

ESTUDIO BIOQUIMICO DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops hyoprurus*

Bonilla, César¹; Zavaleta, Alfonso²

RESUMEN:

Se describe la purificación parcial de la enzima Fosfolipasa A del veneno de *Bothrops hyoprurus* y la caracterización de sus actividades hemolítica y citotóxica. La actividad fosfolipásica se detectó en dos fracciones de 23 y 12 Kd por cromatografía en Sephadex G-100 y G-50. Las actividades fosfolipásica y hemolítica fueron detectadas en las mismas fracciones. Los ensayos de Western-blot, sugieren que la fracción con 12 Kd es un producto de degradación, in-vitro, del polipéptido mayor. La actividad citotóxica de la fracción fue evidente sólo a elevadas concentraciones, sugiriéndose que moléculas diferentes a Fosfolipasa A serían responsables del efecto citotóxico del veneno.

Palabras claves: Veneno, serpiente, *Bothrops hyoprurus*, Fosfolipasa, hemólisis, citotoxicidad

ABSTRACT

We describe the partial purification of the enzyme phospholipase A of the venom of *Bothrops hyoprurus* and the characterization of its hemolytic and cytotoxic activities. Phospholipasic activity was detected in two fractions of 23 and 12 Kd through chromatography in Sephadex G-100 and G-50. Both phospholipasic and hemolytic activities were detected in the described fractions. Western blot essays suggest that the 12 Kbd fraction is an in vitro degradation product of the larger polypeptide. Cytotoxic activity of the fraction was evident only at high concentrations, this suggesting that molecules other than phospholipase A are responsible for the venoms cytotoxic effect.

Key words: Venom, snake, *Bothrops hyoprurus*, phospholipase, haemolysis, cytotoxicity.

INTRODUCCION

Las serpientes venenosas del género *Bothrops*, son responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos registrados anualmente en el Perú, los que se caracterizan por presentar hemorragia y necrosis local, sangrado por coagulopatía de consumo, hipotensión, shock y muerte^{1,2,3}. El accidente ocurre principalmente en áreas rurales donde la cobertura

de salud es deficitaria^{4,5,6,7,8}. *Bothrops hyoprurus* "jergón" es una serpiente reportada en selva baja (Loreto), que alcanza a medir 100 cm, sindicada como responsable de casos de envenenamiento en humanos, careciéndose de estudios sobre la bioquímica y farmacología de su veneno⁹.

Recientemente se ha relacionado la actividad de Fosfolipasa A con la miotoxicidad¹¹, la neurotoxicidad y la letalidad del veneno^{10,12,13,14}, obteniéndose técnicas para la estandarización de antivenenos comerciales a través de la medición de la actividad de la Fosfolipasa A. Asimismo, se ha correlacionado la potencia antiletal de los sueros con la inhibición específica de dicha actividad^{1,15}.

¹. Biólogo, Master en Bioquímica. Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

². Médico Cirujano, Doctor en Farmacología, Director General, Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.
Profesor Principal, Sección farmacología, Depto. Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 5045, Lima 100, Perú.

La hemólisis *in vivo* postulada en la década de los 40 para los venenos, en el género *Bothrops*, es poco frecuente. Los estudios efectuados con venenos de otras especies han mostrado la existencia de factores líticos directos en los venenos de elápidos pero no en venenos de víperidos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*^{16,17,18}. La hemólisis *in vitro* (indirecta) es reportada en muchos venenos ofídicos. El factor responsable (factor lítico indirecto) ha sido asociado a la presencia de la enzima Fosfolipasa A₂ (EC.3.1.1.4.) en el veneno, la que actúa sobre una fuente exógena de lecitina y genera lisofosfátidos con acción lítica sobre los eritrocitos^{2,19-24}.

En este estudio se evalúan las actividades: hemolítica, citotóxica y se caracteriza la actividad fosfolipásica del veneno cristalizado de *Bothrops hyoprurus*, y sus fracciones obtenidas mediante filtración en el Sephadex. Se obtiene una fracción purificada (FIIa1).

MATERIAL Y METODOS

VENENO OFIDICO.

Se utilizó veneno desecado cristalizado obtenido en el serpentario del Instituto Nacional de Salud en Lima, a partir de ejemplares adultos de *B. hyoprurus* (Loreto, Perú).

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

El contenido proteico del veneno fue estimado por el método de Lowry modificado por Stauffer²⁵ usando como estándar albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/mL = 0,66 Abs 280 nm).

FRACCIONAMIENTO DEL VENENO.

Para los ensayos, el veneno cristalizado fue reconstituido con una solución de acetato de sodio 50 mM pH 3, centrifugándolo por 10 minutos a 3000 r.p.m. antes de su uso. 100 mg de veneno cristalizado de *B. hyoprurus* fueron diluidos en 1 mL de solución de acetato

de sodio 50 mM pH 3, centrifugado por 10 minutos a 3000 r.p.m. y aplicado a una columna de 90 x 1,8 cm de gel Sephadex G-100 Super fino (Pharmacia, Suecia), calibrada y eluida a temperatura ambiente con buffer acetato de amonio 0,2M pH 8,4, a flujo constante de 6,3 mL/ hora. Las fracciones eluidas (2,1 mL/tubo) se colectaron en un colector de fracciones y la absorbancia a 280 nm fue registrada espectrofotométricamente.

La filtración en Sephadex G-50 Fino se realizó en una columna de 100 x 1,0 cm de gel Sephadex G-50 Fino (Pharmacia, Suecia), calibrada y eluida a temperatura ambiente con buffer bicarbonato de amonio 200 mM pH 8,4, a flujo constante de 6,0 mL/ hora. Las fracciones eluidas (2,0 mL/tubo) se recogieron en un colector de fracciones, registrándose su absorbancia a 280 nm.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR APARENTE

El peso molecular aparente de las fracciones fue estimado mediante filtración en gel Sephadex y electroforesis en gel de poliacrilamida:

- Luego de la filtración en columna de gel Sephadex G-100 s.f. se gráfica el logaritmo del peso molecular de las fracciones eluidas versus la constante de distribución ($K_{av}=v_i/v_o$) de las fracciones y estándares proteicos de peso molecular conocido: Azul de dextrano (2000 Kd, Pharmacia), Albúmina Sérica Bovina (66 Kd, Sigma), Anhidrasa Carbónica (29 Kd, Sigma), Citocromo C (12,4 Kd, Sigma) y Aprotinina (6,5 Kd, Sigma).
- Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes²⁶ (SDS-PAGE). Se empleó geles verticales de SDS-PAGE al 14% en buffer Tris-Glicina (0,25M-1,92M, SDS 1%) bajo corriente constante de

13 mA durante 5 horas. Se utilizó estándares similares a los descritos para la técnica de filtración en gel.

