

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE MARCOS Fundada en 1551

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST-GRADO

Purificación, caracterización y actividad biológica de una L-aminoácido oxidasa presente en el veneno de la serpiente *bothrops atrox* “jergon”

TESIS para optar al Grado Académico de : MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR

FANNY ELIZABETH LAZO MANRIQUE

LIMA – PERÚ 2005

Purificación, Caracterización y Actividad Biológica de una
L-Aminoácido Oxidasa Presente en el Veneno de la
Serpiente *Bothrops atrox* “Jergón”

Fanny Elizabeth Lazo Manrique

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, así como también en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, en el Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre y en el Laboratorio de Zoología de Invertebrados, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A mis Padres: Alfonso y Gladys mi más profundo agradecimiento,
por su cariño e interés para alcanzar mis metas

A mi esposo por su cariño, comprensión, paciencia y
apoyo invaluable a lo largo de todo este estudio

A mis hijos Raisa y Renzo por su inmenso cariño,
unión comprensión y fuerza para seguir adelante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi asesor y amigo Dr. Armando Yarlequé por su interés, paciencia, dedicación y facilidades para la realización de esta tesis, así como también por todas sus enseñanzas y experiencias compartidas.

A la Dra. Amparo Zavaleta por sus críticas, oportunas correcciones, sugerencias y completa disposición en la evaluación del trabajo.

Mi agradecimiento especial a la Magíster Susana Gutierrez del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana por su orientación y ayuda prestada en el análisis de las pruebas microbiológicas.

Igualmente mi agradecimiento a la Bióloga Rosa Martínez del Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre de la UNMSM y a la Bióloga Gloria Saez del Laboratorio de Servicio de Microbiología, Parasitología y Ambientales de la UNFV por su constante apoyo en el análisis de las pruebas parasitológicas.

Al Biólogo Ruperto Severino del Laboratorio de Zoología de Invertebrados, al Biólogo Orestes Málaga Málaga del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM por su cordialidad y apoyo invaluable en el desarrollo del presente trabajo.

A mis profesores de la Maestría en Biotecnología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por las enseñanzas recibidas

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, que me brindaron su apoyo para realizar los estudios de Maestría y el trabajo de tesis.

Expreso mi sincero reconocimiento a las personas que de uno u otro modo contribuyeron a la culminación de la presente investigación

CONTENIDO

	Pág.
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	3
Antecedentes.....	6
Materiales y Métodos.....	11
Resultados.....	24
Discusión.....	44
Conclusiones.....	66
Referencias Bibliográficas.....	67

ABREVIATURAS

CE ₅₀	Concentración efectiva al 50%
CM-Sephadex C-50	Carboximetil Sephadex C-50
DEM	Dosis edemática mínima
EDTA	Acido etilen diamino tetra acético
kDa	Kilodaltons
LAO	L-Aminoácido oxidasa
mg	Miligramo
NaCl	Cloruro de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N'- tetrametiletilendiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
µg	Microgramo

RESUMEN

Se ha purificado y caracterizado la L-Aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, empleando dos pasos cromatográficos, una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-100 y otra de intercambio catiónico sobre CM-Sephadex C-50 equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 6. El grado de purificación fue de 12,14 veces con una actividad específica de 4,13 U/mg. Esta enzima es una glicoproteína ácida (17 % de carbohidratos asociados), homodimérica de 127,879 daltons de peso molecular, formada por dos subunidades de 63,128 daltons y posee por lo menos un enlace disulfuro intracatenario, que es importante para su actividad. La enzima mostró un pH óptimo de 8,3 usando L-leucina como substrato, es inestable en el rango de pH alcalino a partir de 9,0; pierde actividad en presencia de Zn^{2+} y tolera temperaturas hasta los 55°C. Se demostró la pureza y antigenicidad de la enzima mediante inmunodifusión e inmunolectroforesis, empleando suero antibotrópico polivalente. Así mismo el efecto antibacteriano tanto del veneno crudo como de la enzima purificada se evidenció utilizando la técnica de Grove sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* observándose que las bacterias Gram positivas son más susceptibles que las Gram negativas. Además el veneno crudo de *B. atrox* y LAO presentaron un efecto *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis* con una CE_{50} de 7,82 y 1,33 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, con una CE_{50} de 7,95 $\mu\text{g/ml}$ para el veneno crudo y 1,38 $\mu\text{g/ml}$ para la enzima purificada. La enzima L-aminoácido oxidasa no tiene actividad hemorrágica sobre piel de ratones albinos, ni hemolítica sobre eritrocitos humanos lavados. Sin embargo produce edema, habiéndose calculado la DEM en 15,18 μg de proteína.

