

## EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops bilineatus* “LORO MACHACO”

Edith Rodríguez<sup>1</sup>, Gladys Cahuana<sup>1</sup>, Gustavo A. Sandoval<sup>1</sup>,  
Mirtha Yarleque<sup>1</sup> y Armando Yarleque<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

*Bothrops bilineatus* es una serpiente arborícola causante de numerosos accidentes humanos en la amazonía peruana. A partir del veneno completo se ha realizado una exploración de la actividad coagulante empleando plasma citratado y fibrinógeno comercial, así como diversos sustratos cromogénicos. Para ello, se han realizado ensayos de tiempo de coagulación con plasma humano citratado y fibrinógeno bovino 5 mg/ml en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, midiéndose también la actividad amidolítica sobre BApNA y esterásica sobre TAME y BAEE. Adicionalmente, el veneno fue fraccionado en una columna de filtración molecular de Sephadex G-100 con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0, analizando la actividad enzimática en cada una de las fracciones. Además, se ha obtenido el perfil electroforético mediante análisis de PAGE-SDS. Como resultado de este estudio se ha determinado que el veneno total de *B. bilineatus* posee una actividad de 0,59 U/mg sobre plasma y 0,17 U/mg sobre fibrinógeno, siendo estos valores 60% menores en comparación con el veneno ofídico más coagulante estudiado en el Perú (*Lachesis muta*). Así también, las fracciones con actividad coagulante están asociadas a la actividad amidolítica y esterásica. El perfil cromatográfico obtenido corresponde a tres picos proteicos eluidos con valores de Ve/Vo de 1,1, 1,5 y 2,4, mientras que los electroferogramas obtenidos muestran al menos 10 bandas proteicas entre los 15 y 70 kDa.

**Palabras clave:** *Bothrops bilineatus*, veneno, coagulación.

## PRELIMINAR EVALUATION OF COAGULANT ACTIVITY OF *Bothrops bilineatus* PERUVIAN SNAKE VENOM “LORO MACHACO”

### ABSTRACT

*Bothrops bilineatus* is a tree snake whose bite causes many accidents in peruvian jungle. Using whole venom, we made an exploration of its coagulant activity using citrated plasma and commercial fibrinogen, as well as different chromogenic substrates. In this way, we assayed coagulation time on human citrated plasma and bovine fibrinogen 5 mg/ml in Tris-HCl buffer 0,05 M pH 7,4, and also amidolytic and esterase activities on BApNA, TAME y BAEE, respectively. On the other hand, this venom was fractionated in a size exclusion chromatography using Sephadex G-100 in ammonium acetate buffer 0,05 M pH 6,0, measuring coagulant and amidolytic activities on each fraction. Furthermore, we obtained electrophoretic profiles using SDS-PAGE gels. As a result of this study, we found *B. bilineatus*

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú

\* e-mail: ayarlequec@unmsm.edu.pe

venom has activity on plasma (0,59 U/mg) and fibrinogen (0,17 U/mg), being these values 60% lower in compare with the most coagulant venom studied in Peru (*Lachesis muta*). Also, fractions obtained with coagulant activity were associated with amidolytic and esterase activities. Chromatographic profiles showed three main peaks eluted with  $V_e/V_o$  of 1,1, 1,5 and 2,4, respectively, while electropherograms obtained, at least 10 protein bands between 15 and 70 kDa.

**Key word:** *Bothrops bilineatus*, venom, coagulation.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de los componentes de venenos de serpientes que afectan el sistema hemostático no sólo implica el conocimiento de sus características químicas y de sus efectos biológicos sino también de otras características bioquímicas, farmacológicas, fisiológicas e inmunológicas<sup>1</sup>. Entre los principales procesos afectados por la acción de estas ponzoñas, se encuentra la coagulación sanguínea, la cual es el resultado de un complicado proceso cuya etapa final es la transformación del fibrinógeno a fibrina por acción de la trombina<sup>2</sup>.

