

## PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UN FACTOR DE DIFUSIÓN PRESENTE EN EL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops atrox* (JERGON)

Édgar González, César Ortiz<sup>1</sup>, Gustavo Sandoval<sup>1</sup>, Fanny Lazo<sup>1</sup>, Julio Delgadillo<sup>1</sup>, Edith Rodríguez<sup>1</sup>, Ruperto Severino<sup>2</sup> y Armando Yarleque<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

Se ha purificado un componente proteico de alto peso molecular del veneno de la serpiente peruana *B. atrox*, usando una cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 y una filtración molecular sobre Sephadex G-50, utilizando en ambos casos buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0. El análisis enzimático mostró que se trata de una proteína con actividad de hialuronidasa la cual fue purificada 145 veces con un rendimiento de 72% y una recuperación de proteína activa de 0,5%. La enzima registró un peso molecular de 110 kDa por PAGE-SDS, en condiciones reductoras y no reductoras. Los ensayos de estabilidad indicaron que la hialuronidasa perdió el 60% de su actividad después de 150 horas a pH 5,0 y fue rápidamente inactivada por tratamiento térmico mayor a 40 °C. El pH óptimo de la enzima fue de 6 y la proteína sólo mostró actividad sobre ácido hialurónico y no sobre condroitin sulfato. Los ensayos con inhibidores, tales como TLCK, yodoacetato y dexametasona 5mM, produjeron pérdida de la actividad equivalentes a 60, 40 y 75%, respectivamente, en tanto que el tratamiento con suero sanguíneo humano la inactivó totalmente. Asimismo, las pruebas en placa de hemólisis conteniendo ácido hialurónico mostraron que la enzima es capaz de incrementar el área hemolítica. Adicionalmente, la preincubación de la enzima con los antivenenos comerciales lachésico y botrópico, así como el antiveneno experimental botrópico IgY, revelaron una elevada capacidad inhibitoria de tales antivenenos.

**Palabras clave:** Veneno, serpiente, Amazonía, ácido hialurónico, enzima, antiveneno

## PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A SPREADING FACTOR FROM THE VENOM OF SNAKE *Bothrops atrox* (JERGON)

### ABSTRACT

A protein of high molecular weight was purified from the venom of *Bothrops atrox* Peruvian snake, using DEAE Sephadex A-50 anion exchange chromatography and Sephadex G-50 gel molecular filtration, with 0,05M ammonium acetate, pH 5.0. It showed hyaluronidase activity, and was obtained until homogeneous state with a 145-fold, 72% of yield and a 0.5% of recovery of active protein. The enzyme showed a molecular weight of 110 kDa by SDS-PAGE under reducing and non reducing conditions. The stability assays indicated that hyaluronidase lost 60% of its activity after 150 hours at pH 5.0 and it was quickly inactivated

---

<sup>1</sup> Lab. Biología Molecular-Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM

<sup>2</sup> Lab. Zoología de Invertebrados-Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM

\* ayarleque48@gmail.co

by heat treatment above 40 °C. The optimum pH was 6.0 using hyaluronic acid and some inhibitors such as TLCK, iodoacetate and dexamethasone (5 mM), caused 60, 40 and 75% of inactivation, respectively. On the other hand, this enzyme is capable to increase hemolysis into agar plates. Furthermore, treatment of the enzyme with human blood-serum, as well as lachesic and bothropic commercial antivenoms produced a strong inhibition; also, IgY experimental antivenom revealed high inhibition of this enzyme.

**Key words:** Venom, snake, Amazon, hyaluronic acid, enzyme, antivenom.

## INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico es un polisacárido multifuncional de alto peso molecular encontrado en todo el reino animal. Especialmente en la matriz extracelular de tejido conectivo blando<sup>1</sup>; este componente participa en procesos vitales, tales como: fecundación, reproducción, envejecimiento, comunicación celular y formación de tumores<sup>2</sup>.

Aun cuando la información sobre estas enzimas en los venenos de serpientes es todavía limitada, se sabe que su mayor actividad está relacionada a los vipéridos de gran tamaño como *Lachesis muta* y que ella jugaría un importante rol en la difusión del complejo tóxico que es el veneno<sup>3</sup>. En cuanto a *B. atrox*, siendo la especie ofídica más peligrosa en el Perú, el estudio de la actividad hialuronidasa reviste gran importancia por sus implicancias en salud pública<sup>4</sup>.