ISOELECTRO ENFOQUE

Para la determinación del punto isoeléctrico de las fracciones se utilizó la metodología empleada por Berheimer, Weinstein y Linder²⁷. Para detectar la presencia de la actividad de Fosfolipasa y su punto isoeléctrico se vertió sobre el gel una suspensión de agarosa - yema de huevo la cual se gelifica y luego se incubaba la placa a 50°C. El aclaramiento de la suspensión de yema de huevo, confirma la presencia de Fosfolipasa.

ACTIVIDAD HEMOLITICA^{16,28}

La actividad hemolítica del veneno fue ensayada en eritrocitos humanos lavados obtenidos de donadores O Rh positivos y mantenidos en suspensión con tampón glicina -NaCl (glicina 0,1 M en cloruro de sodio al 0,6%) a pH 5,8. La actividad hemolítica directa e indirecta fue evaluada en tubo y en placa respectivamente, por los métodos siguientes:

- a) *Hemólisis en tubo*, en forma similar al utilizado por Martínez, Bonilla & Zavaleta (1989) para veneno de *B. ba netti*, determinando la cantidad de hemoglobina liberada mediante la técnica de la cianometahemoglobina que emplea el reactivo de Drabkin. La actividad hemolítica se expresó como Unidad Específica de Hemólisis Directa (U.E.H.D.) o Indirecta (U.E.H.I.) según sea el caso:

$$UEHD = \frac{\% \text{ de Hemólisis directa}}{\text{mg Proteína}}$$

$$UEHI = \frac{\% \text{ de Hemólisis indirecta}}{\text{mg Proteína}}$$

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{HL}{HT \times 100}$$

Donde :

HL = Hb liberada por tratamiento

HT = Hb Total (con Tritón X-100)

- a.1) Hemólisis directa en tubos conteniendo 0,2 mL de eritrocitos lavados y 1,6 mL de buffer glicina - NaCl a los que se adicionó en un ensayo típico, 0,2 mL de solución de veneno (9,4 - 564 ug/mL), y se incubó por 20 minutos a 37°C, luego de los cuales se procedió a centrifugar la suspensión a 1000 r.p.m. durante 20 minutos, cuantificándose la hemoglobina liberada en el sobrenadante. El efecto del tiempo de incubación sobre la hemólisis directa fue estudiado para tiempos de incubación de hasta 2 horas.
- a.2) Hemólisis indirecta (método de Grassmann y Hanning,¹⁶). Una mezcla de veneno (0,5 mL, 18,8 - 94 ug/mL) y 0,5 mL de suspensión de yema de huevo al 6,4% en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 se preincubaban a 37°C durante 30 minutos, 0,2 mL del hidrolizado obtenido es ensayado en el sistema de hemólisis indirecta, incubando la mezcla a 37°C por 1 hora, al cabo de los cuales se centrifuga la mezcla y se mide la hemoglobina liberada en el sobrenadante. El efecto del tiempo de incubación sobre la hemólisis indirecta fue estudiado para tiempos de incubación de 30 minutos a 2 horas.
- b) *Hemólisis en placa de agar*.
- b.1) Hemólisis directa en placa: Las placas se preparan mezclando partes iguales de agar SIGMA tipo I de baja electroendósmosis al 1% y agar DIFCO de alta electroendósmosis al 1% preparados en buffer acetato de sodio 0,05 M a pH 7,5 y adicionando 2 mL de eritrocitos lavados a 40°C. Luego de homogenizar la mezcla, se reparte en placas de vidrio de

10x10cm, y luego de la gelificación se practican agujeros de 3 mm de diámetro en el gel para adicionar el veneno (9,4 - 94 ug/mL). Las placas conteniendo veneno y control salino, se incubaron a 37°C, por períodos variables de tiempo (0 - 120 minutos), midiéndose a continuación el diámetro (mm) del halo producido con un Vernier.

- b.2) Hemólisis indirecta en placa: Se empleó el método de agar yema de huevo-eritrocitos modificado por Da Silva¹⁹, preparada agregando 1 mL de suspensión de yema de huevo al 85% en acetato de amonio 100 mM pH 7,4 al agar base a 50°C, y luego de llevar a temperatura de 45°C se agregó 1 mL de eritrocitos lavados. Procediéndose a homogenizar la mezcla, y repartirla en placas de vidrio de 10x10cm. Se deja gelificar y se practicaron agujeros de 3 mm de diámetro en el gel, para adicionar el veneno (9,4 - 94 ug/mL). Las placas conteniendo veneno y control salino, se incubaron a 37°C, por períodos variables de tiempo (15 - 120 minutos), midiéndose a continuación con un Vernier, el diámetro (mm) del halo.

La actividad hemolítica directa e indirecta en placa se expresa como Unidad Hemolítica Directa (UHD) ó Indirecta (UHI) según sea el caso:

$$UHD = \frac{\text{Diámetro de Hemólisis directa (mm)}}{\text{hora} \times \text{mg de Proteína}}$$

$$UHI = \frac{\text{Diámetro de Hemólisis indirecta (mm)}}{\text{hora} \times \text{mg de Proteína}}$$

ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA A₂

La actividad es determinada por la disminución de la turbidez de una suspensión de yema de huevo por acción de la Fosfolipasa sobre la lecitina de la yema, cuantificada a 925 nm.

La actividad fosfolipásica se evaluó en dos sistemas: en tubo y en placa.

- a) En tubo (método turbidimétrico de Marinetti²⁹. Se incubó 100 uL de veneno (18,8 - 94 ug/mL) con 200 uL de una suspensión de yema de huevo al 5% (60 a 70% de lecitina correspondientes a 0,6 unidades de absorbancia a 925 nm) en buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 y 800 uL de NaCl 0,85%. Se estudió el efecto del tiempo de incubación (0 a 2 horas), sobre la actividad fosfolipásica del veneno. Una Unidad de actividad específica de Fosfolipasa (UEF), se expresa como la cantidad de enzima capaz de producir la disminución de la turbidez de la mezcla en una miliunidad de absorbancia a 925 nm, por minuto.

$$UEF = \frac{UF}{\text{mg de Proteína}}$$

Siendo:

$$UF = \frac{(\text{Abs. } 0' - \text{Abs. } 10') \times 1000}{\text{tie mpo (10 minutos)}}$$

UF corresponde a unidades de Fosfolipasa

- b) En placa, se empleó el método de Habermann y Hardt³⁰ que mide la formación de un halo claro producto de la hidrólisis de la lecitina por la Fosfolipasa. La placa de agar yema de huevo es preparada agregando 1 mL de suspensión de yema de huevo al 85% en acetato de amonio 100mM pH 7,4, al agar base a 50°C. Luego se homogeniza la mezcla y se reparte en las placas. Después de la gelificación se practican agujeros de 3 mm de diámetro para adicionar el veneno (9,4 - 94 ug/mL) o salino como control.

