°°Sigma No. Cat. 27073-3, Aldrich CEIME, Alemania.
^Millipore, No. Cat. GSWP 047 00, Millipore Corporation, Estados Unidos de América.

Cell membrane extraction

Single layer MDBK cells were cultured at 100% confluency in polyestherene bottles, washed with sterile PBS (NaCl 0.14 M, KCl 4 mM, $NaHPO_4.2H_2O$ 19 mM, KH_2PO_4 2 mM, 7.4 pH). Cells were removed by scrapping and separated by pressure through the use of a syringe with a 20 × 38 mm needle and then resuspended in PBS at 1×10^8/mL cell concentration. The cell pellet was washed by changes of PBS and centrifugation at 3 500 g for 10 min on three occasions. Cell rupture was carried out by nine 15 sec sonification** cycles, at 15 microns of frequency amplitude. The suspension was centrifuged at 14 000 g/1 h in a refrigerated centrifuge, discarding the supernatant with cell detritus, while the pellet (cell membrane) was resuspended in 300 µL PBS.[10] Protein quantification was done by Bradford microtitration.[11]

Titration

Virus and viral fluid titer was obtained by lytic plate count,[12] in MDBK cell cultures, 100% confluent (sterile, 96-well plastic plates), inoculated with logarithmic dilutions of PI-3 virus (from 10^{-1} to 10^{-8}) and incubated for 48 h at 37°C. Cytopathic effect was observed with an inverted microscope,* with 10X objective and 8X ocular, and viral titer was estimated by Reed and Muench method.[13]

Crotalic AL27 fraction isolation

Reverse phase high pressure liquid chromatography was used (HPLC-RP), with a silica gel column C_{18} 5 µL, 4.6 × 2.50 mm and 50 µL injector. Reconstituted *A. piscivorus* poison was solubilized with trifluoracetic acid (TFA)** to 0.1% in H_2O HPLC (dissolvent A) grade, and acetonitril*** with TFA a 0.1% (dissolvent B). Initial elusion gradient was 30% of B solvent on A, until 100% of B was reached, in 10 min time, with 1 mL/min flow. Absorbency was measured by 280 nm wavelength.[4,14,15] After the chromatographic process, selection of fraction AL27 was done by detecting its activity by hemoagglutination tests,[6] with a 64 HU (hemoagglutinating units) titer.

Cell receptor blockage

Tetrazolium reduction test (MTT) was used to evaluate cell viability after the infection process.[16,17] In confluent MDBK cell cultures developed in polyesthyrene 96-well microplates, 50 µL/well of fraction AL27 were deposited in the concentration previously determined as innocuous for 1.062 µg/mL cell viability.[4] After 1 h incubation at 37°C with AL27 fraction, proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund, aplicando dos estímulos a intervalo de siete días; un tercero con incremento de la dosis a 2.0 mg y dos estímulos más en dosis de 4.0 mg/30 g de peso corporal, a intervalo de 14 días. Se recolectó el suero de ambos animales a intervalos de siete días, iniciando en la aplicación del segundo estímulo y hasta los 28 días posteriores a la última inoculación.

Se determinó la respuesta inmune por inhibición de la hemoaglutinación en placa.[9] El veneno de *A. piscivorus* se reconstituyó a la proporción de 6.25 mg/mL con solución reguladora de Tyrodes (glucosa 5 mM, NaCl 0.15 M, $NaH_2PO_4H_2O$ 0.36 mM, $NaHCO_3$ 20 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, KCl 2 mM, pH de 7.4). En microplacas de fondo en "V"* se depositaron 50 µL/pozo de solución salina. En el primer pozo de cada línea se adicionaron 50 µL de suero anti-*A. piscivorus*, realizando diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:256. Posteriormente se agregaron 50 µL/pozo de veneno de *A. piscivorus* reconstituido, además de 50 µL de glóbulos rojos de conejo al 2.5%. Se incubaron las placas por 20 min a medio ambiente y la lectura fue por apreciación de la inhibición de la hemoaglutinación.

Extracción de membrana celular

Se desarrollaron monoestratos MDBK al 100% de confluencia en botellas de poliestireno y se lavaron con PBS estéril (NaCl 0.14 M, KCl 4 mM, $NaHPO_42H_2O$ 19 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7.4). Las células se desprendieron por raspado, se disgregaron a presión a través de una jeringa con aguja de 20 × 38 mm y luego se resuspendieron en PBS a concentración celular de 1×10^8/mL. El paquete celular se lavó mediante cambios de PBS y centrifugación a 3 500 *g* durante 10 min en tres ocasiones. La ruptura celular se efectuó mediante nueve ciclos de 15 seg de sonicación,** a frecuencia de 15 micrones de amplitud. La suspensión fue centrifugada a 14 000 g/1 h en centrífuga refrigerada, desechando el sobrenadante con los detritos celulares, mientras que el botón (membrana celular) se resuspendió en 300 µL de PBS.[10] La cuantificación de la proteína se hizo mediante microtitulación de Bradford.[11]

Titulación

La titulación del virus y fluidos virales se realizó por conteo de placas líticas,[12] en cultivos de células MDBK, 100% confluentes (placas de plástico de 96 pozos, estériles), inoculados con diluciones logarítmicas del

*Nunc No. Cat. M 2686, Rochester, Nueva York.
**Sonicador Ultrasonix Processor, Industrias Bioselec, México.