En nuestro país, se han realizado investigaciones sobre la capacidad coagulante de los venenos ofídicos<sup>3,4</sup>, incluyendo diversas especies del género *Bothrops* y el veneno de la serpiente *Lachesis muta*, determinándose que este último presente la mayor actividad coagulante tanto sobre plasma humano como sobre fibrinógeno comercial<sup>5</sup>. Sin embargo, existen pocos estudios utilizando el veneno de las serpientes arborícolas, los cuales presentan marcadas diferencias en su acción biológica, con respecto a las demás serpientes<sup>6</sup>. Dentro de las serpientes arborícolas presentes en el Perú, se encuentra *Bothrops bilineatus*, comúnmente llamada “loro machaco”; es una serpiente venenosa cuyo color verde intenso suele ser motivo para confundirla con la boa *Corallus caninus*, especie que no posee veneno y por esta razón los pobladores nativos suelen destruir a esta última temiendo recibir una mordedura. Morfológicamente *B. bilineata* tiene las siguientes características: su tamaño varía entre 60 a 80 cm, su cabeza es triangular con pequeñas escamas de color verde, las cuales muestran un tramado a manera de puntos oscuros; todo el dorso hasta la cola es de color verde turquesa y el vientre crema con estriaciones transversales<sup>7</sup>. Aunque su distribución es amplia en la selva peruana, se le encuentra con mayor frecuencia en los departamentos de Amazonas, Loreto, San Martín y Junín.

Nuestro interés en el estudio del veneno de *Bothrops bilineatus* tiene como origen el conocimiento de la acción de esta serpiente sobre presas que no sólo pueden trepar árboles, como los roedores u otros pequeños mamíferos, sino también sobre las aves de las que eventualmente pueden alimentarse, ya que el hecho de que la serpiente venenosa es arborícola indica que las principales proteínas bioactivas de este veneno estarían dirigidas a inmovilizar aves y mamíferos trepadores considerados como sus presas predilectas, las cuales por su movilidad podrían escapar muy fácilmente al ataque de estas serpientes a no ser que su veneno produjera un severo e inmediato cuadro de intoxicación<sup>8</sup>. Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar una evaluación preliminar del veneno de *B. bilineatus* relacionada principalmente con su actividad coagulante sobre sustratos naturales como el plasma y el fibrinógeno, así como sobre sustratos sintéticos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Veneno

Se empleó veneno de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus* obtenido a partir de ejemplares procedentes de la región de Pucallpa, departamento de Ucayali y mantenidos en cautiverio en

el serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural (UNMSM). La extracción de la ponzoña se realizó por presión manual de las glándulas, siendo este fluido liofilizado y conservado a 4 °C hasta su utilización.

### **Contenido proteico**

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm<sup>9</sup> en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02. Además, se empleó el método de Lowry<sup>10</sup> modificado en nuestro laboratorio<sup>3</sup> utilizando un fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, y empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

### **Actividad coagulante**

Se midió la capacidad de coagulación del veneno crudo sobre el plasma humano citratado, en comparación con el fibrinógeno bovino comercial. Para ello se extrajo sangre venosa de personas voluntarias, la cual fue mezclada con citrato de sodio al 3,8% y centrifugada por 20 minutos a 1000 rpm, obteniéndose la fracción sobrenadante correspondiente. Para los ensayos se tomaron 0,2 ml de plasma citratado y 0,1 ml de veneno crudo a diversas concentraciones, incubándose las muestras a 37 °C hasta la obtención del coágulo total y registrándose los tiempos en segundos<sup>4</sup>. Asimismo se probó la actividad del veneno sobre una solución de fibrinógeno bovino 5 mg/ml. en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Una unidad de actividad (U) se define como la inversa del tiempo de coagulación en segundos.

### **Actividad amidolítica**

Se determinó según el método de Erlanger et al.<sup>11</sup>, para lo cual se preparó una mezcla que contenía 2 ml de sustrato BApNA (benzoyl arginil *p*-nitroanilida)  $9 \times 10^{-4}$  M, 0,6 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,1 y 0,1 ml del veneno crudo. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C por 10 minutos deteniéndose la reacción con 0,6 ml de ácido acético al 60% para luego medir su absorbancia a 405 nm. Una unidad de actividad (U) es expresada como  $\mu$ moles de *p*-nitroanilida liberados por minuto.

### **Actividad esterásica**

Esta actividad fue ensayada siguiendo el método de Devi et al.<sup>12</sup> utilizando 1 ml del sustrato TAME (tosil arginil etil éster) o BAEE (benzoyl arginil etil éster) 2 mM y 1,9 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,5. La mezcla se incubó por 3 min a 37 °C adicionándose a continuación 0,1 ml del veneno crudo y registrándose los incrementos de absorbancia a 247 nm hasta 10 minutos. Una unidad de actividad (U) corresponde a la cantidad de  $\mu$ moles de TAME o BAEE hidrolizados por minuto.

