

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL VENENO DE LA SERPIENTE CASCABEL PERUANA *Crotalus durissus terrificus*

PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE VENOM OF THE PERUVIAN RATTLESNAKE *Crotalus durissus terrificus*

César Remuzgo, Miryam Paola Alvarez, Fanny Lazo y Armando Yarlequé*

RESUMEN

Se ha investigado el contenido proteico y algunas actividades enzimáticas del veneno de la serpiente cascabel *Crotalus durissus terrificus* procedente de la región de Sandia, Puno; para ello se empleó el veneno total así como las fracciones obtenidas mediante cromatografía de filtración en Sephadex G-100. El porcentaje de proteína calculado por el método de Lowry fue de 68,6% para el veneno total; habiéndose obtenido 3 picos de proteína durante el fraccionamiento; en el primero se registró actividad proteolítica, en el segundo, las actividades amidolítica, coagulante y fosfolipasa A₂, mientras que en el tercero se detectó otra fracción proteolítica. No se registró la actividad acetilcolinesterasa mientras que la actividad L-aminoácido oxidasa sólo se encontró en el veneno total.

Palabras clave: Veneno, serpiente cascabel, enzimas, Puno.

ABSTRACT

The venom of the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* from the region of Sandia, Puno, has been investigated for its protein content and some enzymatic activities, using for it the whole venom as well as the fractions obtained by gel filtration chromatography in Sephadex G-100. The protein percentage calculated by the method of Lowry was of 68,6% for the whole venom; 3 peaks were obtained during the fractionation; the first showed proteolytic activity, the second, amidolytic, clotting and phospholipase A₂ activities, while the third, another proteolytic activity. Acetylcholinesterase activity was not found while L-amino acid oxidase activity was found only in the whole venom.

Keywords: Venom, rattlesnake, enzymes, Puno.

INTRODUCCIÓN

La serpiente cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* pertenece a la subfamilia Crotalinae y es considerada la más peligrosa de las especies de este grupo en América. Se trata de un reptil corpulento que mide hasta 1,8 m y en el Perú está restringida a la provincia de Sandia, departamento de Puno (Meneses, 1974; Carrillo e Icochea, 1995). Debido a los numerosos accidentes reportados tanto en Norteamérica como en Brasil, se ha

investigado ampliamente su veneno y se ha encontrado manifestaciones clínicas muy severas que van desde la coagulación sanguínea e hipotensión hasta trastornos renales y neurotoxicidad; este último efecto es el responsable de la muerte (Russell, 1983).

En 1938 se aisló una neurotoxina de este veneno, que fue denominada crototoxina (Slotta y Fraenkel-Conrat, 1938-39), la cual se demostró posteriormente que estaba compuesta por una potente fosfolipasa A₂ y un péptido ácido asociado. Más adelante se han purificado otras neurotoxinas como la crotamina (Gonçalves, 1956), convulxina

* Laboratorio de Biología Molecular, ICBAR, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
Email: d190061@unmsm.edu.pe

(Prado-Franceschi y Brazil, 1981) y giroxina (Barrio, 1961); esta última es asociada a la enzima similar a trombina (Alexander *et al.*, 1988).

Una observación interesante es la existencia de variaciones en la composición del veneno de una misma especie debido a diferencias geográficas, estación del año en que se colecta el veneno, edad de la serpiente y la dieta (Minton and Weinstein, 1986). Asimismo se ha encontrado que *C. durissus terrificus* de algunas regiones geográficas en Sudamérica sólo producen descenso de la presión sanguínea (Vellard y Huidobro, 1942).

Como es sabido, el ofidismo es un problema de salud que aflige principalmente a los pobladores de las zonas de selva y en el Perú, donde las serpientes venenosas corresponden a 33 especies algunas de las cuales se ubican en los valles interandinos y la costa (Carrillo e Icochea, 1995). Sin embargo, *C. durissus terrificus* sólo ha sido encontrada en la zona de Sandía y no se tiene mayor información sobre la composición de su veneno y sus efectos biológicos. Los estudios realizados por Cárdenas *et al.*, 1995 con especímenes en cautiverio han permitido establecer la existencia de varias actividades enzimáticas con el propósito de establecer los principales factores que determinan el envenenamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó veneno de la serpiente cascabel *C. durissus terrificus*, colectado de dos especímenes procedentes de la provincia de Sandía (Puno), al sureste del Perú y mantenidos en cautiverio en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El veneno extraído y liofilizado fue almacenado a -8°C .