single layers were washed with PBS and inoculated with PI-3 virus at $10^{5.6}$, $10^{4.6}$, $10^{3.6}$ and $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$ doses, contained in 50 µL/well volumes. Sterile MEM culture medium, virus PI-3 in $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$ doses free of AL27, as well as AL27 fraction in the concentration previously determined as capable of altering 4.25 µg/mL,[4] free of PI-3 cell viability, were used as controls. Single cell layers were cultured during 48 h at 37° C. A hundred µg MTT/well (3-[4, 5-Dimethyl-thiazol-2-Yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)*** were added to all the plate and incubated at 37°C during 4 h. After that 50 µL/well SDS (15% w/v dodecil sodium sulfate, HCl 0.02 M) was added and incubated overnight at room temperature in dark chamber. Absorbency to 492 nm wavelength was measured in an ELISA† reader and interpretation was performed by variance analysis.[18]

Viral hemoagglutinin blockage

Two milliliters of PI-3 viral suspension with $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ viral titer were clarified by 3 500 *g* centrifugation for 10 min. The viral suspension was divided in two equal parts, the first was mixed in a proportion of 1:1 with AL27 fraction previously diluted to a 1.062 µg/mL (PI-3 virus/AL27) concentration and incubated for 1 h at 37°C and the second (PI-3) was maintained in refrigeration until its use. PI-3 virus and the PI-3 virus/AL27 mix were centrifuged at 15 000 *g* per 30 min, in a refrigerated centrifuge. Obtained pellets were fixed with 10% glutaraldehyde* in sterile PBS and fosfotunstic** acid was used for negative stain at 2% in H_2O. Observation was carried out with electron microscope at 50 000 magnification.[19]

Fluid harvested after the last centrifugation of the PI-3 virus/AL27 mix, was titrated by lytic plate count technique, using logarithmic dilutions of the fluids from 10^{-1} to 10^{-8}. PI-3 virus ($10^{5.6}DICC_{50\%}$) was used as control.[12]

Affinity between PI-3 virus and AL27 crotalic fraction

Electrophoretic runs were carried out in denaturing conditions in polyacrilamide gels at 12% (3.5 mL distilled H_2O, 2.5 mL Tris-HCl 1.5 M and pH 8.8, SDS 0.35 M, 4 mL 30% acrylamide/bisacrylamide, 0.4 M ammonium persulfate and 5 µL TEMED) with PI-3 virus suspension in $10^{3.6}$, $10^{4.6}$ and $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ doses, MDBK cell membrane extracts at 5 and 10 µg concentration, from 201 to 6.6 kDa*** molecular weight marker as control, fraction AL27 at a concentration of 2.125 and 4.25 µg/mL, and *A piscivorus* poison at a concentration of 1.56 mg/mL. The runs were carried out at 15 and 50 mA for 10 and 45 min, respec-

VPIB-3 (de 10^{-1} a 10^{-8}) e incubando 48 h a 37°C. La lectura fue por apreciación del efecto citopático en un microscopio invertido,* con objetivo 10X y ocular 8X, y el cálculo del título viral se realizó por medio del método de Reed y Muench.[13]

Aislamiento de fracción crotálica AL27

Se empleó el proceso de cromatografía líquida de alto rendimiento, en fase reversa (HPLC-RP), con columna de gel de sílice C_{18} 5 µL, 4.6 × 2.50 mm e inyector de 50 µL. El veneno reconstituido de *A piscivorus* fue solubilizado con ácido trifluoroacético (TFA)** a 0.1% en H_2O grado HPLC (disolvente A), y acetonitrilo*** con TFA a 0.1% (disolvente B). El gradiente de elusión inicial fue de 30% del disolvente B sobre el A, hasta alcanzar 100% del B, a un tiempo de 10 min, con flujo de 1 mL/min. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 280 nm.[4,14,15] La selección de la fracción AL27 tras el proceso cromatográfico fue por detección de su actividad mediante pruebas de hemoaglutinación,[6] con un título de 64 UH (unidades hemoaglutinantes).

Bloqueo de receptores celulares

Se empleó la prueba de reducción del tetrazolium (MTT) para evaluar la viabilidad celular posterior al proceso de infección.[16,17] En cultivos confluentes de células MDBK, desarrollados en microplaca de poliestireno de 96 pozos, se depositaron 50 µL/pozo de la fracción AL27 en la concentración previamente determinada como inocua para la viabilidad celular de 1.062 µg/mL.[4] Después de 1 h de incubación a 37°C con la fracción AL27, los monoestratos se lavaron con PBS y se inocularon con el virus VPIB-3 en dosis de $10^{5.6}$, $10^{4.6}$, $10^{3.6}$ y $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$, contenidos en volúmenes de 50 µL/pozo. Como testigos se emplearon medio de cultivo MEM estéril, virus VPIB-3 en dosis de $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$ libre de AL27, así como la fracción AL27 en concentración previamente determinada como capaz de alterar la viabilidad celular de 4.25 µg/mL,[4] libre de VPIB-3. Los monoestratos se incubaron durante 48 h a 37°C. Se adicionó en toda la placa 100 µg de MTT/pozo (3-[4, 5-Dimetiltiazol-2-Yl]-2, 5-difeniltetrazolium bromuro)† y se incubó a 37°C durante 4 h. Posteriormente se adicionó 50 µL/pozo de SDS (15% w/v dodecil sulfato de sodio, HCl 0.02 M) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara oscura. Se midió la absorbancia a longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA‡