Las placas conteniendo veneno y control salino, se incubaron a 37°C, por períodos variables de tiempo (15-120 minutos), midiéndose a continuación

con un Vernier, el diámetro (mm) del halo. La enzima Fosfolipasa A de Páncreas Porcino (SIGMA P-6534) con actividad de 14500 unidades/mL (Una unidad hidroliza 1uM de L- α -fosfatidilcolina de soya hasta L- α -lisofosfatidilcolina y ácido graso por minuto a pH 8,0 y 37°C) fue empleada como estándar.

Para la evaluación de los resultados en placa se aplicó análisis de regresión lineal, considerándose como válidas aquellas concentraciones en donde el coeficiente de regresión r fue igual o superior a 0,99. Una unidad de actividad fosfolipásica (UF) en placa se expresa como la cantidad de proteína capaz de lisar 1 mm de gel en 1 hora de incubación y se determinó mediante la fórmula:

$$UF = \frac{\text{Diámetro de Hidrólisis (mm)} \times \text{hora}}{\text{mg de Proteína}}$$

ENSAYOS DE AUTODIGESTION:

Para evaluar la estabilidad de las fracciones, estas se sometieron a autodigestión incubándolas durante 18 horas a 23°C y luego cromatografiándolas según lo descrito para filtración en Sephadex.

CITOTOXICIDAD

La acción citotóxica del veneno de *B. hyoprurus* se estudió en macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c extraídos inoculando 3mL de MEM (Medio Esencial Mínimo) en la cavidad peritoneal. El líquido peritoneal es extraído y los macrófagos se adhieren en la-

minillas cubreobjetos las que son posteriormente mantenidas en MEM con Suero Fetal Bovino al 13% e incubadas en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂ hasta su uso. El efecto citotóxico, se determinó observando al microscopio de fluorescencia las laminillas previamente tratadas con 3mL de NaCl 0,85% conteniendo 10 ug/mL de diacetato de Fluoresceína, 120 ug/mL de Bromuro de etidio y 20 ug/mL de Naranja de acridina, a 24°C. Las células vivas se colorean de verde y las muertas lo hacen de color rojo, tomándose como parámetro cualitativo de observación: Leve (redondeo celular, +), Moderado (desprendimiento celular, ++) y Severo, (muerte celular, +++).

Para la evaluación de la citotoxicidad directa, se incubaron durante 15 minutos los macrófagos con MEM conteniendo veneno o fracción(50 - 100 ug/mL), y para la citotoxicidad mediada por sustrato, se incubaron por 15 minutos en MEM los macrófagos, el veneno o fracción(50 - 100 ug/mL) y 0,5 mL de suspensión de yema de huevo al 6% en NaCl 0,85%.

Para la evaluación de la citotoxicidad indirecta, se preincubó MEM conteniendo veneno o fracción (50 - 100 ug/mL) y 0,5 mL de suspensión de yema de huevo al 6% en NaCl 0,85% por 30 minutos a 50°C; Luego la mezcla fue agregada a los macrófagos e incubados por 15 minutos.

INMUNIZACION EN CONEJOS.

Se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda (machos de 1,5Kg), empleando dosis de 0,1 mL de veneno (10 mg/mL), según el esquema mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1. Esquema de inmunización para veneno de *B. hyoprurus* y sus fracciones en conejos.

Dosis	Día de Inmunización	Veneno o fracción (mL)	NaCl 0,85% (mL)	Adyuvante de Freund (mL)
1	1	0,1	-----	0,5 (completo)
2	5	0,1	-----	0,5 (incompleto)
3	9	0,1	-----	0,5 (completo)
4	13	0,1	0,5	----
Sangría	22			

La presencia o ausencia de anticuerpos en el suero de conejo inoculado con veneno fue evaluada empleando la técnica de inmunodifusión radial en gel de Ouchterlony³¹. Para la inmunodifusión se empleó Agarosa Tipo II-Low (Sigma) al 1% en buffer barbital (Sigma) a pH 8,6 con un diseño de un pozo central y 6 periféricos equidistantes.

En el pozo central se colocó el suero obtenido experimentalmente ó el suero comercial antibotrópico polivalente nacional³² (INS/MINSA, Perú) y en los restantes, el veneno control y las fracciones obtenidas de la purificación dejándose difundir las muestras durante 48 horas a 4°C. A continuación las placas se tiñeron con 0,1% Coomassie Blue 250-R (Sigma), y se decoloró en una solución 5:5:2 (v/v) de metanol, agua destilada y ácido acético glacial.

TITULACION DEL SUERO POR DOT-ELISA

Se empleó como antígeno, 1 ul de veneno o fracción equivalente a 2 ug de proteína, embebidos en círculos de papel de nitrocelulosa colocados en el fondo de los pocitos de placas de microtitulación; el suero experimental, un suero anticonejo obtenido en cabra 1/250 conjugado con fosfatasa alcalina. Como sustrato, Br-4-Cl-Indolilfosfato; como solución de bloqueo, PBS conteniendo Tween-20 al 0,05% y leche deshidratada de vaca al 8% se empleó como sustrato, 3,75 mg de NBT (Nitroblue tetrazolium, SIGMA) 1,8 mg de BCIP(5-Br-4-Cl-Indolilfosfato, SIGMA) diluidos en 37ul de N-N-dimetilformamida y disueltos en 7,5mL de buffer fosfato alcalino^{33, 34}. Se ensayaron diluciones de 1/50 a 1/12800.

WESTERN-BLOT.

La electroforesis en poliacrilamida al 10% (PAGE), del veneno, sus funciones y estándares se realizó según el método antes indicado. Se empleó marcadores pre-

coloreados de alto peso molecular (SIGMA MW-SDS-Blue): Triosa fosfato Isomerasa (26,6 Kd), Deshidrogenasa láctica (36,5 Kd), Fumarasa(48,5 Kd), Piruvato quinasa (58 Kd), Fructuosa-6-fosfato quinasa (84 Kd), β -Galactosidasa (116 Kd) y α 2-Macroglobulina (180 Kd); marcadores de bajo peso molecular (SIGMA MW-SDS-70): Lisozima (14,3 Kd), β -Lactoglobulina (18,4 Kd), Tripsinógeno (24 Kd), Pepsina (34,7 Kd), Albúmina de huevo (45 Kd), Albúmina bovina (66 Kd). Las muestras fueron distribuidas en dos mitades del gel, manteniendo la ubicación, una mitad del gel fue coloreado con Coomassie blue G-250 en ácido perclórico al 5%. La otra mitad fue empleada para la transferencia electroforética utilizando papel de nitrocelulosa de 0,2 micras de poro como membrana de transferencia y Tris 25 mM-glicina 5,5% en metanol al 20%, como buffer de transferencia. Para la transferencia se aplicó 0,2 miliamperios/placa durante 18 horas.

