

## PURIFICACIÓN Y ALGUNAS PROPIEDADES DE UNA HIALURONIDASA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops brazili* “JERGÓN SHUSHUPE”

Julio Delgadillo<sup>1</sup>, Mercedes Palomino<sup>1</sup>, Fanny Lazo<sup>1</sup>, Edith Rodríguez<sup>1</sup>, Edgar González,  
Ruperto Severino<sup>2</sup> y Armando Yarleque<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

En el veneno de la serpiente *Bothrops brazili* se ha encontrado una proteína con actividad hialuronidasa. La purificación se realizó en dos pasos cromatográficos utilizando columnas de Sephadex G-75 y DEAE Sephadex A-50 equilibradas con buffer acetato de amonio 0,1 M, pH 5. Se obtuvo una purificación de 33 veces con un rendimiento de 54,5 % y una recuperación de proteína activa equivalente a 1,66 %. Esta enzima es una proteína básica con un peso molecular de 110 kDa y un pH óptimo de 5,5. La actividad enzimática a 20 °C se mantuvo en un 50% después de 72 horas y fue completamente inactivada a las 192 horas. Asimismo, la actividad enzimática se incrementó un 38,9 % por la adición de iones magnesio (150 mM). La capacidad difusora de esta proteína se demostró mediante el incremento de la actividad hemorrágica causada en ratones al adicionarse la enzima purificada. Los ensayos de toxicidad en ratones y las pruebas enzima-antivenenos, indicaron que la hialuronidasa carece de toxicidad y es inhibida totalmente por los antivenenos botrópico y lachésico (INS-Perú).

**Palabras clave:** Veneno, serpiente, hialuronidasa, *Bothrops brazili*, antiveneno

## PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF A HYALURONIDASE FROM *Bothrops brazili* SNAKE VENOM

### ABSTRACT

In the venom of the snake *Bothrops brazili* was found a protein with hyaluronidase activity. The purification was performed by two chromatographic steps using SephadexG-75 and DEAE SephadexA-50 columns equilibrated with ammonium acetate buffer 0.1M, pH 5. The purification obtained was 33 fold with 54.5% of yield and a recovery of active protein was equivalent to 1.66%. This enzyme was a basic protein with a molecular weight of 110kDa and an optimum pH of 5.5. The enzymatic activity at 20 °C was maintained at 50% after 72 hours and was completely inactivated at 192 hours. Furthermore, the enzymatic activity was increased by 38.9% by the addition of magnesium ions (150mM). The diffusing capacity of the protein was demonstrated by increased hemorrhagic activity caused in mice when added to the purified enzyme. Toxicity assays in mice and enzyme- antivenoms assays indicated that hyaluronidase was not toxic and was completely inhibited by both polyvalent bothropic as monovalent lachesic antivenoms (INS-Perú).

**Key words:** Venom, snake, hyaluronidase, *Bothrops brazili*, antivenom

<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.com

## INTRODUCCIÓN

La hialuronidasa es una endo- $\alpha$ -glicosidasa ampliamente distribuida en la naturaleza<sup>1</sup>. En algunos venenos ofídicos esta enzima hidrolítica produce daño tisular local con degradación de la matriz extracelular y del tejido conectivo que rodea a los vasos sanguíneos, ya que cataliza la ruptura de los enlaces glicosídicos ( $\alpha$ -1,4) de los mucopolisacáridos ácidos tales como el ácido hialurónico y el condroitín sulfato. Asimismo los estudios sobre varias serpientes venenosas de las familias Viperidae y Elapidae, han demostrado que la hialuronidasa no sólo aumenta la potencia letal en la difusión de los venenos, sino que también daña el sitio de la mordedura, resultando en una morbilidad grave.

A pesar de su reconocida importancia fisiológica, esta enzima ha sido poco estudiada debido a su marcada inestabilidad, que conlleva a su rápida inactivación *in vitro*<sup>2</sup>.

La información sobre las hialuronidasas presentes en los venenos ofídicos en el Perú es aun escasa, a pesar de que ya se ha reportado su presencia y características en los venenos de *Lachesis muta*<sup>3,4</sup> y *Bothrops atrox*<sup>5</sup>.