*Zeiss, Alemania.
**Sigma, No.Cat. 096553, Alemania.
***Sigma, No.Cat. 27071-7, Alemania.
†Sigma, No.Cat. M-5855, Alemania.
‡BDSL, Inmunoskan Plus, Reino Unido.

tively. They were stained with 1% Coomassie blue† for 1 h and discolored with 5% acetic acid‡ for 24 h.[10,20,21] Molecular weights were determined by linear regression with an image analyzer, and the Quantity One software.° Separated proteins were transferred to a 0.2 µm porosity nitrocellulose membrane,°° run at 100 V, for 1 h.[10,22] Western blot test was carried out with the transferred membranes using serum hyper-immune of *A. piscivorus* (1:40). Developing was performed using an anti-IgG anti-rabbit biotinilated antibody (1:2 000) and conjugated with avidin-peroxidase (1:6 000). Diaminobenzidine (25 mg of diaminobenzidine, 50 mL PBS and H_2O_2 8.8 M) was used as chromogen incubating for 10 min at 37°C in agitation.[10]

Results

Cell receptor blockage

In tetrazolium (MTT) reduction tests used to assess the capacity to block or inhibit the union of PI-3 virus to cell receptors, there was 68.78% cell viability in the positive control of PI-3 virus at a $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$ dose, while for the positive control of fraction AL27 at concentration previously determined as harmful for cell viability of 4.25 µg/mL it was 58.69%. Viability percentages of viral blockage, with fraction AL27 at a constant concentration of 1.062 µg/mL and the virus at 10,$^{5.6}$ 10,$^{4.6}$ $10^{3.6}$ and $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$ doses, were 69.34, 72.71, 80.93 and 84.86%, respectively. In the statistical analysis, variance was 0.0126, 0.0123, 0.0072 and 0.0055 for $10^{5.6}$ to $10^{2.6}$ doses, respectively.

Viral hemoagglutinin blockage

In electron microscopy tests, performed to determine if AL27 could recognize carbohydrates present in viral hemoagglutinins, viral clumps were observed in the collected pellet, after centrifugation of the PI-3 virus/AL27 mix, where numerous particles with the characteristic morphology could be distinguished (Figures 1A and 1B) (magnification 50 000 X), while in the pellet with virus without AL27, viruses with characteristic morphology were not found.

PI-3 virus titer, after incubation with *A. piscivorus* isolated AL27 fraction, was reduced from $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ to $10^{2.0}$ $DICC_{50\%}$.

Affinity between PI-3 virus and crotalic AL27 fraction

Hyper-immune serum against *A. piscivorus* showed capacity to inhibit hemoagglutination produced by the poison even at 1:64 dilution (corresponding to 64 hemoagglutination inhibitory units HIU).

y la interpretación se hizo por medio de análisis de varianza.[18]

Bloqueo de hemoaglutinina viral

Dos mililitros de suspensión del virus VPIB-3 con título viral de $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ fueron clarificados por centrifugación a 3 500 *g* durante 10 min. La suspensión viral se dividió en dos partes iguales, la primera se mezcló en proporción 1:1 con la fracción AL27 previamente diluida a concentración de 1.062 µg/mL (VPIB-3/AL27) y se incubó durante 1 h a 37°C y la segunda (VPIB-3) se mantuvo en refrigeración hasta su uso. El VPIB-3 y la mezcla VPIB-3/AL27 se centrifugaron a 15 000 g por 30 min, en centrífuga refrigerada. Los botones obtenidos se fijaron con glutaraldehído* a 10% en PBS estéril y para la tinción negativa se empleó ácido fosfotúnstico** a 2% en H_2O. La observación al microscopio electrónico fue a 50 000 aumentos.[19]

El fluido que se cosechó después de la última centrifugación de la mezcla VPIB-3/AL27, se tituló mediante la técnica de conteo de placas líticas descrita previamente, empleando diluciones logarítmicas de los fluidos desde 10^{-1} a 10^{-8}. Como testigo se empleó el virus de VPIB-3 ($10^{5.6}DICC_{50\%}$).[12]

Afinidad entre el VPIB-3 y la fracción crotálica AL27

Se realizaron corrimientos electroforéticos en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 12% (3.5 mL de H_2O destilada, 2.5 mL de Tris-HCl 1.5 M y pH 8.8, SDS 0.35 M, 4 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, persulfato de amonio 0.4 M y 5 µL de TEMED) con suspensión del VPIB-3 en dosis de $10^{3.6}$, $10^{4.6}$ y $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$, extractos de membrana de células MDBK en concentración de 5 y 10 µg, un marcador de pesos moleculares de 201 a 6.6 kDa*** como testigo, la fracción AL27 a concentración de 2.125 y 4.25 µg/mL, y el veneno de *A. piscivorus* a concentración de 1.56 mg/mL. El corrimiento se realizó a 15 y 50 mA por 10 y 45 min, respectivamente. Se tiñeron con azul de Coomassie al 1%† durante 1 h y se decoloraron con ácido acético al 5%‡ por 24 h.[10,20,21] Los pesos moleculares se determinaron por regresión lineal, mediante un analizador de imágenes, con el programa Quantity One.° Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de

*Sigma, No. Cat. G5882, Alemania.
**Sigma, Alemania.
***Bio Rad No. Cat. 161-0318, Estados Unidos de América.
†Sigma, No. Cat. B8522, Alemania.
‡Sigma, No. Cat. 28202-2, Alemania.
°Bio-Rad, Estados Unidos de América.