Las hialuronidasas aisladas hasta la fecha proceden de serpientes de las familias Viperidae y Elapidae, y también de artrópodos como arañas; esta enzima presenta algunas características semejantes tales como actividad máxima a un pH ácido y un punto isoeléctrico elevado pero presentan en contraste, propiedades variables, tales como su peso molecular, composición de carbohidratos y sobre todo, su estabilidad. Siendo una hidrolasa del ácido hialurónico, en algunos casos se ha demostrado su participación activa en la difusión del complejo tóxico.

Sin embargo, la poca información existente está relacionada principalmente con su inestabilidad y el bajo porcentaje contenido en el veneno, menor o igual a 1,5%. Siendo esta enzima parte del complejo tóxico, su intervención en el mecanismo de envenenamiento estaría ligado a la penetración de la politoxina en los tejidos de la presa o víctima debido a la hidrólisis del mucopolisacárido, por lo que su estudio reviste importancia, tanto en salud pública como herramienta de diagnóstico, y en la utilidad tecnológica que podría derivarse del conocimiento amplio de este grupo de proteínas.

Por tanto, el objetivo de esta investigación fue desarrollar un método rápido y efectivo para obtener la enzima y poder caracterizarla.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico

**Veneno.** Se obtuvo las muestras de veneno de ejemplares adultos de *B. atrox* procedentes de Pucallpa, departamento de Ucayali y mantenidos en el Serpentario “Oswaldo Meneses” de la UNMSM. El veneno extraído por presión manual fue liofilizado y conservado a 4 °C hasta su uso. Para ensayos comparativos se utilizó también el veneno liofilizado de la serpiente *Lachesis muta* de la misma zona, obtenido del mismo modo antes descrito.

**Antivenenos.** Para el ensayo de inhibición enzimática se utilizó los sueros antibotrópico y antilaguésico al estado líquido, preparados por el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú). Asimismo, se empleó un antiveneno experimental de origen aviar desarrollado en este laboratorio, que contienen inmunoglobulinas IgY contra los venenos de *B. atrox* y *L. muta*<sup>5</sup>.

### **Cuantificación de proteína**

Se determinó midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm y por el método de Lowry *et al*, modificado por Loayza *et al*<sup>6</sup>, usando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

### **Actividad enzimática**

Fue calculada por el método turbidimétrico de Di Ferrante<sup>7</sup>. La mezcla de reacción fue 0,1 mg de ácido hialurónico de cordón umbilical humano en 0,5 mL de buffer acetato de amonio 0,05 M, conteniendo NaCl 0,15 M pH 5,0 y 50 µL de la enzima. Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C se adicionó 2 mL de reactivo de BCTA (bromuro-cetil-trimetil-amonio) al 2% en NaOH al 2,5%. Finalmente, se midió la actividad a 400 nm. La actividad fue expresada en unidades Di-Ferrante (UDF) la cual se define como la cantidad de proteína requerida para reducir la turbidez inicial del sustrato en un 50%.

### **Estabilidad del veneno**

Se preparó baterías que contenían veneno de *B. atrox* a diferentes pH usando buffer acetato de amonio 0,1 M pH 4,0, 5,0 y 6,0; así como buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,0. Las muestras se colocaron a temperatura ambiente (20 °C) midiéndose la actividad desde cero a 160 horas en presencia de cloruro de sodio 0,15 M y 0,3 M, respectivamente. La actividad enzimática fue estimada en este intervalo de tiempo.

### **Purificación de la enzima**

Fue llevada a cabo tomando como base el método desarrollado por Hurtado *et al*<sup>8</sup>, para el cual, 100 mg de veneno crudo fueron aplicados a una columna de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 (46 x 1,7 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5,0. Se colectó fracciones de 2 mL a un flujo de 4 mL/hora midiéndose en cada una, la cantidad de proteína y la actividad de la enzima. Las fracciones que mostraron mayor actividad fueron mezcladas y se aplicaron a una columna de Sephadex G-50 (70 x 0,7 cm) con el mismo buffer, colectándose fracciones de 1 mL a un flujo de 4 mL/hora.

### **Peso molecular**

Se calculó mediante PAGE-SDS usando el método de Laemmli<sup>9</sup>, para lo cual se empleó una cámara electroforética vertical sobre geles de poliacrilamida en presencia y ausencia de mercaptoetanol. Como proteínas estándar se usó: albúmina bovina (66kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

### **Inhibidores enzimáticos**

Se ensayó el efecto de EDTA, PMSF, TLCK, dexametasona y 2-mercaptoetanol a concentraciones de 1 a 5 mM. Luego de pre incubar la enzima con cada uno de los agentes por 5 minutos, se corrió la reacción enzimática.

