

## COMUNICACIONES

### Efectos de la liofilización sobre cuatro actividades biológicas del veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae)

León Villegas<sup>1</sup>, Eduardo Aguirre<sup>1</sup> y Alfonso Zavaleta\*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Farmacología, Depto. Académico de Ciencias Fisiológicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia. A.P. 4314, Lima 100, Perú, Email AZMV, UPCH, EDU.P.

<sup>2</sup> Laboratorio Afiliado, Dirección de Investigación Epidemiológica, Instituto de Enfermedades Transmisibles, Instituto Nacional de Salud, Perú. A.P. 4314, Lima 100, Perú.

(Rec. 12-III-1993. Acep. 6-VII-1993)

**Abstract:** Fresh venom was obtained by milking both sexes of adult *Bothrops atrox* snakes. Four biological activities were studied in both fresh and freeze dried venom: local hemorrhagic in guinea pig skin, proteolytic upon casein (caseinolytic), esterase upon TAME and fibrinogen clotting activity. All activities were detected in fresh venom: Hemorrhagic (DHM=0.93, DHR=9.75 µg protein), caseinolytic (0.25 U kunitz/mg protein), esterase (0.70 U/mg protein) and clotting activity (75.7 U NIH/mg protein). After freeze drying, all the biological activity of *B. atrox* venom enzymes decreased: hemorrhagic, caseinolytic and clotting activity in 50% and the esterase activity only in 15%. Our results show that lyophilization decreases several important biological activities in snake venom related to a decrease in the venom enzymatic activities.

**Key words:** Snake venom, *Bothrops atrox*, lyophilization, haemorrhage, proteases, clotting activity.

El envenenamiento causado por la mordedura de serpiente es uno de los problemas de salud que afronta principalmente la región amazónica peruana, siendo *Bothrops atrox* ("jergón") responsable de aproximadamente el 90% de los accidentes registrados anualmente en el Perú. Su veneno produce edema, hemorragia, necrosis cutánea y mionecrosis a nivel local, acompañado de alteraciones de la coagulación sanguínea y la función renal los cuales conducen a la muerte en los casos severos (Chang & Zavaleta 1987). Debido a las dificultades inherentes a la obtención y uso de veneno fresco, la mayoría de los estudios sobre sus propiedades se han realizado empleando veneno sometido previamente a diferentes procedimientos de conservación (cristalización y/o desecación, congelación ó liofilización), los que alteran en mayor o menor grado las actividades del veneno. En este trabajo estudiamos la presencia de cuatro actividades biológicas en el veneno fresco recién extraído de serpientes *B. atrox*: proteolítica sobre caseína; coagulante sobre fibrinógeno; esterásica y hemorrágica local, y evalua-

mos la influencia de la liofilización sobre estas actividades biológicas.

El veneno se obtuvo con la técnica manual, de 13 serpientes adultas *B. atrox* (sin distinción de sexo) provenientes de Pucallpa (Región del Ucayali, Perú). El veneno líquido fue recolectado en placas petri en forma acumulativa y mantenida sobre hielo entre extracciones individuales. El proceso de extracción duró 30 min. Al completar la extracción de las 13 serpientes, el veneno fresco fue sometido a centrifugación a 2000 rpm durante 20 min, separándose inmediatamente el sobrenadante en alícuotas de 0.1 ml. Una alícuota fue seleccionada al azar para los estudios en fresco. Las alícuotas restantes se congelaron a -70°C durante 24 horas, y luego se liofilizaron a -70°C y 200 mTorr de presión por 24 horas, en un liofilizador Labconco (Lyph-Lock 4.5). Para los ensayos, el veneno fresco fué diluído y ensayado dentro de la primera hora después de la extracción. El veneno liofilizado se disolvió en volúmenes apropiados de NaCl 0.85% a fin de obtener concentraciones similares de proteínas en ambos tipos de

veneno (de acuerdo al método de Lowry modificado por Stauffer 1975).