When analyzing *A. piscivorus* poison (with all of its proteic and polypetidic components), in structural protein electrophoresis (Figure 2) eight protein bands were detected of approximately 93, 59, 46, 42, 36, 33, 26 and 21 kDa (lane 1). Crotalic AL27 fraction showed a molecular weight of 21 kDa (lanes 2 and 3). It is probable that the presence of two extra bands of 38 and 28 kDa on lane 3, is due to the high concentration of non-denatured AL27 in dimeric and trimeric form. In Western blot tests (Figure 3), anti-*A. piscivorus* hyper-immune rabbit serum showed strong tincture in protein bands corresponding to 21 kDa in *A. piscivorus* poison and crotalic AL27 fraction at concentration of 4.25 and 2.125 µg/mL (lanes 9, 8 and 7). Also there was recognition of other bands that could correspond to 21 kDa protein polymers. Under weak tincture, apparently PI-3 virus at concentrations of $10^{4.6}$ and $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ (lanes 2 and 3) show a similar molecular weight protein (21 kDa). This is not noticeable at $10^{3.6}$ $DICC_{50\%}$ doses of PI-3 virus nor in cell membrane extracts (lanes 1, 4 and 5). Hyper-immune serum also detected certain identical bands between PI-3 virus and cell membrane extracts where it replicated.

Discussion

It was demonstrated that it is feasible to use the crotalic poison hemoagglutinating fraction (AL27) as an anti-viral agent, since it possesses dual action in viral adherence inhibition by blocking sialic acid cell receptors as well as bonding with viral hemoagglutinin carbohydrates. During evaluation of viral blocking through adherence of AL27 sialic acid cell receptors, viability detected by MDBK inoculation by PI-3 virus/

0.2 µm de porosidad,* con corrimiento a 100 V, por 1 h.[10,22] Se realizó la prueba de Western blot en las membranas transferidas utilizando el suero hiperinmune de *A. piscivorus* (1:40). El revelado se realizó utilizando anticuerpo anti-IgG anti-conejo biotinilado (1:2 000) y se conjugaron con avidin-peroxidasa (1:6 000). Se utilizó como cromógeno diaminobenzidina (25 mg de diaminobenzidina, 50 mL de PBS y H_2O_2 8.8 M) incubando por 10 min a 37°C en agitación.[10]

Resultados

Bloqueo de receptores celulares

En las pruebas de reducción del tetrazolium (MTT) empleadas para evaluar la capacidad para bloquear o inhibir la unión del VPIB-3 a los receptores celulares, la medición de la viabilidad celular en el control positivo de VPIB-3 en dosis de $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$, fue de 68.78%, mientras que para el testigo positivo de la fracción AL27 en concentración previamente determinada como dañina para la viabilidad celular de 4.25 µg/mL fue de 58.69%. Los porcentajes de viabilidad en el bloqueo viral, con la fracción AL27 en concentración constante de 1.062 µg/mL y el virus en dosis de $10,^{5.6}$ $10,^{4.6}$ $10^{3.6}$ y $10^{2.6}$ $DICC_{50\%}$, fueron de 69.34%, 72.71%, 80.93% y 84.86%, respectivamente. En el análisis estadístico, la varianza dio valores de 0.0126, 0.0123, 0.0072 y 0.0055 para las dosis de $10^{5.6}$ a $10^{2.6}$, respectivamente.

Bloqueo de hemoaglutinina viral

En las pruebas de microscopía electrónica, realizadas

*Bio-Rad No. Cat 1703932, Estados Unidos de América.

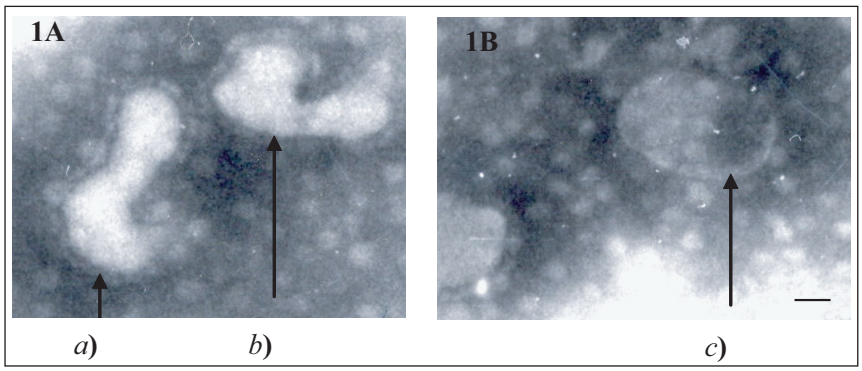

Figura 1: Microscopía electrónica de partículas virales del VPIB-3 con la fracción crotálica AL27 (aumento 50 000 X). En la Figura 1A la partícula *a)* muestra los peplómeros virales adheridos a la membrana, y hay cinco partículas globulares superpuestas a los peplómeros que podrían ser AL27. La partícula *b)* también muestra los peplómeros virales pero sin partículas globulares adheridas. En la Figura 1B se observan varias partículas virales pleomórficas y esféricas. Las partículas esféricas parecen estar rotas y una de ellas está parcialmente penetrada por el ácido fosfotúnstico *c)*.