Palabras clave: L-aminoácido oxidasa, serpiente, enzima, *Bothrops atrox*, veneno

SUMMARY

A L-Aminoacid oxidase enzyme was purified and characterized from *Bothrops atrox* snake venom by two steps. It used a Sephadex G-100 column and ion exchange on CM-Sephadex C-50 at pH 6. The purification grade was 12,14 folds with a specific activity of 4,13 U/mg. This enzyme with a molecular weight of 127,879 daltons as determined by gel filtration is a noncovalent dimer consisting of two subunits with a molecular weight each of 63,128 daltons as determined by SDS-PAGE, with at least one intrachain disulfide bond that is important for its activity. The enzyme exhibited a optimum pH of 8,3 using L- leucine as substrate. It is an acid glycoprotein containing 17% carbohydrate, being thermoestable till 55 °C, labil to alkaline pH and susceptible to presence of Zn²⁺. The antigenicity and homogeneity of enzyme was demonstrated by immunodiffusion and immunoelectrophoresis using polivalent antiothropic antivenom. Beside antibacterial effect of whole venom as well as purified enzyme was demonstrated by Grove's method on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* grown cultures, being Gram positive bacteria, more susceptible than Gram-negative bacteria. Moreover *B. atrox* crude venom and its purified enzyme LAO, presented an *in vitro* effect against *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes with an EC₅₀ of 7,82 and 1,33 µg/ml respectively, and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with an EC₅₀ of 7,95 µg/ml for whole venom and 1,38 µg/ml for purified enzyme. LAO does not have haemorrhagic nor hemolytic activities on mouse skin (20-22 g body weight) and human red blood cells respectively. However LAO produces edema with a DEM of 15,18 µg of protein.

Key words: L-amino acid oxidase, snake, enzyme, *Bothrops atrox*, venom

INTRODUCCION

El estudio de los recursos naturales es muy importante ya que ellos son fuente de principios activos con una gran variedad de efectos farmacológicos. El desarrollo de programas para la obtención de nuevos productos naturales útiles en salud humana tiene como punto de partida la detección e identificación de compuestos bioactivos de fluidos animales y extractos de plantas. En este sentido, los venenos de serpientes constituyen una excelente fuente biológica para el aislamiento de moléculas con potencial uso farmacológico, algunas de las cuáles ya han demostrado su eficacia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso.

El Perú cuenta con una variada fauna ofídica siendo la especie *Bothrops atrox* perteneciente a la familia Viperidae, sub familia Crotalinae la especie de mayor distribución y la responsable de la mayoría de accidentes ofídicos en la región selvática, principalmente Loreto, Madre de Dios y Ucayali (Carrillo e Icochea, 1995). Se le conoce comúnmente con los nombres de “Jergón”, “Jergona”, y entre los aguarunas: “Machacú”, “Marashan”, “Nashipkit”.

Bothrops atrox es una especie terrestre, presenta la cabeza en forma de punta de lanza, el dorso posee un patrón ornamental que consiste en una serie de bloques rectangulares o trapezoidales y el color es sumamente variable, pudiendo ser olivo, pardo, canela, gris, amarillo u ocasionalmente rojizo (Campbell y Lamar, 1989). Puede alcanzar un tamaño de 2,4 m (Fig. 1) Su alimentación consiste en pequeños roedores y lagartijas (Carrillo, 1983).

Dentro de los numerosos componentes enzimáticos del veneno de la serpiente *B. atrox* destacan las enzimas proteolíticas y fosfolipasas. Estas han sido aisladas y caracterizadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, habiéndose establecido una relación con ciertos efectos del envenenamiento tales como la hemorragia y alteraciones de la coagulación

sanguínea (Pantigoso et al., 1996). También dentro de estos componentes se encuentra la L- aminoácido oxidasa, (LAO o L-AAO).

La L-aminoácido oxidasa (EC 1.4.3.2) es una flavoenzima responsable del color amarillo de los venenos que cataliza y es específica para la desaminación oxidativa de un L-aminoácido usado como substrato a un α -cetoácido con la producción de amoníaco y peróxido de hidrógeno.

En los venenos de vipéridos las L-aminoácido oxidasas se encuentran en una proporción promedio del 4% (p/p) del total de las proteína de la ponzoña (Iwanaga y Suzuki, 1979) y su actividad usualmente es más elevada que en los venenos de elápidos (Mebis, 1970). El veneno de serpientes constituye una buena fuente para la obtención de la enzima LAO para su estudio y caracterización.

Antes de la década del 90, el aislamiento y caracterización de LAO de venenos de serpientes estaba dirigido principalmente al estudio de las propiedades enzimáticas y fisicoquímicas tales como mecanismos de acción e inactivación por cambios de pH o congelamiento (Porter y Bright, 1980). Además Curti et al. (1992) revisó en detalle las propiedades enzimáticas de las L - y D - aminoácido oxidasas. En los últimos años las L-aminoácido oxidasas de venenos están siendo aisladas y purificadas para estudiar las interacciones que presentan durante los procesos de agregación plaquetaria (Takatsuka et al., 2001) e inducción de hemorragia y apoptosis (Torii et al., 2000).