### **Fraccionamiento cromatográfico**

El veneno liofilizado (60 mg) fue resuspendido en solución buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0, eliminándose los restos insolubles por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue aplicado a una columna de filtración molecular de Sephadex G-100 SF (1,5 x 46,5 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0. La elución se realizó a temperatura ambiente colectándose fracciones de 2 ml en un colector automático Pharmacia 121 LKB. La elución de las proteínas de la columna se realizó con el mismo buffer y se estimó la actividad enzimática de cada fracción obtenida sobre BApNA.

### **Análisis electroforético**

Se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes con SDS (PAGE-SDS)<sup>13</sup>. La corrida electroforética se realizó aplicando 100 V constantes durante 1 h. Luego el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie 0,1% por 10 min, para luego ser decolorado hasta evidenciar las bandas proteicas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad enzimática del veneno de *B. bilineatus*

El veneno completo de *Bothrops bilineatus* fue capaz de coagular el plasma humano citratado y el fibrinógeno bovino, donde se encontraron actividades específicas de 0,59 y 0,17 U/mg, respectivamente (tabla 1). Dicha ponzoña también mostró capacidad para hidrolizar sustratos sintéticos como el BApNA con una actividad específica de 0,018 U/mg, mientras que sobre ésteres sintéticos de arginina como el TAME y el BAEE mostró una actividad de 1,04 U/mg y 0,85 U/mg, respectivamente.

Tabla 1. Actividad enzimática del veneno total de *Bothrops bilineatus* sobre diferentes sustratos en comparación con el veneno de *Lachesis muta*

Sustrato	pH	Actividad específica (U/mg proteína)	
		<i>B. bilineatus</i>	<i>L. muta</i>
Plasma citratado	7,4	0,59	1,60
Fibrinógeno bovino	7,4	0,17	1,73
BApNA	8,1	0,018	0,078
TAME	7,5	1,04	7,16
BAEE	7,5	0,85	3,95

### Separación cromatográfica del veneno de *B. bilineatus*

Empleando una cromatografía en Sephadex G-100 SF (figura 1), el veneno fue fraccionado en tres picos de proteína con valores de  $V_e/V_o$  correspondientes a 1,1, 1,5 y 2,4, respectivamente. Además, se encontró que las fracciones correspondientes al primer pico presentaron actividad enzimática sobre BApNA.

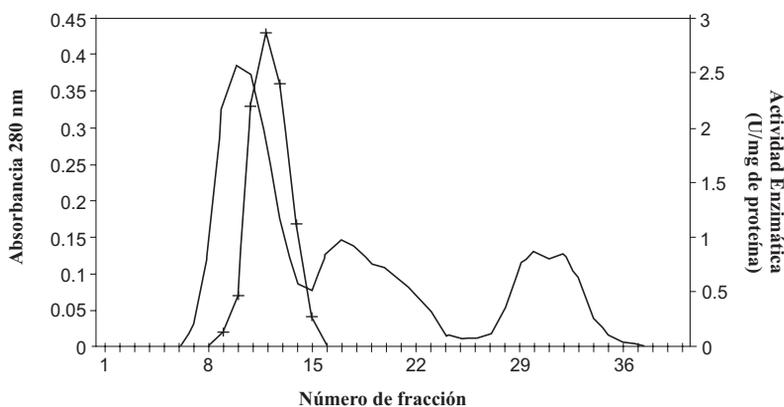


Figura 1. Cromatografía de filtración molecular del veneno de *Bothrops bilineatus* empleando Sephadex G-100 SF. Absorbancia a 280 nm (---) y actividad amidolítica sobre BApNA (++++)

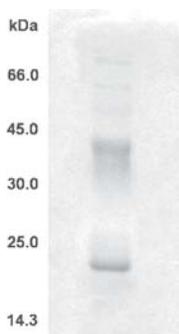


Figura 2. Perfil electroforético del veneno de *Bothrops bilineatus* empleando PAGE-SDS (10%)

### Perfil electroforético

La figura 2 muestra el patrón proteico obtenido para el veneno de *B. bilineatus* mediante PAGE-SDS en condiciones no reductoras empleando geles de poliacrilamida al 10%. Del análisis respectivo se pudieron detectar al menos 10 bandas proteicas, comprendidas en el rango de peso molecular de 14 a 70 kDa. Además, el mayor número de bandas se agrupó alrededor de los 40 kDa.