Figure 1: Electronic microscopy of PI-3 viral particles with AL27 crotalic fraction (magnification 50 000 X). In Figure 1A particle *a)* shows viral peplomers adhered to the membrane, and there are five superimposed globular particles on the peplomers that could be AL27. Particle *b)* also shows viral peplomers but without the adhered globular particles. In Figure 1B several pleomorphic and spherical particles are observed. The spherical particles seem to be broken and one of them is partially penetrated by phosphotungstic acid *c)*.

AL27 was higher than the control of each one of them in an individual manner (68.78% and 58.69%, respectively), and even though it did not reach the control cells' level (100%), cell viability percentages were better with values of 69.34%, 72.71%, 80.93% and 84.86%, and statistical differences (0.0126, 0.0123, 0.0072 and 0.0055) were not significant.

Basically, there is no previous study with hemoagglutinins (lectins) with which to make comparison of the results that were obtained. It was expected that during blockage, when using both agents at the concentrations previously established as not harmful, viability would be maintained at its maximum level. The lower oxide-reduction index of cells was due to the combination of both reagents albeit without causing apoptosis (due to the effect of AL27)[23] or cell lyses (due to viral effect).[1]

Apparently, N-terminal sequences of crotalic hemoagglutinin[24] showed greater affinity towards carbohydrates of PI-3 virus hemoagglutinins, than for sialic acid receptors of MDBK cells. This was observed in the viral infection evasion tests, by the apparent union of AL27 to PI-3 virus spicules. Figures 1A and 1B show a surface with viral units covered by AL27. The technique that was used did not allow the distinction of the crotalic lectin site of action. Electron micrographs suggest that the site of action could be the viral glycoprotein.

para determinar si AL27 podía reconocer los carbohidratos presentes en las hemoaglutininas virales, se observó que la pastilla recolectada tras la centrifugación de la mezcla VPIB-3/AL27, contenía grumos de virus en los que se distinguían numerosas partículas con la morfología característica (Figuras 1A y 1B) (aumento 50 000 X), en tanto que los virus que se encontraron en la pastilla del virus solo (sin AL27) no permitieron ver virus con morfología característica.

El título viral del VPIB-3 posterior a su incubación con la fracción AL27 aislada de *A. piscivorus*, se redujo de $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ a $10^{2.0}$ DICC $_{50\%}$.

Afinidad entre el VPIB-3 y la fracción crotálica AL27

El suero hiperinmune contra *A. piscivorus* mostró capacidad para inhibir la hemoaglutinación producida por el veneno hasta la dilución de 1:64 (correspondiente a 64 unidades inhibitorias de la hemoaglutinación, UIH).

Al analizar el veneno de *A. piscivorus* (con todos sus componentes proteínicos y polipeptídicos), en la electroforesis de proteínas estructurales (Figura 2) se detectaron ocho bandas de proteína, de aproximadamente 93, 59, 46, 42, 36, 33, 26 y 21 kDa (carril 1). La fracción crotálica AL27 mostró tener un peso molecular de 21 kDa (carriles 2 y 3). Es probable que la

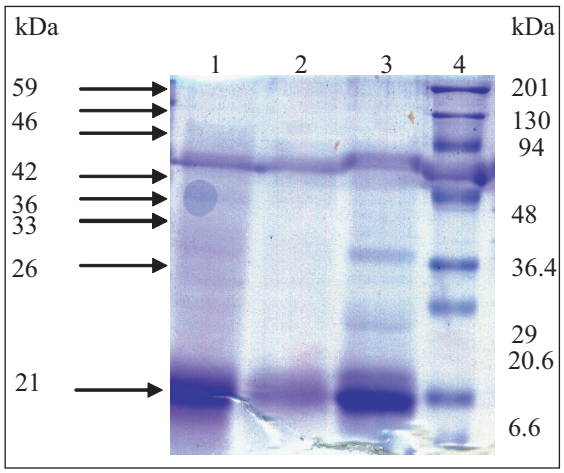

Figura 2: Electroforesis en condiciones desnaturalizantes del veneno de *A. piscivorus* y de la fracción crotálica AL27. Carril 1, veneno de la serpiente *Agkistrodón piscivorus*; carril 2, fracción AL27 por HPLC-RP (2.125 µg/mL); carril 3, fracción AL27 por HPLC-RP (4.25 µg/mL); carril 4, marcador de peso molecular.

Figure 2: Electrophoresis under denaturing conditions of *A piscivorus* poison and crotalic fraction AL27. Lane 1, poison of *Agkistrodón piscivorus* serpent; lane 2, fraction AL27 by HPLC-RP (2.125 µg/mL); lane 3, fraction AL27 by HPLC-RP (4.25 µg/mL); lane 4, molecular weight marker.