*Bothrops brazili*, es una especie que habita en América del Sur, reportándose su presencia en Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Perú, Surinam y Guyana Francesa<sup>6</sup>. Su característica más importante es la de producir abundante cantidad de veneno (3-4 ml) en comparación con otros vipéridos<sup>7</sup>. Por ello, el ofidismo causado por esta especie tiene graves consecuencias, tanto por los componentes tóxicos presentes en su veneno como por el volumen que puede inocular. El estudio de este veneno y en especial de la enzima hialuronidasa de *B. brazili* tiene gran importancia, pues hasta la fecha no se había detectado su presencia, lo que abre un nuevo camino para investigar sus características y su acción en el proceso de envenenamiento en el cual estaría implicada. Es así que en el presente estudio se purificó y se caracterizó bioquímica y biológicamente esta enzima, la cual tiene gran relevancia por tratarse de un tema de salud pública.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico

**Veneno.**-Se empleó veneno liofilizado de especímenes adultos de *B. brazili* procedentes de la zona del Alto Marañon-Amazonas, mantenidos en cautiverio en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la UNMSM. La extracción del veneno se realizó por presión manual de las glándulas venenosas, siendo este fluido tóxico liofilizado y conservado a 4 °C hasta su uso.

**Antivenenos.**-Para el ensayo de inhibición enzimática se utilizó los sueros anti-botrópico polivalente y anti-lachésico monovalente al estado líquido, producido por el Instituto Nacional de Salud (INS-Lima-Perú).

**Animales de experimentación.**-Se empleó ratones albinos cepa Balb c machos (18-22g) procedentes del bioterio del INS.

### Cuantificación de proteína

El contenido proteico del veneno crudo así como de las fracciones obtenidas fue cuantificado midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120<sup>8</sup>. Además, se empleó el método de Lowry, modificado por Loayza et al.<sup>9</sup> utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu 1:6 en medio alcalino en presencia de albúmina sérica bovina como proteína estándar, midiéndose la absorbancia a 660 nm.

### Actividad enzimática

Para esta prueba se utilizó el método turbidimétrico de Di-Ferrante<sup>10</sup>. La mezcla de reacción contenía 0,2 mL de ácido hialurónico (0,5 mg/mL), 0,25mL de buffer acetato de amonio

0,05M a pH 5,0 con NaCl 0,15 M y se adicionó 0,05 mL del veneno (1mg/mL) o enzima purificada (0,1 mg/mL). Luego se incubó a 37°C por 15 minutos, deteniéndose la reacción con 2 mL de bromuro cetil trimetil amonio (BCTA) al 2,5% en NaOH 2%. Finalmente, se midió la turbidez a 400 nm. La actividad específica 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%.

#### **Purificación de la enzima**

Para la separación de la hialuronidasa, se siguió el método desarrollado por González et al.,<sup>5</sup>. Para lo cual 65 mg de veneno crudo fueron aplicados a una columna de Sephadex G-75 (50 x 1,1 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,1 M pH 5,0. Se colectó fracciones de 1 mL a un flujo de 8 mL/hora midiéndose en cada una la cantidad de proteína y la actividad de la enzima. Las fracciones que mostraron mayor actividad se juntaron y se aplicaron a una columna de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 (40 x 1,1 cm) equilibrada con el mismo buffer utilizado anteriormente. Se colectó volúmenes de 1 mL por fracción a un flujo de 8 mL/hora.

#### **Peso molecular**

Se calculó siguiendo la metodología de Laemmli<sup>11</sup>, usando geles de electroforesis de poliacrilamida-SDS al 10 % en presencia y ausencia de mercaptoetanol. Se utilizó el marcador molecular comercial Wako WIDE-VIEW<sup>TM</sup> que contiene proteínas marcadoras de pesos moleculares desde 7 hasta 240 kDa.