### **Estabilidad enzimática al pH**

Se procedió a pre incubar la enzima 5 minutos a 37 °C con cada uno de los buffers a la concentración de 0,1M: citrato de sodio pH 3,5; acetato de amonio pH 4,0 y 5,0; Tris-HCl pH 6,0, 7,0 y 8,0. Luego de la pre-incubación se procedió a medir la actividad de la enzima.

### **Efecto difusor de la hialuronidasa en ensayos de hemólisis**

Se empleó una variación del método de Da Silva y Gulmerme<sup>10</sup>. Se colocó en placas Petri estériles (3,5 cm x 10 mm) mezclas de agarosa 1,5%, glóbulos rojos humanos lavados 3%, emulsión de yema de huevo 3% y ácido hialurónico 10 mg/mL en buffer fosfato 0,1 M más NaCl 0,15 M a pH 7,4, dejándose enfriar y gelificar. Luego, se realizó orificios de 4 mm de diámetro en los cuales se aplicaron 20 µL de las muestras: 20 µg veneno crudo, 20 µg de veneno precalentado por 15 min a 60 °C y una mezcla de 20 µg veneno crudo precalentado con

5 µg de hialuronidasa purificada. Las muestras se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente por 12 horas, luego de lo cual se calculó el área del halo hemolítico formado.

### Inhibición por antivenenos ofídicos

Se preparó mezclas con la enzima purificada y concentraciones variables de los antivenenos lachésico y botrópico (INS, Lima-Perú) o con los antivenenos experimentales obtenidos de huevos de gallinas inmunizadas<sup>5</sup> contra venenos de *L. muta* y *B. atrox*, respectivamente. Así también, se hicieron mezclas con suero sanguíneo humano siguiendo el mismo protocolo. Luego de 30 minutos de pre-incubación a 37 °C, se procedió a medir la actividad enzimática remanente.

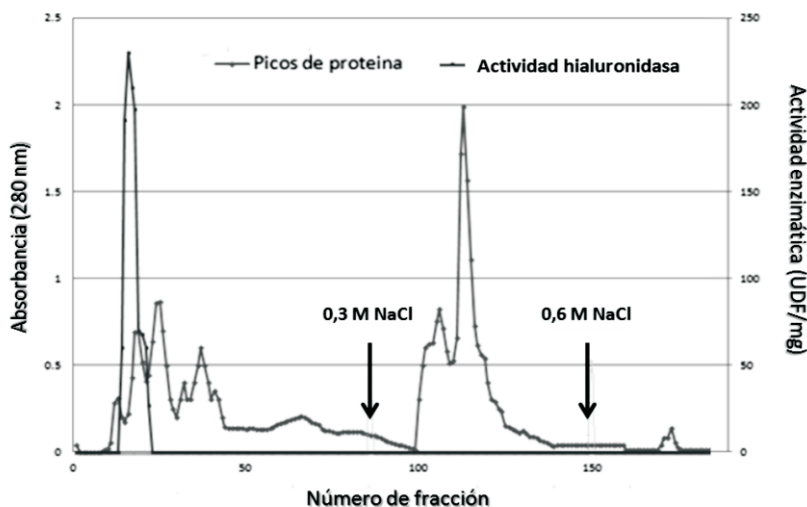
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estabilidad enzimática en el veneno