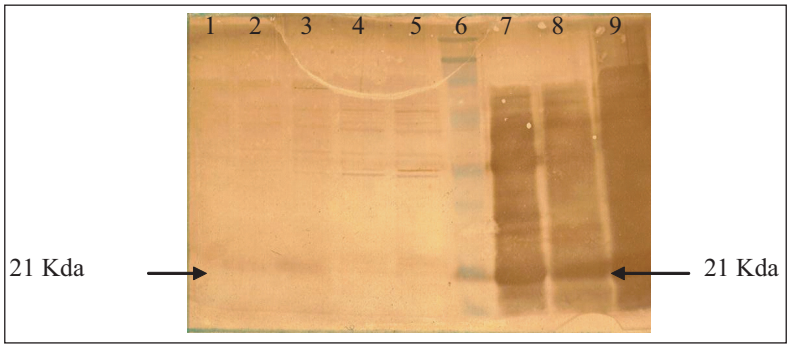

Figura 3: Western blot marcando una aparente identidad entre la hemoaglutinina crotálica AL27 y una proteína estructural del VPIB-3. Carriles 1, 2 y 3, proteínas de VPIB-3 a $10^{3.6}$, $10^{4.6}$ y $10^{5.6}$, respectivamente; carriles 4 y 5, células MDBK a 5 y 10 µg, respectivamente; carril 6, marcadores de peso molecular; carriles 7 y 8, fracción AL27 a 2.125 y 4.25 µg/mL, respectivamente; carril 9, veneno de *A. piscivorus*.

Figure 3: Western blot apparently indicating crotalic AL27 hemoagglutinin is identical to a structural protein of PI-3 virus. Lanes 1, 2 and 3, PI-3, proteins at $10^{3.6}$, $10^{4.6}$ and $10^{5.6}$, respectively; lanes 4 and 5, MDBK cells at 5 and 10 µg, respectively; lane 6, molecular weight marker; lanes 7 and 8, fraction AL27 at 2.125 and 4.25 µg/mL respectively; lane 9, *A. piscivorus* poison.

The fact that peplomers covered with the crotalic AL27 fraction were not found suggests that the bond is weak and reversible, with a tendency to disintegrate during preparation for electron microscope observation. The above would also explain the fact that even with abundance of AL27 molecules in the reaction, the virus continues to replicate at a low rate and does not completely stop multiplying.

Another factor that demonstrated the possible affinity of AL27 towards viral hemoagglutinin was the titration of the PI-3 virus strain, which drastically reduced its activity from $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ to 10^{2o} after its incubation with AL27 fraction of *A. piscivorus*. This type of bonding or recognition between viral fragments and hemoagglutinating agents has been done by Hayakawa *et al.*,[3] who demonstrated that gp120 protein of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) interacted strongly with some lectins or hemoagglutinins, specially with concavaline A (Con A), that reduced the level of gp120 and infectivity index of HIV-1, after incubating both reagents at room temperature.

Similitude between viral structural proteins and crotalic hemoagglutinins was determined by molecular weight comparisons and specific anti-*A. piscivorus* antibody recognition by Western blot. Francischetti *et al.*,[24] isolated a lectin activity protein from serpent *Crotalus durissus* poison and called it "convulxin", and recorded it as a single 72 kDa protein, that when subjected to reducing conditions is divided into two polypeptids of 13.5 and 12.5 kDa molecular weight.

Hirabayashi *et al.*,[25] isolated lectin from *Crotalus atrox* poison, and reported the presence of a unique hemoagglutinin of 14.4 kDa molecular weight in reducing conditions and 31.0 kDa in non-reducing conditions. Ogilvie *et al.*,[26] isolated lectins from the poison of *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii,* and reported that both had molecular weights of 14 kDa in reducing conditions, and 28 kDa in non-reducing conditions. Even though molecular weights reported by theses authors are not identical to this study, they are quite close to those that were found in the electrophoretic runs of the AL27 fraction of *A. piscivorus* in reducing conditions, where molecular weight was 21 kDa. Also, in the crotalic hemoagglutinins and viral structural proteins identity tests, both reactants showed 21 kDa bands that reacted with anti-*A. piscivorus*, with greater affinity towards those that correspond to AL27. Nevertheless, recognition of the viral protein was also clearly shown when there was a high concentration of antigen. According to the results that were obtained in this study, it is concluded that antiviral activity through cell receptor blockage is satisfactory.

Even though the expected effectiveness was not presencia de dos bandas extras de 38 y 28 kDa en la línea 3, se deba a la alta concentración de AL27 no desnaturalizada en conformación dimérica o trimérica. En las pruebas de Western blot (Figura 3), el suero hiperinmune de conejo anti-*A. piscivorus* marcó fuerte tinción en las bandas proteínicas correspondientes a los 21 kDa en el veneno de *A. piscivorus* y en la fracción crotálica AL27 en concentración de 4.25 y 2.125 µg/mL (carriles 9, 8 y 7). También se encontró el reconocimiento de otras bandas, que pueden corresponder a polímeros de la proteína de 21 kDa. Bajo una débil tinción, aparentemente el VPIB-3 en concentración de $10^{4.6}$ y $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ (carriles 2 y 3) muestra una proteína de peso molecular similar (21 kDa). Ésta no se aprecia en la dosis de $10^{3.6}$ $DICC_{50\%}$ del VPIB-3 ni en los extractos de membrana celular (carriles 1, 4 y 5). El suero hiperinmune también detectó ciertas bandas de identidad entre el VPIB-3 y los extractos de membrana de las células en que éste fue replicado.

Discusión

Se demostró que es factible emplear la fracción hemoaglutinante del veneno crotálico (AL27) como agente antiviral, al poseer la dualidad de acción en la inhibición de la adherencia viral, al bloquear a los receptores ácido siálico celulares y unirse a los carbohidratos de la hemoaglutinina viral. Durante la evaluación del bloqueo viral, a través de la adherencia de AL27 hacia los receptores ácido siálico celulares, la viabilidad detectada por la inoculación de las MDBK por VPIB-3/AL27 fue superior al testigo de cada uno de ellos en forma individual (68.78% y 58.69%, respectivamente), y aunque no alcanzó el nivel de las células testigo (100%), los porcentajes de viabilidad celular fueron mejores, con valores de 69.34%, 72.71%, 80.93% y 84.86%, y las diferencias estadísticas (0.0126, 0.0123, 0.0072 y 0.0055) no fueron significativas.