La actividad hemorrágica se evaluó en cobayos (*Cavia aperea* var *porcellio*, n=12, machos, 300 a 500 g) utilizando la técnica de Kondo *et al.* (1961). Para los ensayos se inyectó 0.1 ml de solución de veneno (ámbito veneno fresco: 9 a 100 µg de proteínas/ml; ámbito veneno liofilizado: 22 a 123 µg de proteínas/ml) por vía intradérmica en la piel de la región abdominal previamente depilada del cobayo. Como control se inyectó 0.1 ml de NaCl 0.85%. Luego de 24 hr de envenenamiento se sacrificaron los cobayos, y se evirtió la piel, midiéndose seis diámetros de cada lesión hemorrágica producida. Las Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) y Dosis Hemorrágica Referencial (DHR) se estimaron mediante regresión lineal del Logaritmo de la dosis versus el diámetro promedio hemorrágico correspondiente. La DHM y DHR corresponden a las dosis de veneno que producen una lesión hemorrágica de 10 y 20 mm de diámetro respectivamente en 24 hr.

La actividad proteolítica del veneno se determinó cuantificando los productos ácidos solubles producidos por la acción del veneno sobre la caseína según el método de Kunitz modificado (Bergmeyer 1974). La mezcla de reacción contenía 1 ml del sustrato (1% de caseína en Tampón fosfato pH 8.7M), 0.1ml de veneno (1 mg/ml) y 0.9ml de Tampón fosfato. Luego de 20 min de reacción a 35°C, ésta fue detenida adicionando 3ml de 5% Acido Tricloroacético. Las proteínas hidrolizadas precipitaron luego de centrifugación a 2500 rpm por 20 min y los residuos ácidos solubles del sobrenadante se estimaron espectrofotométricamente a 280 nm. Una unidad Kunitz de enzima caseinolítica se define como la cantidad de enzima que es capaz de incrementar una unidad de absorbancia a 280 nm, por min y por mg de proteína, a 37°C.

La actividad esterásica se determinó por el Método de Hummel (1974), empleando n-p-toluensulfonil-l-arginina metil ester (TAME) como sustrato. La actividad es medida espectrofotométricamente a 247nm, durante 10 min a temperatura ambiente. Una unidad se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1µmol de n-p-toluen-l-arginina por min a 25°C.

La actividad coagulante similar a trombina se ensayó por duplicado en tubos con alícuotas

de 0.5 ml de fibrinógeno bovino (2 mg/ml en Tampón fosfato salino 0.02M a pH 7.4), los que fueron preincubados a 37°C durante 3 min. Luego se adicionó 0.1 ml (10 a 320 mg/ml) de veneno ofídico ó NaCl 154 mM (testigo), registrándose el tiempo requerido para la coagulación total de la mezcla (Laki 1951). La potencia coagulante se estimó empleando una curva estándar de trombina bovina (ámbito 0.029 a 1.25 unidades NIH/tubo, Sigma).

El contenido proteico del veneno líquido fresco fue de 299.81 mg/ml. El contenido porcentual de proteínas en el veneno liofilizado fue del 95% (P:P).

Las cuatro actividades biológicas se detectaron en el veneno fresco de *B. atrox*, y fueron afectadas por la liofilización del veneno (Cuadro 1). En el veneno liofilizado, las actividades coagulante, hemorrágica y proteolítica sobre caseína, disminuyeron en mayor proporción que la actividad esterásica (Cuadro 1).

La actividad hemorrágica medida como DHM disminuyó en un 50% luego de la liofilización. Sin embargo, la DHR no fue mayormente afectada (Cuadro 1), demostrándose que la DHM es un mejor indicador de potencia hemorrágica que la DHR.

Los venenos de serpientes constituyen mezclas complejas de sustancias químicas biológicamente activas, siendo los factores responsables de esta actividad, fundamentalmente de naturaleza proteica (con y sin actividad enzimática asociada) ó peptídica. Entre las enzimas, las proteasas se han asociado a la actividad hemorrágica local, hipotensora, y coagulante, jugando un papel importante en la fisiopatogenia del envenenamiento ofídico (Iwanaga & Suzuki 1979)

Nuestros resultados muestran que el veneno fresco recién extraído posee mayor actividad biológica que el liofilizado (Cuadro 1, t Student, p<0.05), disminuyendo marcadamente la actividad de enzimas caseinolítica, hemorrágica y coagulante. El decaimiento de la actividad tamerásica fué menor que el observado para las otras enzimas estudiadas. Aun cuando esta actividad es utilizada frecuentemente como un marcador de la enzima coagulante similar a trombina presente en el veneno, la disminución de ambas actividades enzimáticas parece no seguir un perfil similar (Cuadro 1).