La membrana de nitrocelulosa inmunotransferida fue cortada en tiras siguiendo los rastros de la corrida; se coloreó con tinta china las tiras de los patrones de peso molecular, mientras que las tiras con el veneno y las fracciones fueron tratadas con coomasie blue en forma similar a la inmunodifusión, preincubándolas por 45 minutos con el suero experimental (título no menor a 1/5000) antes de la conjugación.

RESULTADOS

CONTENIDO PROTEICO

El contenido proteico del veneno cristalizado fue estimado en 94,3% por el método de Lowry.

FILTRACION EN GEL SEPHADEX

El veneno fraccionado en Sephadex G-100 s.f. (Figura 1) eluyó en tres fracciones (FI, FII y FIII). Las actividades hemo-

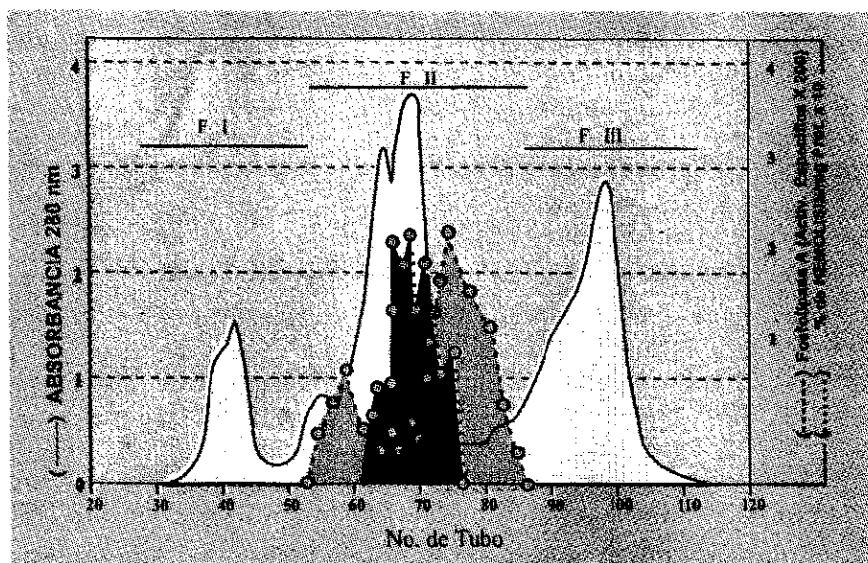


Figura 1. Filtración en gel Sephadex G-100 s.f. del veneno de *B. hyoprurus*. 100 mg de veneno diluido se aplicaron a una columna de 90 x 1,8 cm de gel Sephadex G-100 S.f. y se eluyeron a temperatura ambiente (22 - 25°C) con buffer acetato de amonio 0,2M pH 8,4, a un flujo de 6,3 mL/ hora. Las fracciones eluidas (2,1 mL/tubo) se colectaron en un colector de fracciones. La barra horizontal muestra el pool de tubos la Actividad Fosfolipásica y Hemolítica Indirecta. Se detectó en la fracción FII.

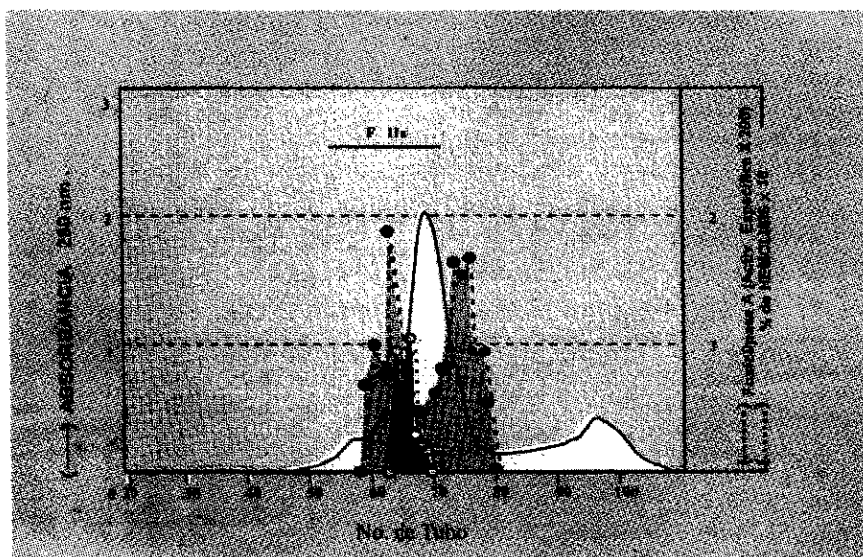


Figura 2. Filtración en gel Sephadex G-100 s.f. de la fracción FII del veneno de *B. hyoprurus*. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la figura 1. La barra horizontal muestra el pool de tubos con Actividad fosfolipásica y hemolítica indirecta (fracción FIIa1).

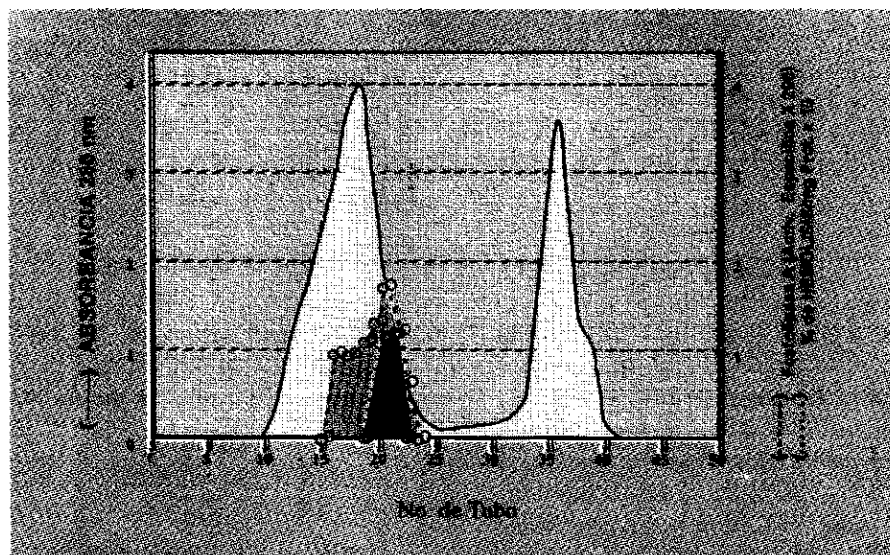


Figura 3. Filtración en gel Sephadex G-50 f. de la fracción FIIa del veneno de *B. hyoprurus*. 20 mg de la Fracción FIIa fueron aplicados a una columna de 100 x 1,0 cm de gel Sephadex G-50 F. y eluidas a temperatura ambiente con buffer bicarbonato de amonio 200 mM pH 8,4, a flujo constante de 6,0 mL/hora. Se colectaron fracciones de 2,0 mL/tubo. La barra horizontal muestra el pool de tubos con Actividad fosfolipásica y hemolítica indirecta (fracción FIIa1).