Básicamente no existe un trabajo previo con hemoaglutininas (lectinas) sobre el que se pudiese establecer un patrón comparativo de los resultados obtenidos. Se esperaba que durante el bloqueo, al emplear ambos agentes a las concentraciones previamente establecidas como no dañinas, la viabilidad se mantendría en su máximo nivel. El menor índice de óxido-reducción de las células se debió a la combinación de ambos reactantes, aunque sin llegar a causar apoptosis (por efecto de AL27)23 o lisis celular (por efecto viral).[1]

Aparentemente, las secuencias N-terminales de la hemoaglutinina crotálica[24] mostraron mayor afinidad hacia los carbohidratos de las hemoaglutininas del VPIB-3, que por los receptores ácido siálico de las células MDBK. Lo anterior se observó en las pruebas de evasión de la infección viral, por la aparente unión

reached (100% cell viability) monolayer cells were maintained at acceptable viability percentages without permitting viral lytic effect nor promoting cell apoptosis. In this context, the existence of antiviral activity was observed given by an apparent affinity of AL27 towards viral hemoagglutinin carbohydrates that were present, since it reduced the viral titer of PI-3 virus. The above indicates that the use of AL27 as an antiviral agent is feasible; nevertheless, it is still necessary to carry out more studies *in vitro* to then evaluate its effectiveness *in vivo*.

Acknowledgements

The authors wish to thank Sofia Gonzalez G., M. Sc. and Rosario Ruiz V., Chemist and Pharmacological Biologist, for their aid with electronic microscopy for this study. Also Dr. Monica Salmeron, from the Herpetological Containment Center of the Faculty of Science of the National Autonomous University of Mexico, for the donation of lyophilized crotalic venom of *Agkistrodon piscivorus* serpent.

Referencias

1. Collins PL, Chanok RM. McIntosh: Parainfluenza viruses. In: Fields DM. Knipe PM. Howley *et al.*, editors. Fields Virology. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:1177-1204.
2. Graeme LW, Bischofberger N, Webster RG. Disarming flu viruses. Sci Am 1999:56-65.
3. Hayakawa T, Nikawa T, Kishida A, Akashi M, Baba M. Capture of HIV-1 gp120 and virions by lectin-immobilized polystyrene nanospheres: Potential approach toward prevention of HIV-1 infection. Antiviral Res 1995; 27(1-2):49-57.
4. Alvarado IA, De Paz VO, Campos LY, Ramos RL, Aguilar SA. Aislamiento de una Fracción Crotálida con Actividad Hemoaglutinante y Evaluación *In Vivo* e *In Vitro* del Probable Daño a Tejidos. Téc Pecu Méx 2003;42(2):247-260.
5. Manjunatha RK, Evans HJ. Effects of Snake Venom Proteins on Blood Platelets. Toxicon 1990;8:1387-1422.
6. Ogilvie ML, Gartner TK. Identification of lectins in snake venoms. J Herpetol 1984;(18):285-290.
7. Gartner TK, Ogilvie ML. Isolation and characterization of three Ca^{++} dependent ß-galactoside-specific lectins from snake venoms. Biochem J 1984;(224):301-307.
8. Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. Science 1972;(177):949-959.
9. Barret T, Inglis SC. Virology, a practical approach In: Mahy BWJ, editors. Practical approach series. Oxford Washington DC: IRL press, 1991:119-150.
10. Schwimmbeck PL, Lohr M, Tishon A. Viral-receptor binding assay In: Rickwood D, Hames B, editors. Animal virus Pathogenesis. A practical Approach. Oxford: IRL University press, 1990:137-148.

de AL27 a las espículas del VPIB-3. Las Figuras 1A y 1B muestran una superficie con unidades virales cubiertas con AL27. La técnica empleada no permitió distinguir el sitio de acción de la lectina crotálica. Las micrografías electrónicas sugieren que el sitio de acción pudiera ser la glicoproteína viral.

El hecho de que no se encuentren todos los peplómeros cubiertos con la fracción crotálica AL27 sugiere que la unión es débil y reversible, con tendencia a desintegrarse durante la preparación para observarla al microscopio electrónico. Lo anterior también explicaría que aun en la abundancia de moléculas de AL27 presentes en la reacción, el virus continúe su replicación a una baja tasa y no deje de multiplicarse en las células por completo.

Otro factor que mostró la posible afinidad de AL27 hacia la hemoaglutinina viral fue la titulación de la cepa del VPIB-3, la cual, tras su previa incubación con la fracción AL27 de *A. piscivorus*, redujo su actividad drásticamente de $10^{5.6}$ $DICC_{50\%}$ a 10.[2o] Este tipo de unión o reconocimiento entre fragmentos virales con agentes hemoaglutinantes ha sido realizado por Hayakawa *et al.*,[3] quienes demostraron que la proteína gp120 del virus de inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) interactuaba fuertemente con algunas lectinas o hemoaglutininas, particularmente la concavalina A (Con A), que redujo el nivel de gp120 y el índice de infectividad del VIH-1, tras la incubación de ambos reactantes a temperatura ambiente.