#### **Determinación de la estabilidad**

Los ensayos de estabilidad enzimática para el veneno y la enzima, se realizaron a 20 °C. Se monitoreó la actividad enzimática por el método de Di-Ferrante<sup>10</sup> desde cero hasta 192 horas.

#### **Determinación del pH óptimo**

Alícuotas de la enzima fueron incubadas a diferentes pH: usando buffer acetato de amonio 0,1 M en el rango de pH de 5 a 6,5 y buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7 y 8. Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C se midió la actividad enzimática en cada uno de los valores de pH y se construyó la curva de pH resultante.

#### **Efecto de iones mono y divalentes sobre la actividad enzimática**

Se preparó baterías de reacción conteniendo: KBr, KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> en concentraciones desde 0,01 a 0,3 M. Se preincubaron alícuotas de la enzima con los respectivos iones por 10 minutos a 37 °C y luego se midió la actividad enzimática de la mezcla de reacción.

#### **Inhibición de la actividad hialuronidasa causada por sueros de origen equino**

Se preparó mezclas de la enzima o veneno con los sueros anti-botrópico polivalente y lachésico monovalente a diferentes dosis: 2, 1, 1/2, 1/5 y 1/10 de acuerdo a la dosis neutralizante indicada por el INS (una dosis corresponde a 10 mL de suero que neutraliza 25 mg del veneno). Las mezclas veneno o enzima con el antiveneno fueron incubadas a 37°C por 15 minutos y luego se midió la actividad enzimática.

#### **Determinación de la toxicidad**

Cinco grupos de ratones albinos, fueron inoculados intraperitonealmente con 0,1 mL de hialuronidasa (5-20 µg). El control positivo se realizó con 0,1 mL de veneno crudo (1 mg/mL) y el control negativo con 0,1 mL de solución salina. Luego se monitoreó el efecto sobre los ratones durante 48 horas. Después de este tiempo, los ratones vivos se sacrificaron y se sometieron a disección para observar daños cutáneos y/o viscerales. El ensayo se realizó por triplicado.

### Determinación de la actividad hemorrágica

Se empleó el método de Kondo modificado por Isla et al.<sup>12</sup>, para lo cual se preparó cinco muestras diferentes para su inoculación por vía intradérmica en ratones. La muestra 1 (M1) contenía el equivalente a 1 dosis hemorrágica mínima (1 DHM) del veneno total de *B. brazili* que corresponde a 6,17  $\mu\text{g}$ , de acuerdo al estudio previo de Isla et al.<sup>12</sup>. La muestra 2 (M2) contenía el equivalente a 1 DHM previamente calentado a 60 °C por 10 minutos. Asimismo la muestra 3 contenía 6,17  $\mu\text{g}$  de la hialuronidasa en estudio. La muestra 4 contenía 1 DHM del veneno más la enzima purificada y la muestra 5 contenía veneno inactivado por calor más la enzima. Luego de dos horas, los animales fueron sacrificados y se les removió la piel de la zona abdominal para calcular el diámetro y el área hemorrágica en un papel milimetrado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Purificación de la enzima

La hialuronidasa del veneno de la serpiente *B. brazili* se purificó mediante dos pasos cromatográficos sobre una columna de Sephadex G-75 seguida de una de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 (figuras 1 y 2). Con este procedimiento se logró una purificación de 33 veces, un rendimiento de 54,5% y una recuperación de proteína activa equivalente al 1,66 % (tabla 1).

Asimismo la enzima fue analizada por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras y no reductoras obteniéndose un peso molecular de 110 kDa.