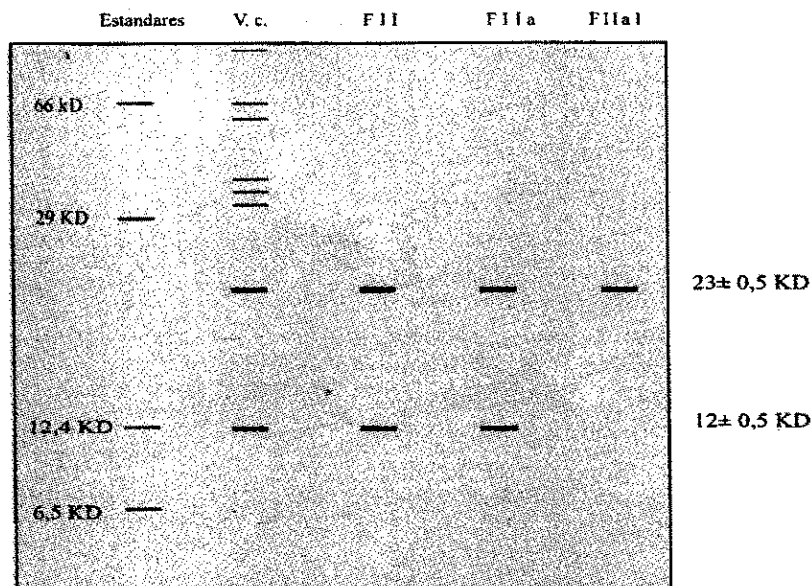


Figura 4. Esquema de SDS-PAGE del veneno cristalizado de *B. hyoprurus* y de las fracciones aisladas: FII, FIIa y FIIa1, estándares de peso molecular (BSA = 66 Kd, Anhidrasa carbónica = 29 Kd, Citocromo C=12,4 Kd y Aprotinina = 6,5 Kd)

Tabla 2. Fraccionamiento del veneno de *B. hyoprurus* en gel Sephadex G100 s.f y actividad fosfolipásica.

VENENO FRACCION	PROTEINA (mg a 280nm)	ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA*(UEF)	PURIFICACION
VENENO	180,90	210,06	1,00
FII	94,42	443,60	2,11
FIIa	23,20	532,02	2,53
FIIa1	17,28	787,94	3,75

* expresada en unidades de actividad específica.

lítica indirecta ($V_i/V_o = 1,77-2,14$) y fosfolipásica ($V_i/V_o = 1,542 - 2,28$) eluyeron conjuntamente en la fracción FII. La fracción FII fue reunida, concentrada mediante liofilización y recromatografiada bajo las mismas condiciones, obteniéndose la fracción FIIa con V_i/V_o muy similar a FII (1,88 - 2,0 para la actividad hemolítica y 1,41 - 2,25 para la actividad fosfolipásica) (Figura 2). Luego de la filtración en Sephadex G-100 s.f. se logró una purificación de 2,11 veces para la actividad de Fosfolipasa. (Tabla 2)

La fracción FIIa fue concentrada y filtrada en Sephadex G-50f eluyendo en dos picos mayores de los cuales solo en el primero de ellos, FIIa1, se detectó la actividad fosfolipásica. (Figura 3)

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR APARENTE

El peso molecular aparente para las fracciones con actividad hemolítica indirecta y fosfolipásica fue estimado en $12 \pm 0,5$ Kd en la fracción de mayor actividad, mientras que la fracción con menor actividad fosfolipásica presentó dos picos de actividad máxima con pesos moleculares de 12 y 23 Kd respectivamente.

Por SDS-PAGE desnaturizante el veneno presenta ocho bandas proteicas con pesos moleculares de 73, 59, 55, 40, 38, 35, $23 \pm 0,5$ y $12 \pm 0,5$ Kd (Figura 4). El patrón electroforético de las fracciones FII y FIIa mostró dos bandas a $23 \pm 0,5$ y $12 \pm 0,5$ Kd coincidiendo con lo hallado

en la filtración en Sephadex. La fracción FIIa1 mostró una sola banda de $23 \pm 0,5$ Kd. No se apreciaron bandas menores. (figura 4)

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO (PI)

La fracción FIIa1 con actividad fosfolipásica se visualizó a pH 8,35. (figura 5)

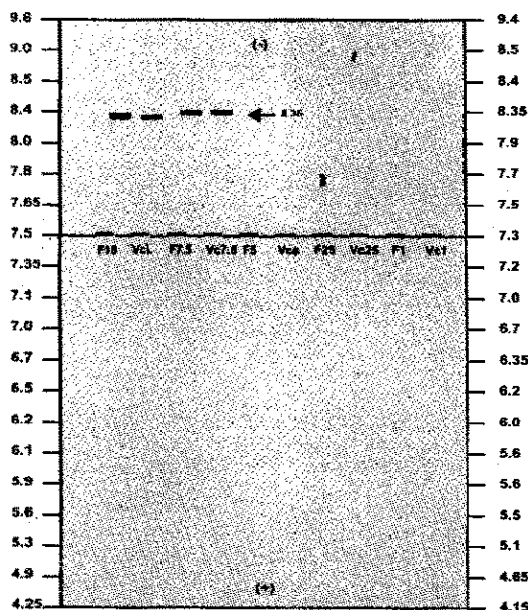


Figura 5. Esquema de Isoelectroenfoco del veneno cristalizado de *B. hyoprurus* y de sus fracciones parcialmente purificadas. Las flechas indican el pH de secciones de 1 cm del gel así como la ubicación del lugar de revelado de la Fosfolipasa A correspondiente al punto isoelectrónico de 8,35. F= Fracción FIIa1, V= Veneno crudo, ambos a 10mg/mL

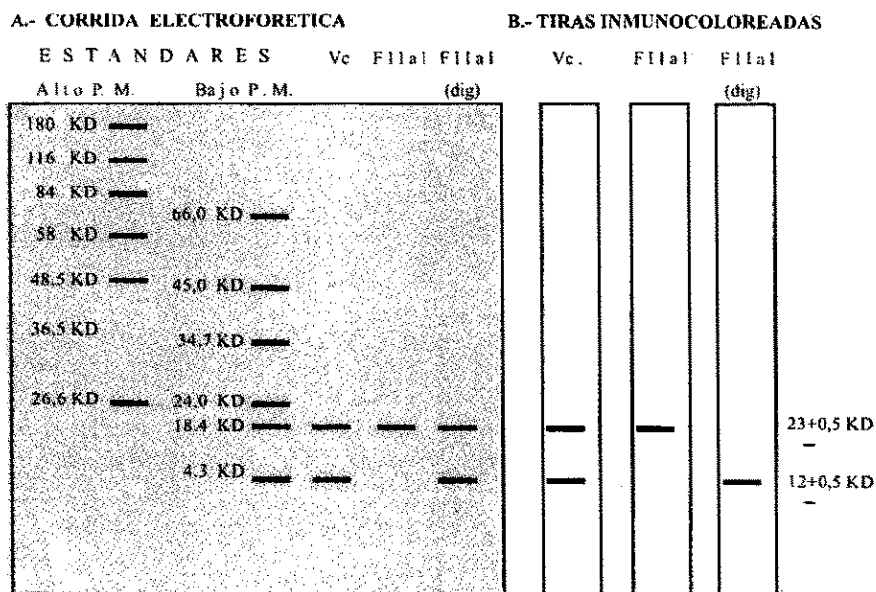


Figura 6. Estabilidad de la fracción FIIa1. Filtración en gel de Sephadex G-50 fino de la fracción FIIa1 sometida a autodigestión. Las condiciones de cromatografía fueron similares a las descritas en la figura 3. La barra horizontal muestra el pool de tubos con Actividad Fosfolipásica y la flecha, el pico de máxima Actividad Específica en la fracción FIIa1 original