REACTIVOS

Se utilizó Sephadex G-100, albúmina sérica bovina, L-leucina, o-dianisidina, peroxidasa de rabanita, Ioduro de acetiltiocolina, 4,4'-ditiodipiridina, Na-Benzoil-DL-Arginina-p-nitroanilida (BAPNA), fibrinógeno bovino y caseína, los cuales fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Los demás reactivos químicos usados fueron de grado analítico.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el método de Lowry (1951) y durante el fraccionamiento se midió la concentración de proteínas a 280 nm, usando como patrón a la albúmina sérica bovina.

FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Se aplicó 38 mg de veneno liofilizado disuelto en 1 mL de *buffer* acetato de amonio 0,1M pH 6,0 a una columna de Sephadex G-100 (38,5 x 1,1 cm) eluida con el mismo *buffer* a una velocidad de flujo de 8,7 mL/h, colectándose fracciones de 2 mL.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

L-aminoácido oxidasa

Se determinó por el método descrito en el Worthington Enzyme Manual (Worthington Biochemical Corporation, 1977). La mezcla de reacción contenía: L-leucina 0,1% y o-dianisidina 0,0065% y peroxidasa de rabanita 0,005% en *buffer* Tris HCl 0,2 M pH 7,5; además de la fracción enzimática o el veneno total.

La actividad se determinó por el incremento de la absorbancia a 436 nm.

Acetilcolinesterasa

Fue evaluada por el método de Ellman *et al.* (1961). Para ello se empleó como sustrato Ioduro de acetiltiocolina 25 mM, 4,4'-ditiodipiridina 1,25 mM en *buffer* fosfato 0,05 M pH 7,4. Al adicionarse la alícuota de veneno

o la fracción correspondiente se midió el incremento de absorbancia a 324 nm.

Fosfolipasa A₂

Se empleó solución lipoproteica (yema de huevo) al 5% en *buffer* Tris HCl 10 mM con CaCl₂ 10 mM a pH 7,5, midiéndose el retardo en el tiempo de coagulación luego de 15 minutos de incubación con la fracción o el veneno crudo (Vidal y Stoppani, 1971).

Amidolítica

Se utilizó el sustrato cromogénico Na-Benzoil-DL-Arginina-p-nitroanilida (BAPNA) 9x10⁻⁴ M en *buffer* Tris HCl 0,1 M pH 8,1, midiéndose la aparición del color amarillo a 405 nm luego de agregar la fracción o veneno (Erlanger *et al.*, 1961).

Coagulante

Fue determinada usando 0,2 mL de fibrinógeno bovino 5 mg/mL en *buffer* fosfato salino 0,02 M pH 7,2, se agregó luego 0,1 mL de veneno o fracción; registrándose el tiempo de coagulación en segundos (Copley *et al.*, 1973).

Proteolítica

La actividad proteolítica se determinó según el método de Kunitz, modificado por Takahashi y Ohsaka (1970), empleando caseína al 2% en *buffer* Tris HCl 0,2 M pH 8,5. Luego de agregar la fracción o veneno correspondiente, se midió la aparición de productos ácidos solubles a 280 nm.

ELECTROFORESIS

Los picos obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras (Laemmli, 1970), utilizando como proteínas patrones albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa). Las muestras se corrieron en un gel de resolución al 9,5% por una hora a 100 voltios. El gel fue teñido con azul brillante de Coomassie 0,1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de proteínas del veneno total de *C. durissus terrificus* fue del 68,6%. Este porcentaje es similar al encontrado en otras

Tabla 1. Actividades enzimáticas presentes en el veneno de la serpiente cascabel peruana *Crotalus durissus terrificus* y sus fracciones