Gené *et al.* estudiaron (1985) el efecto de diferentes condiciones de almacenamiento sobre

## CUADRO 1

Influencias de la liofilización sobre cuatro actividades biológicas del veneno de la serpiente *B. atrox*

Actividad	Veneno fresco	Veneno liofilizado	% Actividad inicial
Caseinolítica <sup>a</sup>	0.25 ± 0.01	0.11 ± 0.005 <sup>\$</sup>	44 ± 4.0
Tamesterásica <sup>b</sup>	0.70 ± 0.01	0.60 ± 0.02 <sup>\$</sup>	85 ± 2.2
Coagulante <sup>c</sup>	75.7 ± 0.12	40.0 ± 0.09 <sup>\$</sup>	52.8 ± 0.18
Hemorrágica			
DHM <sup>d</sup>	0.93 (0.58-1.51) <sup>+</sup>	2.10 <sup>\$\$</sup> (1.56-2.84) <sup>+</sup>	44.4
DHR <sup>e</sup>	9.79 (5.40-17.7) <sup>+</sup>	11.62 (8.47-15.9) <sup>+</sup>	84.3

a Unidades kunitz /min/mg de proteína. + límites fiduciales al 95%

b Unidades/mg de proteína. \$ p<0.05, prueba t de student.

c Unidades NIH/mg de proteína. \$\$ p<0.01, prueba t de student.

d Dosis hemorrágica mínima, cantidad de veneno (µg de proteína) que produce 10 mm de lesión hemorrágica en 24 hr.

e Dosis hemorrágica referencial, cantidad de veneno (µg de proteína) que produce 20 mm de lesión hemorrágica en 24 hr.

los perfiles electroforéticos del veneno de la serpiente costarricense *L. muta stenophrys*, y demostraron que dichos procedimientos no afectan significativamente el número de bandas electroforéticas del veneno; sin embargo este resultado no garantizaba la ausencia de efectos sobre las actividades biológicas propias del veneno ofídico, lo que se confirma en este trabajo. Los venenos ofídicos son empleados como herramientas en la investigación biomédica, y como antígenos en la preparación de los sueros antiveneno, por lo que en el futuro la pérdida de actividad biológica producida por liofilización debe ser evaluada cuidadosamente para cada veneno en particular, y relacionada con su capacidad antigénica.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a María Salas y Segundo Silva su colaboración. Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) del Perú, y se realizó bajo convenio entre el Instituto Nacional de Salud del Perú y la Universidad Peruana Cayetano Heredia. A. Zavaleta es beneficiario del Programa de Apoyo al Investigador que patrocina el CONCYTEC del Perú.

## REFERENCIAS

- Bergmeyer, H.U. 1974. Measurement with casein with substrate (Kunitz), p. 1018-1021. *In* H.U. Bergmeyer (ed.). *Methods of enzymatic analysis*, Vol 2. Academic, Press, Nueva York.
- Chang Neyra J. & A. Zavaleta. 1987. Ofidismo en el Hospital General de La Merced: estudio retrospectivo de 116 casos. *Diagnostico (Lima)* 20:115-120.
- Hummel, B. C. 1974. Measurement with N-p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester as substrate (Hummel), p. 1021-1024. *In* H.U. Bergmeyer, (ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Vol 2. Academic, Nueva York.
- Gené, J., B. Lomonte, J. Gutiérrez & L. Cerdas. 1985. Cambios en el patrón electroforético del veneno de la serpiente cascabel muda (*L. muta stenophrys*) almacenado bajo diferentes condiciones. *Rev. Biol Trop.* 33: 63-65.
- Iwanaga, S. & T. Suzuki. 1979. Enzymes in snake venoms, p. 62-158. *In* C-Y Lee, (ed.). *Snake Venoms*. Handbook. Exp. Pharmacol, Vol. 52. Springer-Verlag, Berlin.
- Kondo H., S. Kondo, H. Ikezawa & R. Murata. 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Japan J. Med. Sci. Biol.* 13: 43-51.
- Laki, K. 1951. The polymerization of proteins: the action of thrombin on fibrinogen. *Archs Biochem.* 32: 317-325.
- Stauffer, C.E. 1975. A linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein. *Analyt. Biochem.* 69: 646-648.