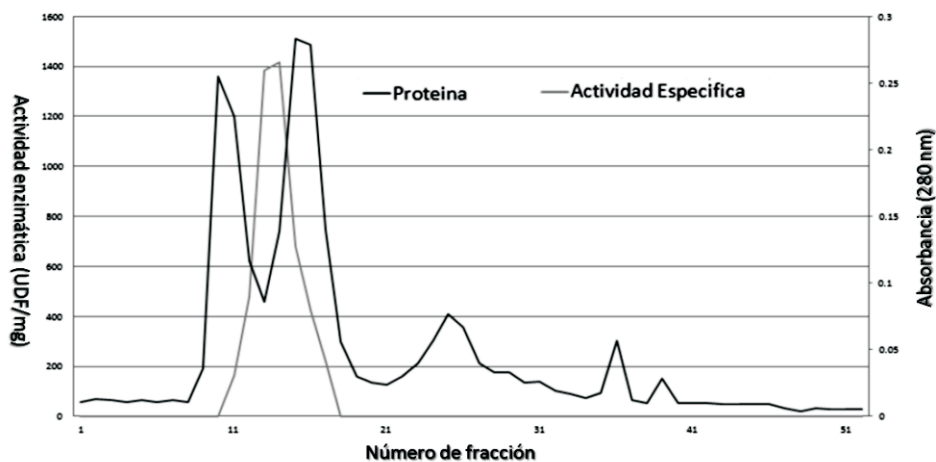
La actividad hialuronidasa mostró estabilidad a pH 5,0 manteniéndose el 70% de la actividad luego de 156 horas a temperatura ambiente; en tanto que a pH 6,0 se detectó sólo el 27%. a pH 4,0 y 7,0 se inhibió totalmente la actividad luego del tiempo mencionado. Por su parte, se observó un efecto adverso de las distintas concentraciones de NaCl donde a 0,15 y 0,3 M la actividad se redujo en 68 y 84%, respectivamente. En contraste, a tiempo cero las mismas concentraciones aumentaron la actividad en 15 y 18%, respectivamente.

### Purificación de la enzima

Las figuras 1 y 2 muestran los perfiles proteicos obtenidos al fraccionar el veneno de *B. atrox* con DEAE Sephadex A-50 y Sephadex G-50, respectivamente. En el primer paso se observa la aparición de la enzima en el segundo pico de proteína y en el volumen isocrático, mientras que, en la filtración molecular la enzima se localiza entre los dos primeros picos. La purificación obtenida fue de 145 veces con un rendimiento de 72% y se recuperó el 0,5% de proteína activa (tabla 1). Asimismo, el peso molecular de la hialuronidasa fue calculado en 110 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, usando PAGE-SDS.



**Figura 1.** Perfil proteico del veneno de *B. atrox* luego de su pasaje por la columna de DEAE Sephadex A-50. El factor difusor en estudio se localiza principalmente en el segundo pico.



**Figura 2.** El segundo paso cromatográfico consistió en el uso de una columna de filtración sobre Sephadex G-50.

**Tabla 1.** Cuadro de purificación de la hialuronidasa del veneno de *B. atrox*

Paso	Cantidad proteína		Actividad específica	UTA	Purificación	Rendimiento %
	mg	%				
Veneno	100	100	8	800	1	100
Sephadex DEAE A50	2	2	200	400	25	50
Sephadex G-50	0,5	0,5	1157	578,5	145	72

Las hialuronidasas pertenecen al E.C. 3.2.1.35 de acuerdo a la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZY). Éstas activan los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 del ácido hialurónico en forma aleatoria en un proceso no endolítico, produciendo tetrasacáridos como producto final de la reacción<sup>11</sup>.

La hialuronidasa del veneno de *B. atrox* es una enzima inestable a juzgar por los datos obtenidos. Esto también fue reportado por Hurtado *et al* (2007)<sup>8</sup> para la serpiente *Lachesis muta* y en el caso de la enzima del lagarto *Heloderma horridum horridum*<sup>12</sup>; asimismo, existen reportes de la inestabilidad de la actividad de hialuronidasa de serpientes asiáticas<sup>13</sup>. Este panorama, al extrapolarlo a la acción de la enzima durante el envenenamiento, permite establecer la probabilidad de que la enzima, al ser un factor iniciador, tenga elevada actividad y una pobre estabilidad en el tiempo, ya que su efecto sólo sería necesario en la primera etapa del proceso, al actuar el veneno sobre el tejido cercano a la mordedura y su ulterior

inactivación al ingresar al sistema circulatorio por efecto de proteínas séricas de la familia inter-alfa-inhibidores.