Actividades enzimáticas	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (Unidades/mg proteína)			
	Veneno	Pico 1	Pico 2	Pico 3
L-aminoácido oxidasa ^a	3,591	-	-	-
Fosfolipasa A ₂ ^b	3,141	-	6,26	-
Amidolítica ^c	0,02	-	0,102	-
Coagulante ^d	0,17	-	0,499	-
Proteolítica ^e	4,394	26,07	-	8,51
Acetilcolinesterasa ^f	-	-	-	-

^a 1 unidad = nmoles de L-leucina oxidados por minuto

^b 1 unidad = tiempo de retardo en la coagulación por minuto

^c 1 unidad = μmoles de p-nitroanilida liberados por minuto

^d 1 unidad = inversa del tiempo de coagulación

^e 1 unidad = μg de L-tirosina liberados por minuto

^f 1 unidad = μmoles de acetilcolina hidrolizados por minuto

serpientes peruanas de la subfamilia Crotalinae como *Bothrops pictus* (63,8%) y *Bothrops atrox* (69,2%) (Cárdenas, 1995); sin embargo, posee un menor porcentaje con respecto a *C. durissus terrificus* de Argentina (81,4%) y de Brasil (76,9%) (Yarlequé, 1987; Cárdenas, 1995).

Las actividades enzimáticas del veneno de *C. durissus terrificus* son mostradas en la Tabla 1; no se detectó, como puede observarse, la presencia de acetilcolinesterasa en las fracciones y el veneno crudo.

Hemos encontrado una baja actividad L-aminoácido oxidasa. Este resultado es coincidente con lo reportado para el veneno de *C. durissus terrificus* de Brasil y Argentina (Tan and Ponnudurai, 1992; Vidal *et al.*, 1972). La enzima L-aminoácido oxidasa se encuentra presente en pequeñas cantidades en el veneno, ya que éste era de color blanco, y como es sabido posee como grupo prostético al FAD el cual le da la coloración amarilla a los venenos. Sin embargo, a veces esta serpiente puede producir veneno de color amarillo y otras veces de color blanco (Vidal *et al.*, 1972). La acción biológica de esta enzima en el veneno no está determinada, aunque recientemente se ha reportado que posee una acción antibacteriana y posiblemente sea parte del mecanismo de protección (Yarlequé *et al.*, 1997).

Por otro lado, los venenos que presentan alta actividad proteolítica se caracterizan por producir hemorragias, necrosis y severa lisis de las proteínas de los músculos; así los venenos crotálicos son más proteolíticos que los vipéridos y éstos que los elápidos. El veneno de *C. durissus terrificus* siendo un crotálico es poco proteolítico (Otero *et al.*, 1992), lo que concuerda con nuestros resultados y los hallados para ponzoñas de esta especie de Argentina y de Brasil (Yarlequé, 1987; Cárdenas, 1995).

Igualmente La actividad fosfolipasa A_2 encontrada en este veneno es baja con respecto al veneno de otros crotálicos y de venenos de elápidos (Cárdenas, 1995); resultado similar fue reportado por Tan and Ponnudurai (1992). La presencia de esta actividad en el veneno es asociada al complejo crototoxina, lo que explica la nefrotoxicidad, la hemólisis intravascular por alteraciones en la membrana eritrocítica producidas por fosfolipasas de acción indirecta y el *shock* neurotóxico producidos durante el envenenamiento (Brazzil, 1966).

En cuanto a la actividad coagulante, ésta es usualmente debida a la enzima similar a trombina, la que se caracteriza por poseer también actividad amidolítica y estar relacionada con la manifestación del síndrome giroxina en animales inyectados, donde se producen episodios temporarios caracterizados por opistotonos y rotaciones alrededor del eje axial (Alexander *et al.*, 1988; Barrio, 1961). Su presencia explica los trastornos en la coagulación que se dan durante el envenenamiento (Russell, 1983).

El fraccionamiento cromatográfico del veneno crudo sobre una columna de Sephadex G-100 ha mostrado tres picos de proteína (Figura 1). En el primer pico y en el tercero encontramos la presencia de actividad proteolítica; la del primer pico es más activa que la del tercer pico. En el segundo pico encontramos la presencia de actividad amidolítica, coagulante y fosfolipasa A_2 . No se pudo registrar la actividad L-aminoácido oxidasa (Tabla 1), algunos autores sugieren una progresiva inactivación de la enzima de pH 5,5 a 7,5 en el veneno de *Crotalus adamanteus* (Coles *et al.*, 1980); sin embargo en nuestro caso esta situación aún no ha sido explorada.