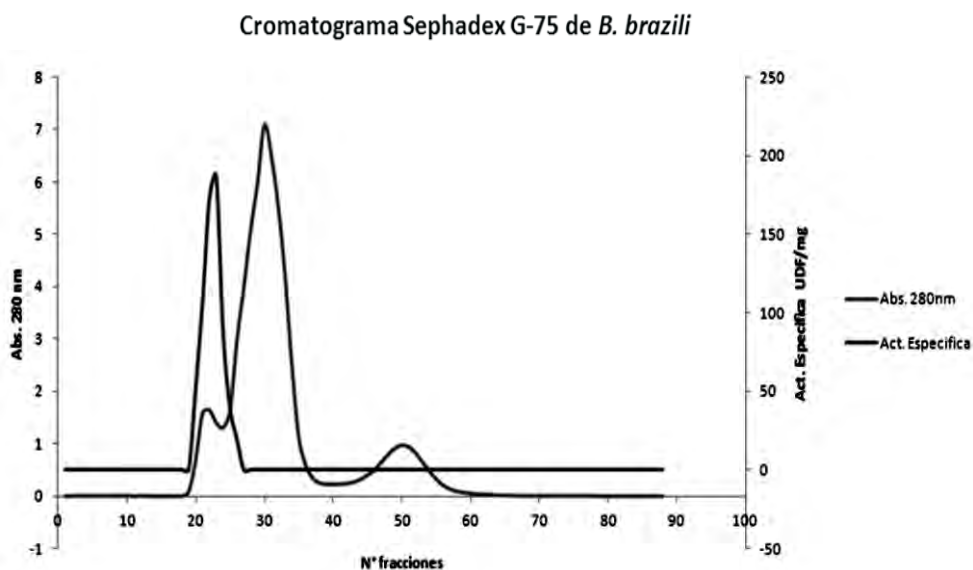
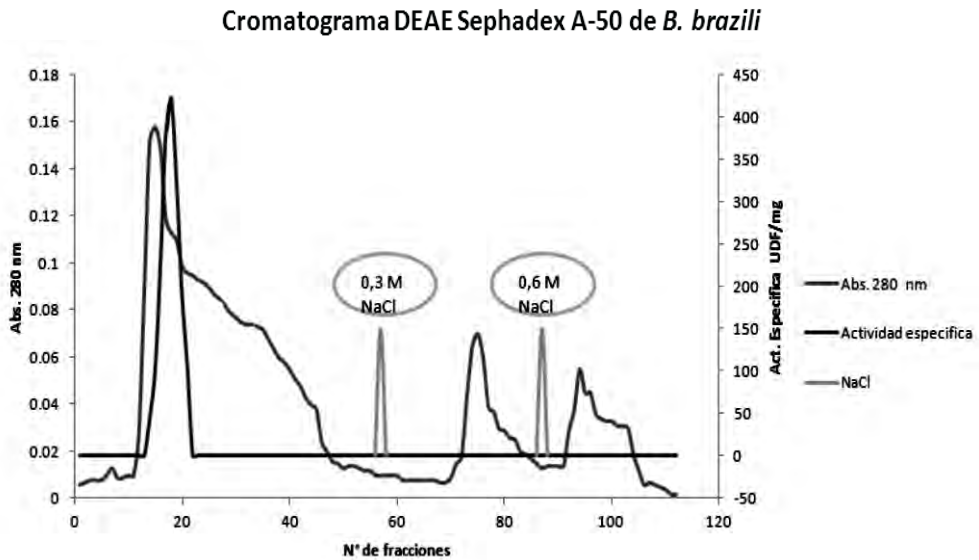


Figura 1. Primer paso de purificación de la hialuronidasa del veneno de *Bothrops brazili*