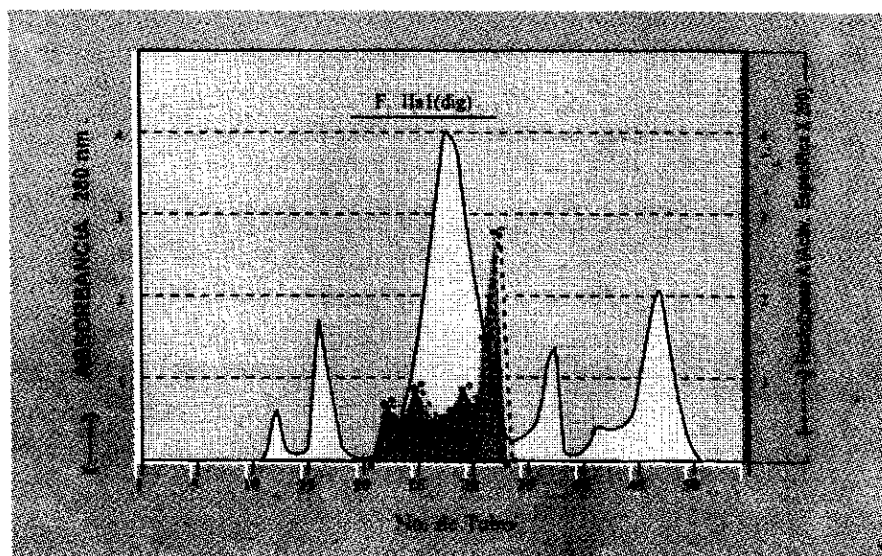


Figura 7. Análisis de Western Blot de veneno de *B. hyporrhorus* y sus fracciones FIIa y FIIa dig. En (A) se muestra el diagrama de la corrida electroforética (PAGE-SDS al 10%) donde Vc= veneno crudo, fracciones FIIaI y FIIaI dig. Marcadores de alto peso molecular pre-coloreados: Triosafosfato isomerasa (26,6 Kd), Deshidrogenasa láctica (36,5 Kd), Fumarasa (48,5 Kd) Piruvato quinasa (58 Kd), fructosa-6-fosfato quinasa (84 Kd), β -galactosidasa (116 Kd) y alfa macroglobulina (180Kd) Marcadores de bajo peso molecular: Lisozima (14,3 Kd), b-lactoglobulina (18,4 Kd), Tripsinógeno (24 Kd), pepsina (34,7 Kd), albúmina de huevo (45 Kd) y albúmina bovina (66 Kd) En (b) se muestran las tiras de nitrocelulosa incubadas con antisuero de conejo e inmunocoloreadas.

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LA FRACCION FOSFOLIPASICA

La fracción FIIa1 (23 Kd) fue sometida a autodigestión y cromatografiada en Sephadex G-50, eluyendo en cinco picos de proteína. En el tercero de ellos se ubicó a la actividad de Fosfolipasa, denominándola Fracción FIIa1 dig (digerida) con un volumen de elución mayor al de FIIa1 sugiriendo un peso molecular aparente menor. (Figura 6)

INMUNODIFUSION RADIAL Y TITULACION POR DOT-ELISA

Al enfrentar el veneno cristalizado con el antisuero equino antibotrópico polivalente se observan siete bandas de precipitación, mientras que la fracción FIIa1 presentó solo dos bandas con el mismo antisuero.

Al enfrentar el suero experimental con el veneno completo se visualizó dos bandas de precipitación con un título superior a 1/12800 por Dot-ELISA. Al enfrentar el suero experimental con la fracción FIIa1, no se formaron bandas a pesar de tener un título superior a 1/12000 por Dot-ELISA con el mismo antisuero.

WESTERN-BLOT

En el gel teñido con Coomassie se apreciaron ocho bandas en el veneno completo, una banda de $23 \pm 0,5$ Kd en la fracción FIIa1, dos bandas de $23 \pm 0,5$ y $12 \pm 0,5$ Kd en la fracción FIIa1 (digerida). En las tiras de western blot, el veneno cristalizado presentó dos bandas de $23 \pm 0,5$ Kd y $12 \pm 0,5$ Kd; la fracción FIIa1 mostró una banda de $23 \pm 0,5$ Kd y la fracción FIIa1 (digerida) una sola banda a $12 \pm 0,5$ Kd. (Figura 7)

Figura 8.
Actividad hemolítica y fosfolipásica del veneno de *B. hyoprurus* en placa de agar yema de huevo.
En (a) se observan los halos de lisis en placas conteniendo agar yema de huevo eritrocitos. Veneno crudo ($v_c=100$ ug/mL, $V_c1=47$ ug/mL). Fracción FIIa ($FIIa=47$ ug/mL). Nótese el halo de hemólisis que se aprecia luego de haber aplicado las muestras.

En (b) se estudia la actividad fosfolipásica del veneno crudo ($V_c=47$ ug/mL). Fracción FIIa ($FIIa=47$ ug/mL) y la Fosfolipasa pancreática estándar (PhP=3000 U.I.). Nótese el halo de lisis producido por el veneno y la fracción FIIa.

ACTIVIDAD HEMOLITICA.

Ni el veneno cristalizado ni las fracciones produjeron hemólisis directa en las condiciones estudiadas. En el sistema de hemólisis indirecta en tubo, el veneno provocó hemólisis, cuyo efecto máximo se alcanzó a concentraciones de 47 ug/mL o mayores y para 30 minutos de tiempo de incubación de la yema de huevo. El veneno cristalizado presentó 131,91 UEHI (62% de hemólisis), mientras que la fracción FIIa 136,17 UEHI.

En el sistema de hemólisis indirecta en placa se observó un aumento progresivo del diámetro del halo de hemólisis hasta los 60 minutos, siendo el efecto dependiente de la concentración. A la concentración de 47 ug/mL, el veneno cristalizado presentó 63,83 UHI y la fracción FIIa 85,1 UHI. La fracción FIIa tiene mayor actividad hemolítica (133%) con respecto al veneno cristalizado.

ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA

En el sistema en tubo el veneno provocó disminución de la turbidez de la mezcla de reacción en el ámbito de concentración de 23,5 a 141 ug/mL. A concentración de 47 ug/mL el veneno cristalizado tuvo 404,3 UEHI y la fracción FIIa tuvo 443,6 UEHI.

En el sistema en placa se observó un aumento progresivo del halo de hidrólisis dependiente de la concentración hasta los 60 minutos de incubación. A la concentración de 47 ug/mL el veneno cristalizado presentó 744,68 UF, mientras que la fracción FIIa tuvo 851,06 UF. (figura 8). Asimismo, el veneno cristalizado presentó una actividad equivalente a 1309 U/mg de proteína (Unidades de Fosfolipasa A₂ de páncreas porcino)

CITOTOXICIDAD

El veneno presentó actividad citotóxica directa mediada por sustrato e indirecta. Los efectos obtenidos son mostrados en la Tabla 3.

DISCUSION

El veneno de la serpiente *B. hyoprurus* posee actividad hemolítica y citotóxica, así como la enzima Fosfolipasa A.

Ambas actividades hemolítica indirecta y Fosfolipasa A, se encuentran íntimamente ligadas y coeluyen en el pico FII obtenido en columnas de Sephadex G100. Esta asociación se ha reportado también en otros venenos de serpientes^{2,16,30,35}. La filtración en gel, como método inicial de fraccionamiento y purificación, permitió detectar dichas actividades en una fracción definida (FIIa1).

Tabla 3. Citotoxicidad en macrófagos peritoneales de ratón, inducida por el veneno cristalizado y la fracción fosfolipásica FIIa1 de *Bothrops hyoprurus* sobre macrófagos

VENENO O FRACCION	PROTEINA (ug)	CITOTOXICIDAD		
		DIRECTA	POR SUSTRATO	INDIRECTA
VENENO	50	++	++	++
CRUDO	100	+++	+++	+++
FRACCION	50	+	+	+
FIIa1	100	+	++	++

+ = Efecto leve (redondeo celular)

++ = Efecto moderado (redondeo con desprendimiento celular)

+++ = Efecto severo (moderado y muerte celular)

La fracción fosfolipásica FIIa1, mostró una banda de $23 \pm 0,5$ Kd por SDS-PAGE con un punto isoelectrico de 8,35. Asimismo, los experimentos de autodigestión mostraron dos bandas una de $23 \pm 0,5$ Kd y otra de $12 \pm 0,5$ Kd en SDS-PAGE, lo que indicaría la presencia de un polipéptido sensible a la acción de las proteasas del veneno, y otro proteasa resistente a la acción de dichas proteasas. Esta hipótesis es avalada por los experimentos de Western-Blot donde sueros anti-FIIa1, enfrentados a FIIa1, reconocen una única banda de $23 \pm 0,5$ Kd., mientras que luego de la autodigestión de FIIa1 (FIIa1 digerida) los anticuerpos anti-FIIa1 reconocieron solo la banda de $12 \pm 0,5$ Kd, este hecho asociado al corrimiento de la actividad fosfolipásica en la filtración en G-50 (figura 6) sugiere que el polipéptido proteasa sensible de $23 \pm 0,5$ Kd es la Fosfolipasa A.

Estos resultados explicarían la presencia de dos picos de actividad fosfolipásica en la filtración en Sephadex G-100 del veneno crudo, ello probablemente debido a la acción degradativa, sobre la Fosfolipasa nativa, por acción de las proteasas presentes en el veneno cristalizado, ya que en el proceso de cristalización el veneno es mantenido durante 48 a 72 horas en una campana de vidrio al vacío y a temperatura ambiente.

La fracción FIIa1 posee capacidad antigénica, demostrada mediante la técnica de Dot-ELISA a pesar de que los anticuerpos de conejo no fueron capaces de inmunoprecipitar a la fracción FIIa1 en la prueba de inmunodifusión radial, a diferencia de los anticuerpos presentes en el antiveneno equino. Esto puede explicarse por posibles diferencias en la capacidad de unión entre complejos antígeno-anticuerpo, como reportan otros autores. El polipéptido proteasa resistente de $23 \pm 0,5$ Kd no mostró capacidad antigénica, ya que el suero hiperinmune

de conejo no fue capaz de detectarla en los experimentos de autodigestión, a pesar de ser visible por tinción con azul de coomassie.

Los pesos moleculares de $23 \pm 0,5$ Kd y $12 \pm 0,5$ Kd, calculados para las proteínas con actividad fosfolipásica en FIIa1, guardan relación con los reportados para otros venenos. Se descarta que sea una proteína dimérica como se ha reportado para la serpiente *B. neuwiedii*³⁶ ya que el SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes incluye condiciones fuertemente reductoras, mostrando en la fracción FIIa1 solo una banda de $23 \pm 0,5$ Kd y no dos o más.

La actividad específica de la Fosfolipasa del veneno cristalizado (404,3 UEF) permite clasificar a esta enzima en el grupo de venenos con actividad moderada si se lo comparamos con los de otras especies peruanas reportadas previamente³⁷: *B. brazili* (936 ± 35), *B. barnetti* (691 ± 32), *B. pictus* (663 ± 38), *B. atrox* (594 ± 36), *L. muta* (249 ± 36) y *C. durissus* t. (179 ± 32).

Los venenos botrópicos provocan severos daños locales, que incluyen la hemorragia, coagulación y necrosis local. En el modelo de citotoxicidad en macrófagos de ratón, se demuestra que el veneno cristalizado posee acción citotóxica directa. Aún cuando en este estudio no hemos aislado a la(s) fracción(es) citotóxica(s) presente(s) en el veneno, la fracción FIIa1 presentó pobre actividad citotóxica directa e indirecta. Es necesario recalcar, que en las condiciones experimentales en las que se efectuaron los ensayos de hemólisis y citotoxicidad, nuestros resultados sugieren que la fracción FIIa1, se encontraba en concentraciones lífticas para el glóbulo rojo pero sublífticas para los macrófagos, o que los macrófagos presentan una configuración de membrana deficiente en fosfatidilcolina (sustrato para la Fosfolipasa) que lo haría resistente.

AGRADECIMIENTOS

A los Sres. MSc. Jorge Arévalo Z. y Martín López C. por su apoyo en los experimentos de Western Blot e Inmunotransferencia. Este trabajo fue financiado parcialmente por CONCYTEC-PERU, y se realizó en el marco del Convenio de Cooperación Científica y Docente suscrito entre el Instituto Nacional de Salud y la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El Trabajo experimental se efectuó en el laboratorio de farmacología, afiliado al INS.