Las similitudes entre las proteínas estructurales virales y las hemoaglutininas crotálicas se determinaron mediante la comparación de sus pesos moleculares y reconocimiento por anticuerpos específicos anti-*A. piscivorus* mediante Western blot. Francischetti *et al.*,[24] al aislar una proteína con actividad de lectina, del veneno de la serpiente *Crotalus durissus,* a la que denominó "convulxina", la registran como una proteína única de 72 kDa, que al ser sometida a condiciones reductoras se divide en dos polipéptidos de peso molecular de 13.5 y 12.5 kDa.

Hirabayashi *et al.*,[25] al aislar la lectina del veneno de *Crotalus atrox*, informaron sobre la presencia de una sola hemoaglutinina con peso molecular de 14.4 kDa en condiciones reductoras, y de 31.0 kDa en condiciones no reductoras. Ogilvie *et al.*,[26] al aislar las lectinas del veneno de *Lachesis muta* y *Dendroaspis jamesonii,* informaron que ambas poseían pesos moleculares de 14 kDa en condiciones reductoras, y 28 kDa en condiciones no reductoras. Si bien los pesos moleculares informados por estos autores no son idénticos a los del presente trabajo, sí se aproximan a lo que se encontró en los diversos corrimientos electroforéticos de la fracción AL27 de *A. piscivorus* en condiciones reductoras, en los que el peso molecular fue de 21 kDa. Asimismo, en las pruebas de identidad de las

11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Annal Biochem 1976;(72):248-254.
12. Jenney EW, Wessman SJ, Spinka FL. Microtitration serology methods for bovine virology. Ames Iowa: US department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service, 1978.
13. OMS. La Rabia. Técnicas de laboratorio. 3ª ed Ginebra Suiza: Organización Mundial de la Salud, 1975:348.
14. VYDAC. The handbook of analysis and purification on peptides and proteins by reversed phase HPLC. 2nd ed. Hesperia CA 92345 USA: VYDAC (the separations group) 17434 Mojave Street, 1995.
15. Mancin AC, Soares AM, Andriao-Escarso SH *et al.* The analgesin activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (south American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. Toxicon 1998;36:1927-1937.
16. Hayes PJ, Scoot R, Wheeler J. *In vivo* production of tumor necrosis factor-α and interleukin-6 in Balb/c mice inoculated intranasally with a high dose of respiratory syncytial virus. J Med Virol 1994;(42):323-329.
17. Martikainen P, Nyman K, Nevalainen TJ. Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases A_2 on MCF-7 cells in culture. Toxicon 1993;31:835-843.
18. Wayne WD. Bioestadística. 3ª ed. México DF: Ed. Limusa, 1989.
19. Dawes CJ. Biological techniques in electron microscopy. Barnes and Noble International Textbook Series. 1973;17(46):131-150.
20. BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrophoresis Cell. Instruction Manual. 2000 Alfred Nobel Drive Hercules, California, USA: Life Science group. No date of publication.
21. Instituto Politécnico Nacional. Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. Departamento de Microbiología. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional ISBN 968-28-2449-9, 1989:62-77.
22. BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrotransfer Cell. Instruction Manual. 2000 Alfred Nobel Drive Hercules, California, USA: Life Science group. Sin fecha de publicación.
23. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumor and normal cells. Anticancer Res 1990;10(5A):1153-1159.

hemoaglutininas crotálicas y proteínas estructurales virales, se observó en ambos reactantes bandas de 21 kDa que reaccionaron con los anticuerpos anti-*A. piscivorus*, con mayor afinidad hacia las correspondientes a AL27. Sin embargo, el reconocimiento hacia la proteína viral también fue claro cuando el antígeno se encontró a alta concentración. Por los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que la actividad antiviral a través del bloqueo de los receptores celulares es satisfactoria.

A pesar de que no se obtuvo la eficiencia esperada (100% de viabilidad celular), se logró mantener los monoestratos celulares en porcentajes de viabilidad aceptables, sin dar cabida al efecto lítico viral ni favorecer la apoptosis celular. En este contexto, se observó que también existe actividad antiviral dada por una aparente afinidad de AL27 hacia los carbohidratos presentes en la hemoaglutinina viral, ya que ésta logró reducir el título viral del VPIB-3. Lo anterior induce a considerar la factibilidad de emplear AL27 como agente antiviral; sin embargo, aún es necesario realizar un mayor número de estudios *in vitro* para finalmente evaluar su efectividad *in vivo*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la M en C Sofía González G. y a la QFB Rosario Ruiz V., su ayuda en la microscopía electrónica de este trabajo; asimismo, a la Dra. Mónica Salmerón, del Herpetario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, la donación del veneno crotálico liofilizado de la serpiente *Agkistrodon piscivorus*.

24. Francischetti IMB, Saliou B, Leduc M, Carlini CR, Hatmi M, Randon J *et al.* Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus venom*, specifically binds to platelets. Toxicon 1997;35(8):1217-1228.
25. Hirabayashi J, Kusunoki T, Ken-ichi K. Complete Primary Structure of a Galactose-specific Lectin from the Venom of the Rattlesnake *Crotalus atrox*. J Biol Chem 1991;286(4):2320-2326.
26. Ogilvie ML, Dockter ME, Wenz L, Gartner TK. Isolation and Characterization of Lactose-Binding Lectins from the venoms of the Snake *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonni*. J Biochem 1986;(100):1425-1431.