El aislamiento de la hialuronidasa presente en el veneno de *B. atrox*, permitió una purificación de 145 veces, con un rendimiento de 72%, en comparación con la enzima aislada de *Agkistrodon contortrix contortrix*, donde se obtiene una purificación de 277 veces con un rendimiento del 16,6%, empleándose en ese caso Sephacryl S-200 HR y CM Sephadex C-25. Cabe mencionar que en el 2004, Girish *et al*<sup>14</sup> obtienen una purificación de 33 veces con un rendimiento de 5% para la NNH1 y 27 veces con un rendimiento de 0,35% para la NNH2, ambas hialuronidasas presentes en el veneno de *Naja naja*, mediante el empleo de Sephadex G-75 y CM Sephadex C-25. Es interesante señalar que, en la presente investigación, el rendimiento, después del primer paso, fue de 50% y se incrementó a un 72% después del segundo paso, lo que sugiere la existencia de un inhibidor que podría estar desligándose de la hialuronidasa en este último paso. Esto no se observa en los trabajos mencionados para *A. contortrix contortrix* y *N. naja* y tampoco en la purificación presentada por Lerma en el 2006<sup>3</sup> para la hialuronidasa del veneno de *L. muta*<sup>3</sup>. Por otro lado, la enzima purificada mostró un peso molecular de 110 kDa usando PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras. Al respecto encontramos un amplio rango de pesos moleculares para hialuronidasas, ya que, para el vípérito *L. muta* se indica un peso de 47 kDa<sup>8</sup>, mientras que Lerma<sup>3</sup> reportó 65 kDa para el mismo veneno; a su vez, Cevallos<sup>15</sup> mediante zimogramas en geles de acrilamida determina un peso de 115 kDa para *L. muta*, 137 y 113 kDa para *B. asper*, 73 y 108 kDa para *Crotalus basiliscus*. Adicionalmente, Kudo y Tu<sup>16</sup>, encuentran un peso de 59,3 kDa para *A. contortrix contortrix*, mientras que, la enzima de *A. acutus* presenta un peso molecular bajo de 33 kDa (Xu *et al*, 1982). Esto nos indica la gran variabilidad de formas moleculares para esta enzima.

### Inhibidores enzimáticos

El empleo de la dexametasona (5 mM), produjo una inhibición del 75% mientras que, el TLCK, el EDTA y el iodoacetato a la misma concentración, produjeron una inhibición de 60, 48, y 39%, respectivamente. En contraste, el 2-mercaptoetanol y el PMSF no ejercieron ningún efecto inhibitorio (tabla 2).

**Tabla 2.** Cromatograma (1) GC-FID-EAD del extracto glandular de *C. corruda* (hembras)

Agente	Concentración final	Actividad (%)
HA-Ba	-	100
Suero	20 mg/mL	0
Dexametasona	9,8 mM	11
EDTA	5 mM	52
2-Mercaptoetanol	3,15 mM	98
Yodoacetato	5 mM	63
PMSF	6,8 mM	92
TLCK	5 mM	40

### Determinación del pH óptimo y estabilidad al pH

La enzima purificada mostró actividad máxima en el rango de pH 4,0 a 7,0 en buffer acetato de amonio, siendo su valor más alto el registrado a pH 6,0 en presencia y ausencia de NaCl 0,15 M. Sin embargo, la enzima preparada en buffer acetato de amonio a pH 6,0 en presencia y ausencia de NaCl 0,15M sólo mantuvo su actividad hasta las 48 horas, en tanto que, cuando estuvo expuesta a pH 5,0 en las mismas condiciones, su actividad remanente fue de 60% en el mismo lapso de tiempo (tabla 2). De estos resultados, es fácil colegir que existen varios inhibidores para esta enzima, lo cual sugiere que es posible inhibirla, por lo menos parcialmente, usando alguno de los ya indicados.

Es interesante señalar que los inhibidores pueden ser herramientas de gran utilidad para el diseño de mejores métodos del tratamiento antiofídico, mediante la neutralización de estas enzimas como lo demuestran los inhibidores de la hialuronidasa reportadas en la presente investigación. La dexametasona, por ejemplo, podría emplearse en el tratamiento de mordeduras, reduciendo las lesiones dérmicas y mejorando la recuperación de los pacientes así como la eficiencia de los sueros anti-ofídicos.

En relación con el pH podemos indicar que la mayoría de las hialuronidasas investigadas tienen un rango de pH entre 5,0 y 6,5, puesto que a pH mayores o menores se inactiva rápidamente. Asimismo, en este caso se observa que, si bien es cierto el NaCl 0,15M eleva la actividad, la estabilidad de la enzima es menor, ya que en 48 horas se inactiva, mientras que en ausencia de esta sal y a pH 5,0 aún se tiene un 60% de actividad.