BIBLIOGRAFIA

- Olascoaga, M.E.; Zavaleta, A. Farmacología del veneno de *Bothrops pictus* (Jergón de costa). Rev. Cuerpo médico-Hosp. Guillermo Almenara Irigoyen. 1990;1: 31-34.
- Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Venomous animals and their venoms. Bucherl W., Buckley E. ed. First edition, New York: Academic Press; 1971: 345-381.
- Otero R. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Edit. Universidad de Antioquia. Colombia. 1994.
- Arévalo, J. Ofidismo en Loreto. Tesis para optar el grado de Bachiller en Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 1965.
- Silva, J.J. Las serpientes del género *Bothrops* en la amazonía colombiana. Aspectos biomédicos (Epidemiología, clínica y biología del ofidismo). Acta médica Colombiana 1989; 14: 148-165.
- Chang N.J., Zavaleta A. Ofidismo en el Hospital General de La Merced: estudio retrospectivo de 116 casos. Diagnóstico. 1987; 20(4): 115-120.
- Lama Valdivia J.E. Ofidismo en cuatro hospitales de Lima, Tesis de Bachiller en Medicina, Univ. Cayetano Heredia, Perú. 1991.
- De La Vega, E.; Zavaleta, A.; Carrillo, N.; Trelles, L. Accidentes producidos por animales ponzoñosos: serpientes venenosas del Perú. En: Anales de seminario nacional de zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria.: 169-88. Programa Nacional de Control de Zoonosis, Ministerio de salud. Ceres Editora, Lima. 1989.
- Ministerio de Salud, Perú. (1995). Norma Operativa sobre Prevención y Tratamiento de accidentes por animales ponzoñosos. Dirección General de Salud de las Personas, Programa Nacional de Control de Zoonosis. Lima, imprenta Ministerio de Salud. 77 pp.
- Nisembom, H. E.; Perazzo, J. C.; Monserrat, A. J.; Vidal, J. C. Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (Víbora de la cruz) venom. Toxicon 1986; 24: 807-817.
- Mebs, A.; Samejima, Y. Isolation and characterization of mitotoxic phospholipase A₂ from crotalid venom. Toxicon. 1986; 24(2): 161-68.
- Lee, C-Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. Annu. Rev. Pharmacol. 1972; 12: 265-286.
- Marsh, N. A.; Whaler, B. C. The Gaboon viper (*Bitis gabonica*): Its biology, venom components and toxicology. Toxicon. 1984; 22(5): 669-694.
- Miranda, M.; et al. Resistencia de *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops neuwiedii* a la neurotoxicidad de cantidades masivas de veneno crotálico. Acta Physiol. Latinoam. 1982; 32: 103-115.
- Gutiérrez, J. M.; Avila, C.; Rojas, E.; Cerdas, L. An alternative in-vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. Toxicon 1984; 26(4): 411-413.
- Condrea, E. Hemolytic effects of snake venoms. en: Snake venoms. Handbook Exp. Pharmacol. 1979. Vol. 52. Lee, C-Y (ed.). Berlin, Springer-Verlag.
- Cruz, L.; Yarleque, A. Hemólisis de eritrocitos humanos por acción del veneno de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. Boletín de la Sociedad Química del Perú. 1984. Vol. 1
- Martínez, C.E., C. Bonilla & A. Zavaleta. 1989. Acción hemolítica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* "macanche" sobre eritrocitos humanos. Bol. Soc Química Perú 56: 1-12.
- Da Silva M.H.; Guilmerme, O. Titration of antiserum to south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A₂ activity. Toxicon. 1981; 20: 563-569.
- Gómez-Leiva, M.A. A comparative study of hemolysis by viperid snake venoms on erythrocytes. En: Toxins, animal, plant and microbial Proceedings of the fifth International Symposium on animal, plant and microbial toxins. (P. Rosenberg P.; Ed). Pergamon Press, Oxford. 1976.
- Moreno, E.; Alape, A.; Sánchez, M.; Gutiérrez, J.M. A new method for the detection of phospholipase A₂ variants: Identification of isoenzymes in the venoms of newborn and adult *Bothrops asper* (terciopelo) snakes. Toxicon 1988; 26(4): 363-371.

- 22 Woll, P. Aislamiento y purificación parcial de una fosfolipasa A en el veneno de la serpiente *Lachesis muta m.* Análisis de algunos métodos usados en la determinación de su actividad. Tesis para optar el grado de bachiller en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 1976.
- 23 Rodríguez G, M.; Zavaleta M-V, A.; Salas A, M. Inactivación parcial de la actividad fosfolipásica del veneno de *Lachesis muta muta* mediante el empleo de irradiación gamma. Boletín del Instituto Nacional de Salud-Perú. 1996; 2(3): 26.
- 24 Rodríguez G, M.; Zavaleta M-V, A.; Salas A, M. Efectos de la irradiación gamma sobre la actividad fosfolipásica del veneno de *Bothrops hyoprurus* (ofidia, Viperidae). Boletín del Instituto Nacional de Salud-Perú. 1996; 2(3): 27.
- 25 Stauffer, C. E. A linear standard curve from the Folin Lowry determination of protein. Analytical Biochemistry. 1975; 69: 645-648.
- 26 Laemmli, U. K. Clavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680.
- 27 Berthelmer, A. W.; Weinstein, S. A.; Linder, R. Isoelectric analysis of some Australian elapid snake venoms with especial reference to phospholipase B and hemolysis. Toxicon 1986; 24: 841-849.
- 28 International Comitee For Standarization In Haematology. Recommendation for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977). Journal of Clinical Pathology. 1978; 31:139- 143.
- 29 Marinetti, G. V. The action of phospholipase A on lipoproteins. Biophys. Acta. 1965; 98: 554-565.
- 30 Habermann, E.; Hardt, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipase. Analytical Biochemistry. 1972; 50: 163-173.
- 31 Oucherlony, O.; Nilson, L. A. Handbook of experimental immunology. 2ª.ed. Oxford Blackwell VI. Cap. 19.0.34. 1967.
- 32 Instituto Nacional De Salud. Vademecum, Centro Nacional de Producción de Biológicos. Staff Publicitario, Lima. 1996.
- 33 Pappas, G. M.; Hajkowski, R.; Hockmeyer, T. W. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): A micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Imm. Meth. 1983; 64: 205-214.
- 34 Pappas, G. M.; Hajkowski, R.; Hockmeyer, T. W. Standarization of the Dot-enzyme linked Immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 33(6): 1105-1111.
- 35 Iwanaga, S.; Susuki, T. (1979). Enzymes in snake venoms. En: Snake venoms. Handbook. Exp. Pharmacol. 1978 Vol.52. Lee, C-Y (ed). Berlin, Springer-Verlag.
- 36 Vidal, J.C.; Cataneo, P.; Stoppani, O.M. Some characteristic properties of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1972; 151: 168-- 179.
- 37 Alvarez, M, T. Actividad de Fosfolipasa A₂ del veneno de crotálidos peruanos Tesis para optar el grado de Bachiller en Biología. Universidad Ricardo Palma. Lima. 1988.