**Figura 2.** Segundo paso de purificación de la hialuronidasa *B. brazili*

Aunque los estudios de las hialuronidasas de origen animal no son muy abundantes, se ha reportado varias de ellas, como es el caso de la que está presente en el veneno de la serpiente asiática *Agkistrodon acutus acutus* para lo cual se utilizó sucesivamente: CM Sephadex C-50, Sephadex G-75 y CM Sephadex C-25 (Xu *et al*<sup>13</sup>), obteniéndose una purificación de 45 veces y un rendimiento de 6 %. Asimismo, se ha encontrado hasta dos isoformas en el veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix contortrix* utilizándose columnas de Sephacryl S-200 HR y CM-Sephadex C-25, respectivamente; se obtuvo una purificación de 277 veces con un rendimiento del 16,6 % y una recuperación de proteína de 0,1 %<sup>14</sup>. Así también, el veneno de la cobra africana *Naja naja* fue fraccionado a través de columnas de Sephadex G-75 seguida por CM Sephadex C-25, encontrándose dos isoformas de la enzima denominadas NNH1 y NNH2<sup>15</sup>; en este caso se registró una purificación de 33 veces, un rendimiento de 5 % y una recuperación de proteína de 0,15 % para la NNH1 y de 27 veces con un rendimiento de 0,35 % y una recuperación de 0,01 % para la NNH2. En el Perú, el primer estudio reportado acerca de esta enzima fue usando el veneno de *L. muta*<sup>4</sup> utilizándose una columna de intercambio catiónico sobre CM Sephadex C-50 con una purificación de 26,4 veces, un rendimiento de 23,5 %. En el 2006, empleándose el mismo veneno de *L. muta* Lerma<sup>3</sup> optimizó este método, empleando columnas de Sephadex G-100 seguida por CM Sephadex C-50, y de este modo se purificó 51,4 veces con un rendimiento de 38,6 %. Recientemente, González *et al.*<sup>5</sup>, aislaron esta enzima a partir del veneno de la serpiente *B. atrox*, la más abundante y peligrosa del país. Para ello utilizaron dos pasos cromatográficos: DEAE Sephadex A-50 seguido de Sephadex G-50 obteniéndose una purificación de 145 veces con un rendimiento de 72 %.

**Tabla 1.** Purificación de la hialuronidasa de *Bothrops brazili*.

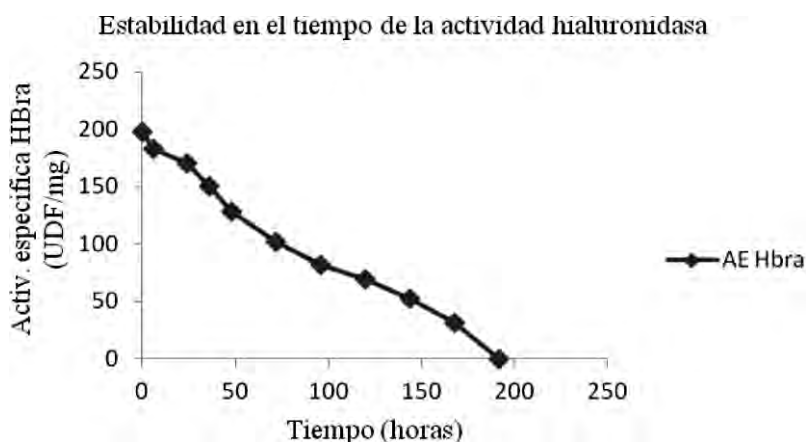
Pasos	Proteína		A.E	UTA	Purificación	Rendimiento
	mg	%				%
<b>Veneno crudo</b>	65	100	9,3	585	1	100
<b>Sephadex G-75</b>	5,96	9,5	138,5	825,5	14,9	141,1
<b>DEAE Sephadex A-50</b>	1,04	1,66	306,4	318,7	33	54,5

Al comparar estos datos con el presente estudio se observa que la aplicación de dos pasos cromatográficos uno de los cuales es una filtración molecular, da lugar a una apropiada separación de esta proteína cuya masa molecular está dentro de las mayores del veneno; asimismo, sea un intercambiador aniónico o catiónico el cual es seleccionado previos ensayos, se puede optimizar la purificación y el rendimiento. Nótese que los datos reportados por González et al.<sup>5</sup> indican valores muy elevados de purificación y de rendimiento para el veneno de *B. atrox* lo que podría estar asociado a un inhibidor intrínseco de la enzima en ese veneno; este comportamiento no se aprecia en el veneno de *L. muta* ni en el de *B. brazili*, motivo de esta investigación presente.