El análisis electroforético en condiciones denaturantes de los picos obtenidos nos mostró un primer pico con la presencia de proteínas

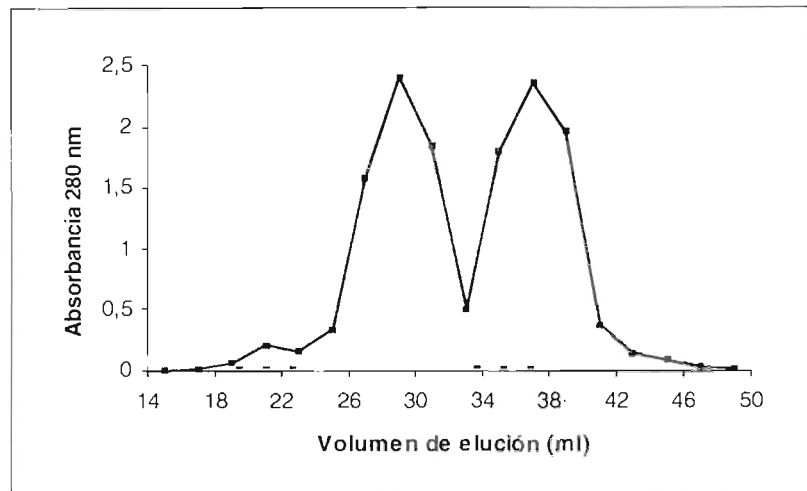


Figura 1: Cromatografía de filtración en gel sobre Sephadex G-100 del veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
(---) Actividad proteolítica

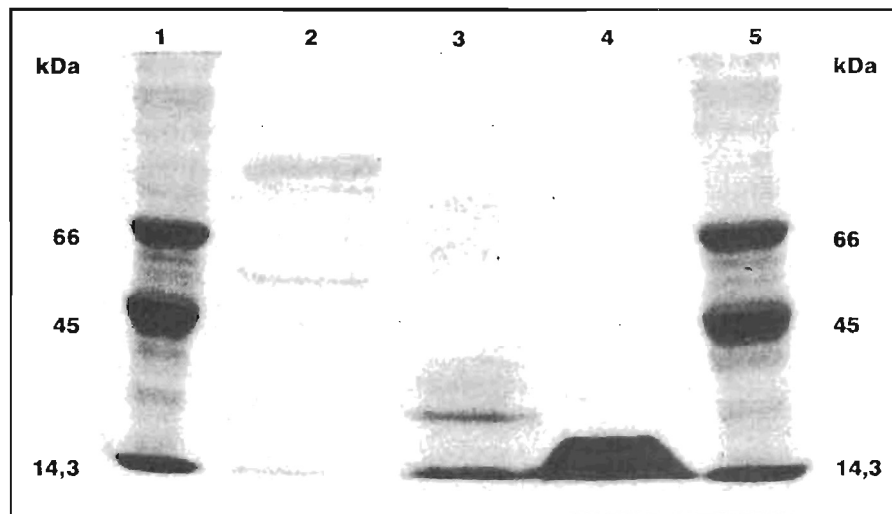


Figura 2: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. Se utilizó un gel de resolución al 9,5%.

- 1 y 5: Marcadores de peso molecular
- 2: Pico 1
- 3: Pico 2
- 4: Pico 3

que migran en un rango de peso molecular de 54,2 a 103,3 kDa aproximadamente; el segundo pico mostró dos bandas de proteína con pesos moleculares aproximados de 22,5 y 14,8 kDa, y el tercer pico una prominente banda con proteínas con pesos moleculares posiblemente menores a 15 kDa (Figura 2). Aun cuando los

electroferogramas nos han permitido una evaluación inicial del número de bandas proteicas en este veneno, es necesario variar algunas condiciones como, por ejemplo, aumentar el porcentaje de acrilamida para obtener una mayor resolución de dichas bandas.