El mecanismo de coagulación sanguínea es un proceso complicado que tiene como finalidad la conversión del fibrinógeno plasmático (factor I) en fibrina por acción de una proteasa específica, la trombina, que hidroliza los enlaces arginil-glicil del fibrinógeno. La molécula del fibrinógeno presenta una estructura trinodular; está formada por tres pares de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro; tales cadenas son 2 A $\alpha$ , 2 B $\beta$  y 2  $\gamma$ . La propiedad coagulante de la trombina radica en la liberación de dos pares de pequeños péptidos polares, los fibrinopéptidos A y B de las cadenas A $\alpha$  y B $\beta$ , respectivamente, convirtiendo al resto de la molécula en el monómero de fibrina. Estos monómeros, a su vez, se polimerizan espontáneamente mediante dos diferentes clases de interacciones moleculares, “extremo a extremo” y lateral, para formar el coágulo insoluble de fibrina.

### Actividad enzimática del veneno de *B. bilineatus* sobre diferentes sustratos

En el presente estudio se evaluó la capacidad coagulante del veneno de *B. bilineatus* utilizando en primer lugar sustratos naturales como el plasma citratado y el fibrinógeno comercial<sup>14</sup>. Por un lado la acción coagulante sobre el plasma indica la presencia de compuestos activadores de la cascada de coagulación sanguínea, los cuales varían tanto en su concentración, así como en su actividad y especificidad. Por otro lado, el veneno de *B. bilineatus* pudo coagular el fibrinógeno bovino, indicando que presenta dentro de su composición al menos una enzima con actividad similar a trombina.

La evaluación de las propiedades cinéticas de enzimas coagulantes presentes en los venenos y que estén relacionados con la coagulación sanguínea es complicada por dos hechos: 1) la naturaleza del sustrato: una proteína y 2) la especificidad de la enzima. Si bien se puede establecer la naturaleza coagulante de un veneno utilizando sustratos naturales, como el plasma citratado o fibrinógeno bovino, se requiere de sustratos sintéticos que imiten las estructuras involucradas en el enlace peptídico del sustrato original y que faciliten su detección en un ensayo *in vitro*<sup>15</sup>. Este tipo de compuestos posee en su extremo carboxilo terminal, un grupo cromógeno como la *p*-nitroanilida, el cual es liberado como parte de la hidrólisis y es detectado espectrofotométricamente a 405 nm.

De los ensayos con sustratos sintéticos, se encontró que el veneno de *B. bilineatus* presentó actividad amidolítica sobre BApNA y esterásica sobre TAME y BAEE. En el caso del BApNA, este tipo de sustrato permite la caracterización de enzimas del grupo de las serinoproteasas como la tripsina y quimiotripsina y al cual pertenecen diversas enzimas coagulantes como las enzimas similares a trombina y los activadores de diversos factores de coagulación, entre ellos la protrombina y el factor X<sup>16</sup>. Por otro lado, el empleo del TAME y el BAEE, por su estructura molecular, permite la caracterización de enzimas que hidrolizan el enlace éster entre la arginina y el grupo metilo. La capacidad del veneno completo para hidrolizar este tipo de sustratos nos indica que están presentes enzimas que pertenecen al gran grupo de proteasas esterásicas<sup>12</sup>. Este análisis también fue realizado utilizando el veneno completo de *Lachesis muta*, empleando tanto sustratos naturales como cromogénicos para su caracterización<sup>4</sup>.

El análisis comparativo de la actividad coagulante de los venenos de *B. bilineatus* y de *Lachesis muta* (tabla 1), señala claramente que el primero de ellos sólo registra un 40% de la actividad coagulante registrada en su homóloga, lo que en apariencia puede significar una pobre acción coagulante del veneno en estudio. Habiendo determinado que el veneno crudo es capaz de coagular el fibrinógeno y el plasma citratado, resulta necesario explorar la existencia de proteínas que participen en esta acción, entre ellas la enzima similar a trombina y algunos de los factores procoagulantes<sup>2</sup>. Así, tenemos que la serpiente arborícola *Agkistrodon acutus*, llamada víbora de cinco pasos y que habita en el sudeste asiático, tiene una potente acción cardiotoxica. Del mismo modo, en la selva del noreste y en la región central del África habitan las especies arborícolas del género *Dendroaspis*, conocidas como “mambas”, las cuales son temidas por su agresividad, velocidad de desplazamiento y por su potente veneno neurotóxico. Por ello, asumimos que el veneno de *B. bilineatus* podría contener otros principios activos que afectarían directamente el sistema circulatorio produciendo severos desórdenes responsables de una rápida y masiva coagulación y por tanto, de la falta de oxigenación tisular.