En el año 1992, Cevallos *et al.*<sup>16</sup>, en un estudio sobre serpientes de Costa Rica encontraron al evaluar zimogramas en PAGE-SDS conteniendo ácido hialurónico; pesos moleculares de 113 y 137 kDa para esta enzima en *Bothrops asper*, 73 y 108 kDa para *Crotalus basiliscus* y de 115 kDa en el caso de *Lachesis muta*. Asimismo, para el veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* se ha reportado pesos moleculares de 59 y 61 kDa para sus respectivas isoformas<sup>14</sup>, mientras que en el caso de los elápidos, como la cobra *Naja naja*<sup>15</sup>, se ha registrado pesos moleculares de 70 y 52 kDa. Por otra parte, en el Perú para el caso de *B. brazili* es evidente que tratándose de una proteína de alto peso molecular de 110 kDa, este valor es similar con el de *B. atrox* registrada por González<sup>5</sup>, lo que podría interpretarse como signo de homología molecular a nivel del género *Bothrops*.

#### Determinación de la estabilidad

La figura 3 nos muestra la baja estabilidad de la hialuronidasa de *B. brazili* ya que mantuvo su actividad sólo hasta las 96 horas teniendo un 41 % de actividad remanente en este tiempo, en tanto que a las 192 horas la actividad enzimática fue nula. La rápida inactivación de hialuronidasa por exposición a temperatura ambiente (20°-25°C) es una constante en la mayoría de los venenos de serpientes por lo que continúa su exploración de las condiciones óptimas para lograr mantenerla activa por un periodo prolongado, teniendo en cuenta que la mayor parte de las enzimas ofídicas son estables por varias semanas a esta exposición



**Figura 3.** Estabilidad de actividad hialuronidasa de *B. brazili*.

### pH óptimo

En relación con este parámetro la hialuronidasa de *B. brazili* mostró un máximo valor de actividad a pH 5,5, con un rango entre pH 5 y 6,5 mientras que a pH de 7 y 8 la actividad disminuye drásticamente. Esto concuerda con los estudios previos sobre la marcada inestabilidad de esta enzima a pH neutro y ligeramente alcalino en los que contrariamente son estables la mayoría de los componentes del veneno.

Valores de pH óptimo de 5 fueron encontrados en los venenos de *Agkistrodon acutus*<sup>13</sup>, *Heloderma horridum horridum*<sup>17</sup>, en la serpiente peruana *Lachesis muta*<sup>4</sup> así como en las dos isoformas del veneno de *Naja naja*<sup>15</sup>. En cambio, en los venenos de las serpientes *Agkistrodon contortrix contortrix*<sup>14</sup> y de *Bothrops atrox*<sup>5</sup> (Perú) se encontró valores de pH óptimo de 6. Como puede observarse, es posible correlacionar el pH óptimo con los valores de máxima estabilidad que se encuentran en un estrecho rango de pH entre 5 y 6,5. Desde el punto de vista fisiológico esto podría significar que las hialuronidasas permanecen muy activas en el pH glandular (pH 4,5-5) y que pueden funcionar con alta eficiencia al penetrar el veneno en el tejido conectivo donde el principal componente es el ácido hialurónico.

### Efecto de iones sobre la actividad enzimática

Los resultados obtenidos al preincubar la enzima con los iones a concentraciones finales (10-300 mM), se muestra en la tabla 2. Como puede notarse, el ion  $Mg^{+2}$  causó la máxima activación inicial con un valor del 38,9 % a la concentración de 150 mM, mientras que,  $Ca^{+2}$  (150 mM) y el  $K^+$  (300 mM) sólo mostraron un ligero incremento de la actividad en un 5,3 % y 10%, respectivamente (tabla 2).

Existen numerosos estudios que demuestran la influencia de los cationes divalentes en la actividad de las enzimas de origen ofídico. En relación con la hialuronidasa, Lerma<sup>3</sup> mostró que los aniones monovalentes  $Cl^-$  y  $Br^-$  elevaron la actividad de la enzima purificada del veneno de *L. muta* y no los cationes  $Na^+$  y  $K^+$ . En nuestro caso el propósito fue verificar si el ion  $Mg^{+2}$ , un típico activador enzimático en las ponzoñas de serpientes, tenía alguna acción sobre



hialuronidasa de *B. brazili*. Los resultados indicaron que si bien se observa activación, esta es moderada ya que no supera el 39 %. En cuanto a los aniones  $\text{Br}^-$  y  $\text{Cl}^-$  no muestran mayor efecto sobre esta enzima.