Valores reportados de pH óptimo para la enzima en otros venenos de reptiles señalan un pH óptimo de 5,0 para el veneno de la serpiente asiática *Agkistrodon acutus*<sup>17</sup>, la peruana *Lachesis muta*<sup>8</sup>, las dos isoformas del veneno de la cobra africana *Naja naja*<sup>14</sup> y el lagarto *Heloderma horridum horridum*<sup>12</sup>, mientras que, un pH óptimo de 6,0 fue establecido para el veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix contortrix*<sup>16</sup> y pH 5,5 para el veneno de *Bothrops brazili*<sup>18</sup>.

### Efecto difusor de la hialuronidasa

La prueba de hemólisis en placa causada por la fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno, mostró algunos hechos interesantes. Así, tenemos que el veneno total de *Bothrops atrox* produjo un halo de difusión de 24 mm<sup>2</sup> (100%), en tanto el veneno inactivo por calor a 60 °C, en el cual está ausente la hialuronidasa, produjo sólo un halo de difusión de 15 mm<sup>2</sup> (40%). Asimismo, al colocar veneno inactivado por calor más hialuronidasa purificada, se restableció la difusión a un valor de 22 mm<sup>2</sup> (87%). En cambio con la enzima purificada sólo se registró un halo de difusión de 11mm<sup>2</sup> (13%). Esto significa que el valor encontrado para el veneno calentado a 60 °C (40%), se debe exclusivamente a la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>. Al adicionarse la enzima purificada al veneno calentado, el halo de hemólisis se incrementa drásticamente, llegando a 87%; es decir, más del doble del halo producido por el veneno calentado.

### Reactividad inmunogénica y neutralización

Los ensayos de inmunogenicidad tanto del veneno crudo como de la enzima purificada mostraron lo siguiente: en el caso del veneno crudo, este es capaz de formar varias líneas de precipitación con los antivenenos botrópico y lachésico, respectivamente. De igual manera, la enzima en estudio mostró su reactividad con ambos antivenenos, formándose en cada caso una sola línea de precipitación. Por otro lado, los antivenenos botrópico polivalente y lachésico monovalente (INS), provocaron una reducción del 50% en la actividad enzimática cuando se usaron 192 y 80 µL de suero por mg de veneno, respectivamente; en tanto que al usarse la enzima purificada, los valores de inhibición al 50% fueron 2200 y 200 µL por mg de enzima.



Adicionalmente, los anticuerpos policlonales aviares IgY preparados contra el veneno de *B. atrox*, mostraron una neutralización de la actividad hialuronidasa con una reducción de 50% en la actividad enzimática para una proporción de 1800  $\mu$ L de IgY por mg de veneno, mientras que aquéllos preparados contra el veneno de *L. muta*, causaron una reducción en este mismo porcentaje, empleándose 400  $\mu$ L de IgY por mg de veneno. Esta reducción al 50% se logró usándose 7000  $\mu$ L y 4500  $\mu$ L de IgY por mg de enzima, respectivamente.

Como puede observarse en todos los ensayos de neutralización, se obtuvo una mayor eficiencia del antiveneno lachésico, tanto comercial de origen equino como experimental de origen aviar, en la inhibición de la enzima en estudio.

Hasta la fecha, no se ha demostrado que las hialuronidasas presenten toxicidad intrínseca<sup>14</sup> pero son potenciadores de la toxicidad del veneno gracias a su papel difusor de los componentes tóxicos<sup>12,13,17</sup>. Al no poseer toxicidad se ha diseñado métodos que evalúan la actividad potenciadora de la hialuronidasa respecto a otras actividades tóxicas de enzimas conocidas. Así se observa que ellas incrementan la actividad de creatina fosfoquinasa y el daño hemorrágico causado por miotoxinas<sup>14</sup>. Por su parte, Lerma en el 2006<sup>3</sup>, realizó la evaluación de la actividad hemolítica indirecta incluyendo el sustrato de hialuronidasa; es decir, el ácido hialurónico en placas de hemólisis. De acuerdo con ello, se puede observar el efecto difusor de la hialuronidasa en el incremento del halo hemolítico para el veneno crudo y la enzima purificada de *L. muta*, lo que es comparable con el presente trabajo, en el que se utilizó una técnica similar para evaluar el efecto de la hialuronidasa aislada del veneno *B. atrox*.