#### **Patrón electroforético del veneno de *B. bilineatus***

Los venenos de serpientes son consideradas mezclas complejas de diversos componentes proteicos, comprendiendo tanto enzimas como toxinas<sup>17</sup>. Una de las técnicas más empleadas para su estudio es la electroforesis en geles de poliacrilamida<sup>13</sup>, la cual se basa en la migración de proteínas a través de un campo eléctrico. Esta técnica es útil como un método analítico, ya que las proteínas pueden ser separadas y visualizadas, sean analizadas en su conformación nativa como denaturada.

A fin de realizar un análisis inicial de los componentes proteicos del veneno de *B. bilineatus*, se realizaron electroforesis mediante la técnica de PAGE-SDS<sup>13</sup> (figura 2). Los resultados muestran un patrón característico distinto para el contenido proteico de este veneno comparado con otros venenos de serpientes descritos previamente por nuestro laboratorio<sup>5</sup>. Se pudieron observar bandas notorias concentradas entre los 20 y 40 kDa, además de bandas proteicas alrededor de los 50 y 70 kDa. Estos pesos moleculares indicarían la presencia de compuestos como las miotoxinas (20-25 kDa), hemorraginas (19-20 kDa), proteínas coagulantes (30-40 kDa), así como L-aminoácido oxidasa (60 kDa). Es claro notar que la diversidad de compuestos proteicos así como la abundancia y posición relativa de las bandas electroforéticas permite hacer una clara distinción entre este veneno con otros descritos previamente<sup>18</sup>.

### **CONCLUSIONES**

La presente investigación ha permitido de forma preliminar que el veneno de la serpiente arborícola peruana *Bothrops bilineatus* actúa sobre diversos componentes de la cascada de coagulación, entre ellos el fibrinógeno, activando esta importante vía y permitiendo una

rápida inmovilización de sus presas. Además, el veneno de esta serpiente presenta un patrón particular de proteínas lo cual permitirá su rápida identificación.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen a la International Foundation for Science (IFS) de Suecia, por su importante y valiosa ayuda financiera para la ejecución de investigaciones sobre principios coagulantes de venenos de serpientes peruanas.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Braud S., Bon C., Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000;82(9-10):851-9.
2. Stocker K. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: Stocker K (ed): *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, CRC Press, 1990, pp 97-160.
3. Loayza S., Morante Y., Campos S., Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím Perú*. 1985;52(3):151-63.
4. Yarlequé A., Campos S., Escobar E., Lazo F., Sánchez N., Hyslop S. *et al*. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (peruvian bushmaster). *Toxicon*. 1989;27(11):1189-97.
5. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima: Fondo Editorial - UNMSM; 2000.
6. Campbell JA., Lamarck WW. The venomous reptiles of Latin America. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1989.
7. Carrillo N., Icochea J. Lista taxonómica de los reptiles vivientes del Perú. Lima: Publicaciones del Museo de Historia Natural-UNMSM. Serie A, N° 49; 1995.
8. Instituto Nacional de Salud. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima: El Instituto; 2004.
9. Warburg O., Christian W. Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z*. 1941;310:384-421.
10. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
11. Erlanger BF., Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
12. Devi A., Banerjee S., Copley AL. Coagulant and esterase activities of thrombin and *Bothrops atrox* venom. *Toxicon*. 1972;10(6):563-73.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
14. Lu Q., Clemetson JM., Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1791-9.
15. Friberger P. Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1982;162:1-298.
16. Kini RM. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005;34(4-5):200-4.
17. Chippaux JP., Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.
18. Boquet P. History of snake venom research. In: Lee C-Y (Ed). *Snake venoms (Handbook of experimental pharmacology: New Series; v. 52)*. Germany: Springer-Verlag; 1979. p. 3-14.