**Tabla 2.** Acción de iones mono y divalentes sobre la actividad enzimática

Muestras	% de A.E (UDF/mg)				
	10 mM	50 mM	100 mM	150 mM	300 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	78	92,6	110	138,9	104,9
<b>KBr</b>	68,4	78,9	86,6	92,9	110
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	53,7	65,3	88	105,3	84
<b>NaCl</b>	52,2	72,3	91,4	98,7	82
<b>KCl</b>	56,2	62,9	80,7	90,5	76,3

#### **Acción de los antivenenos equinos sobre la enzima**

Con respecto a la capacidad neutralizante de los antivenenos comerciales, empleando concentraciones equivalentes a 2, 1, 1/2, 1/5 y 1/10 dosis neutralizantes, se observa que ambos sueros son capaces de inhibir totalmente la actividad de esta enzima. Es interesante apreciar que la inhibición por el suero antilachésico monovalente es más notoria que la causada por el suero antibotrópico polivalente a pesar que este último contiene anticuerpos IgG específicos contra el veneno de *B. brazili*. Nótese que el efecto inhibitorio producido por los antivenenos es similar sobre el veneno total y sobre la enzima purificada.

Con los dos sueros a 1/2, 1 y 2 dosis hubo neutralización total de la actividad. Con el antiveneno botrópico con 1/5 y 1/10 de dosis para las pruebas con veneno total se observó una reducción de la actividad del 74,6 y 40 %, en tanto que con la enzima purificada se obtuvo una reducción del 62,7 % y 36,3 %. En cambio, con el antiveneno lachésico a las mismas dosis frente al veneno total se observó una reducción de un 80,7 y 45 %; para el caso de la enzima purificada los valores fueron 69,8 y 39 %, respectivamente (tabla 3).

Previamente se reportó la neutralización por el antiveneno botrópico polivalente de las actividades enzimáticas de los venenos crudos de serpientes del género *Bothrops*, observándose que la hialuronidasa de *B. brazili* fue inhibida completamente<sup>18</sup> a valores de 1/2, 1 y 2 dosis. González et al.<sup>5</sup>, observaron un alto grado de neutralización de la enzima en el veneno de *B. atrox* causada por acción de los sueros antibotrópicos y antilachésicos de origen equino y aviar, respectivamente lo que indica que a pesar de la baja reactividad cruzada ambos sueros son capaces de inhibir toda la actividad enzimática. Esto implicaría que por lo menos para el caso de la hialuronidasa de *B. brazili* es válido usar cualquiera de los dos antivenenos pero, además, obliga a realizar nuevos estudios sobre la estructura antigénica de esta enzima y ubicar sus epitopos presentes en los anticuerpos IgG e IgY.



**Tabla 3.** Neutralización de la actividad del veneno total y de la hialuronidasa de *B. brazili* por los sueros antibotrópico y antilachésico

Suero empleado	Dosis neutralizante	Antígeno	% Inhibición	Antígeno	% Inhibición
Anti-botrópico	2 D	Veneno <i>B.brazili</i>	100%	Hialuronidasa	100%
Anti-botrópico	1 D	Veneno <i>B.brazili</i>	100%	Hialuronidasa	100%
Anti-botrópico	1/2 D	Veneno <i>B.brazili</i>	100%	Hialuronidasa	100%
Anti-botrópico	1/5 D	Veneno <i>B.brazili</i>	74,6%	Hialuronidasa	62,7%
Anti-botrópico	1/10 D	Veneno <i>B.brazili</i>	40%	Hialuronidasa	35,3%
Anti-lachésico	2 D	Veneno <i>B.brazili</i>	100%	Hialuronidasa	100%
Anti-lachésico	1 D	Veneno <i>B.brazili</i>	100%	Hialuronidasa	100%
Anti-lachésico	1/2 D	Veneno <i>B.brazili</i>	100%	Hialuronidasa	100%
Anti-lachésico	1/5 D	Veneno <i>B.brazili</i>	80,7%	Hialuronidasa	69,8%
Anti-lachésico	1/10 D	Veneno <i>B.brazili</i>	45%	Hialuronidasa	39%