Una exploración más detallada de este veneno nos permitirá elucidar la acción biológica de sus componentes proteicos y su toxicidad en humanos; y, por otro lado, entender por qué esta especie se desarrolla en un hábitat tan estrecho y definido como la selva sudeste de nuestro país, teniendo en cuenta su amplia distribución en la selva de Brasil, Argentina y Bolivia.

LITERATURA CITADA

- Alexander, G.; Grothusen, J.; Zepeda, H. and Schwartzman, R.J. 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* 26, 953-960.
- Barrio, A. 1961. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta. Physiol. Latinoamericana* 11, 224.
- Brazil, O. V. 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan* 33, 981-992.
- Cárdenas, J.; Pantigoso, C., Málaga, O. y Yarlequé, A. 1995. Contenido proteico y algunas actividades enzimáticas en tres venenos de serpientes mantenidas en cautiverio. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*. N.º 3, Vol. LXI N.º 3, 151-163.
- Carrillo, N. and ICOCHEA, J. 1995. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. *Publ. Mus. Hist. Nat. UNMSM (A)* 49, 1-27.
- Coles, C.; Edmondson, O. & Singer, T. 1980. Mechanism of the reversible activation-desactivation of L-aminoacid oxidase. Flavins and Flavoproteins. Tokio, Japan Scientific Press, 101-105.
- Copley, A., Benerjee, S. and Devi, A. 1973. Studies of snake venoms on blood coagulation. I. The thrombo serpentin (thrombin like) enzyme in the venoms. *Thrombos. Res.* 2, 487.
- Ellman, C. Z.; Courtney, K. D.; Andrés, V. and Featherstone, R.M. 1961. A rapid method for the stimulation of acetylcholinesterase. *Biochem. Pharmac.* 7, 88-95.
- Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys* 95, 271-278.
- Gonçalves, J. M. 1956. Purification and properties of crotoxin. In *Venoms*, eds. E. E. Buckley and N. Porges, pp. 261-273.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem* 193, 265-275.
- Meneses, O. 1974. Los animales venenosos y sus peligros. Instituto de Salud Pública, Lima- Perú. Publicación N.º 2, pp. 3-14.
- Minton, S. A. and Weinstein, S.A. 1986. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon* 24, 71-80.
- Otero, R.; Osorio, R.G.; Valderrama, R. and Giraldo, C. A. 1992. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). *Toxicon* 30, 611-620.

- Prado-Franceschi, J. and Brazil, O. V. 1981. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 19, 875-887.
- Russell, F. E. (1983) Snake venom poisoning. Scholium International, Inc. New York - USA., pp. 369.
- Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H.L. 1938-39. Estudos quimicos sobre os venenos ofidicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel. *Mem. Inst. Butantan* 12, 505-513.
- Takahashi, T. and Oohsaka, A. 1970. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Triereresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochim. biophys. Acta* 198, 293-307.
- Tan, N. H. and Ponnudurai, G. 1992. Biochemical characterization of snake venoms. In Recent advances in toxinology research, Vol. 1, pp. 210-258 (Gopalakrishnakone, P and Tan, C.K. Eds.). Venom & Toxin Research Group. Singapore.
- Vellard, J. y Huidobro, F. 1941. Acción comparada de diversos venenos de ofidios sobre la presión arterial. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 17, 72.
- Vidal, J. C. and Stoppani, A. O. M. 1971. Isolation and purification of two phospholipases A₂ from *Bothrops* venoms. *Arch. Biochem. Biophys* 145, 543-556.
- Vidal, J. C.; Cattaneo, P. and Stoppani, A. O. M. 1972. Some characteristic properties of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi*. *Arch. Biochem. Biophys* 151, 168.
- Worthington Biochemical Corporation. 1977. L-Amino Acid oxidase. The Worthington Manual Enzymes reagent related biochemicals, New Jersey, 49.
- Yarlequé, M. 1987. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas en los venenos de las serpientes de las familias: Crotalidae, Viperidae y Elapidae. Tesis para optar el grado académico de Bachiller en Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma.
- Yarlequé, A.; Cárdenas, J.; Escobar, E. and Gutiérrez, S. 1997. Some biochemical properties and antibacterial action of a L-aminoacid oxidase from Peruvian snake venoms. *Toxicon* 35, 489.