Por otro lado, los antivenenos o sueros antiofídicos son la forma más eficiente y directa para el tratamiento de mordeduras por serpientes venenosas. Lamentablemente, la mayoría de sueros antiofídicos generan una pobre protección frente al daño del tejido local adyacente a la mordedura<sup>19</sup>, por lo que la inhibición de la hialuronidasa no sólo generaría una protección del tejido local adyacente a la zona de la mordedura, sino que, también retardaría la muerte en casos de envenenamiento de alto grado<sup>20</sup>. Actualmente, los sueros antiofídicos otorgan protección frente a las principales actividades tóxicas responsables de la sintomatología del envenenamiento ofídico<sup>21</sup>, siendo dicha protección más eficiente en el tratamiento de la mordedura de especies del mismo género. Sin embargo, se obtiene una pobre reactividad cruzada (4%) entre los venenos de las serpientes *B. atrox* y *L. muta*<sup>22</sup>; en cambio, el grado de neutralización de la actividad hialuronidasa por parte de ambos sueros, frente a la hialuronidasa de *B. atrox*, indicaría que a pesar de la poca reactividad cruzada, ambos sueros son capaces de neutralizar esta enzima. Es interesante señalar también que la neutralización de la actividad hialuronidasa ocurre al emplear sueros aviares; dato importante para el diseño de sueros antiofídicos en gallinas, lo que constituye una nueva tecnología que merece ser evaluada para esta enzima.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran la presencia en el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*, de una hialuronidasa, la cual es una proteína básica, homodimérica, con un peso molecular de 110 kDa en condiciones reductoras y no reductoras. Es termolábil, estable en el rango de pH 4,0 a 7,0, con un pH óptimo de 6,0. Posee un efecto difusor que incrementa la hemólisis indirecta "in vitro" y es neutralizada por los sueros antibotrópico polivalente, antilaquésico y los sueros de origen aviar antibotrópico y antilaquésico en dosis variables.



### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo agradecen al Consejo Superior de Investigación del Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM, por su apoyo financiero.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Letters* 1998; 131:3-11.
2. Stern R. Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in cancer biology* 2008; 18:275-280.
3. Lerma L. Evaluación bioquímica y biológica de una hialuronidasa del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Tesis para al Título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética. UNMSM. 2006.
4. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima Perú: Fondo Editorial UNMSM 2000.
5. Mendoza J, Vivas D, Rodríguez E, Inga R, Sandoval G, Lazo F, Yarlequé A. Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2012; 29 (1): 69-75.
6. Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Rev Soc Quím Peru* 1985; 52(3): 151-163.
7. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Medical Research* 1955; 303-306.
8. Hurtado L, Lerma L, Rodríguez E, Yarlequé A. Evaluación, aislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hialuronato glucanohidrolasa del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta* "Shushupe". *Rev Soc Quím Peru* 2007; 73(4): 226-234.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
10. Da Silva M, Gulmerme O. Titration of anti serum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Toxicon* 1981; 20: 563-569.
11. Stern R, Jedrzejewski M. The hyaluronidases: their genomics, structure and mechanism of action. *Chem Rev* 2006; 106(3): 818-839.
12. Tu A, Hendon R. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp Biochem Physiol B* 1983; 76(2):377-383.
13. Pukrittayakamee S, Warrell D, Desakorn V, Mc Michael A, White N, Bunnag D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon* 1988; 26:629-737.
14. Girish K, Shashidharamurthy S, Nagaraju T, Gowda K, Kemparaju K. Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie* 2004; 86: 193-202.
15. Cevallos M, Navarro Duque C, Varela-Julia M, Alagon C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 1992; 30: 925-930.
16. Kudo K, Tu A. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 386(2): 154-162.
17. Xu X, Wang X, Liu X, Huang J, Lu Z. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 1982; 20: 973-981.

18. Delgadillo J. Caracterización bioquímica y biológica de una hialuronato glicanohidrolasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops brazili* “jergón shushupe”. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. UNMSM. 2012.
19. Lomonte B, Leon G, Hanson L. Similar effectiveness of Fab and F (ab')<sub>2</sub> polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and mionecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 1996; 35: 1627-1637.
20. Girish K, Kemparaju K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: Roles in the management of poisonous bite. *Life Sciences* 2006; 78: 1433-1440.
21. Yarlequé A, Vivas D, Inga R, Rodríguez E, Sandoval G, Pessah S, Bonilla C. Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2008; 25(2): 169-173.
22. Sandoval G, Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A, Zingali R. Identificación molecular y actividad sobre sustratos cromógenos de la venombina A del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. *Rev Peru biol* 2010; 17(3): 365-370.