### Análisis de la toxicidad y de la capacidad difusora de la enzima

En cuanto a las pruebas de toxicidad en ratones inoculados con la enzima por vía intraperitoneal no se detectó ningún efecto ni signo de toxicidad hasta las 48 horas. Con ello se demuestra que esta enzima carece de toxicidad, lo cual también ha sido reportado para las hialuronidasas de *Agkistrodon acutus acutus*<sup>13</sup>, *Agkistrodon contortrix contortrix*<sup>14</sup> y *Lachesis muta*<sup>3</sup>. Respecto a estos resultados se afirma que la hialuronidasa no es tóxica en la naturaleza, en contraste con otros principios tóxicos contenidos en los venenos de serpientes<sup>15</sup>.

Los ensayos de actividad hemorrágica en piel de ratón realizados con veneno total, calentado previamente a 60 °C, la enzima purificada y la enzima adicionada al veneno crudo y al veneno previamente calentado demostraron que la hialuronidasa carece de acción hemorrágica pero que añadida al veneno calentado, este efecto biológico se incrementa hasta 3,5 mm. Asimismo, el cálculo de la DHM para el veneno total corresponde al encontrado por Isla et al.<sup>12</sup> cuyo valor fue de 6,17 µg. Es también interesante observar que el valor de hemorragia producido por el veneno total también se incrementa de 10 mm a 12 mm al adicionar la enzima purificada. Estos resultados muestran que monitoreando la actividad hemorrágica es posible verificar la participación en este proceso de la hialuronidasa, gracias a su capacidad difusora, aunque esta proteína carece de dicha actividad. Un modelo semejante se realizó evaluando hemólisis en placa, para demostrar el efecto difusor de la enzima (Lerma<sup>3</sup>, González et al.,<sup>5</sup>)

### CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo establecen la presencia de una proteína enzimática del tipo hialuronidasa a partir del veneno de la serpiente peruana *Bothrops brazili* la cual es de naturaleza básica con un peso molecular de 110 kDa y un pH óptimo de 5,5. La enzima es activada por el ion magnesio, carece de toxicidad y es neutralizada por los sueros antibotrópico polivalente y antilachésico monovalente producidos por el INS-Perú. También tendría una acción difusora del veneno en procesos biológicos asociados al envenenamiento, como la hemorragia.

### 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. Takahashi T, Ikegami-Kawai M, Okuda R & Suzuki K. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry* 2003; 322: 257-263.
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. Hurtado L. Aislamiento y propiedades bioquímicas de una hialuronidasa del veneno de la serpiente *Lachesis muta* "Shushupe". Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. UNMSM. 1997.
5. González E, Ortiz C, Sandoval G, Lazo F, Delgadillo J, Rodríguez E, Severino R, Yarlequé A. Purificación y caracterización bioquímica de un factor de difusión presente en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón". *Rev Soc Quím Peru* 2013 ; 79(1) : 3-12.
6. Campbell J & Lamar W. The venomous reptiles of Latin America. New York, Crustock Publishing Associated, USA 1989.
7. Zavaleta A. Producción de veneno cristalizado de serpientes en el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú): Período 1970-1986. *Rev Méd Herediana* 1992; 3: 87.
8. Warburg O & Christian W. Isolierung und cristallization der Gärungs ferments enolase. *Biochemische Zertschrift* 1941; 31: 384-421.
9. 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.
10. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Medical Research* 1955; 303-306.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
12. Isla M, Málaga O, Yarlequé A. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *Anales de la Facultad de Medicina* 2003; 64(3): 159-166.
13. 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.
14. Kudo K, Tu A. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 386 (2): 154-162.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
18. Mendoza J, Lazo F, Yarlequé L, Ruiz N, Yarlequé A, Pessah S, Flores V, Bonilla C. Efecto del antiveneno botropico sobre las actividades de Fosfolipasa A<sub>2</sub>, L- aminoácido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2008; 25(2): 174-178.