El desarrollo de un método de purificación para LAO permite no solo estudiar las propiedades bioquímicas de esta enzima, sino también evaluar su acción biológica como constituyente del veneno y su participación en el mecanismo del envenenamiento, además de la desaminación oxidativa de un L-aminoácido.

La acción antibacteriana de los venenos de serpientes frente a bacterias patógenas tales como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ha sido descrita

por Aloof-Hirsch et al. (1968). Fernández-Gómez et al. (1994) reportaron también que el veneno de *Cerastes cerastes* y *Naja naja* inhibía el crecimiento de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani infantum* y Tempone et al. (2001) observaron que la L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops moojeni* causaba la muerte de *Leishmania spp.* Esta actividad antimicrobiana se debería al peróxido de hidrógeno liberado de la reacción enzimática, generando LAO un mecanismo de protección para la serpiente, pues eliminaría los microorganismos en piel y tejidos internos de las presas de las que se alimentan (Thomas y Pough, 1979).

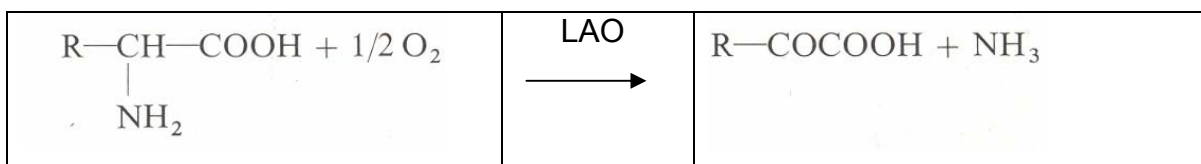
Por estas razones, el presente trabajo ha consistido en aislar y purificar la LAO y determinar las propiedades bioquímicas y evaluar el efecto biológico y antimicrobiano *in vitro* de la enzima purificada del veneno de *B. atrox* sobre microorganismos patógenos.

El estudio de LAO y su potencial aplicación en salud humana, abre un camino alternativo para el empleo de productos naturales, de manera que LAO, podría convertirse en una herramienta biotecnológica para el tratamiento antimicrobiano, es decir, en un futuro se podrían preparar fármacos usando como modelo la región peptídica con estas actividades e incluso se podrían obtener proteínas recombinantes de uso humano.

ANTECEDENTES

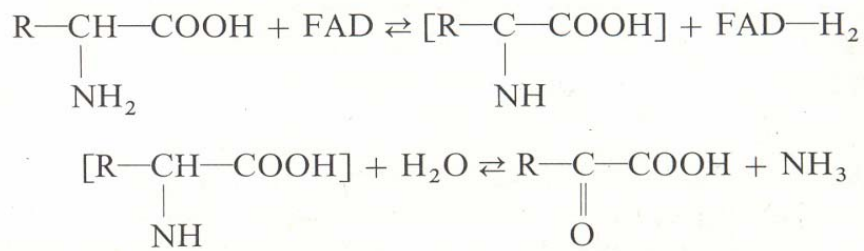
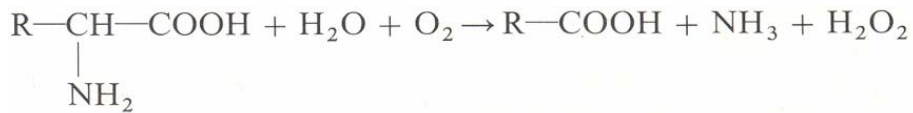
Los venenos de serpientes son complejos proteicos farmacologicamente activos de naturaleza heterogénea y altamente antigénicos. Si bien es cierto que la investigación sobre su contenido proteico ha sido enfocada mayormente hacia la producción de sueros antiofídicos, en los últimos años se ha encontrado que los principios activos que contienen son potencialmente útiles no sólo en medicina sino como herramientas biológicas, tanto en la investigación bioquímica como farmacológica. LAO es una flavin oxidasa específica para la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos. La reacción descrita por Iwanaga y Suzuki (1979), varía dependiendo de la presencia de catalasa y va seguida de la reducción del FAD como se observa a continuación.

En presencia de catalasa:

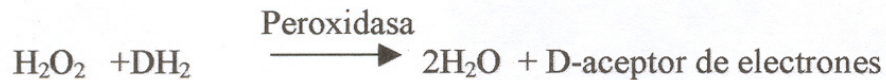


En esta reacción no se forma peróxido de hidrógeno.

En ausencia de catalasa: Existe la formación de un producto intermedio que es el iminoácido, el cual es fácilmente hidrolizado a α -cetoácido en presencia de agua. Luego este α -cetoácido es descarboxilado y oxidado al correspondiente ácido graso por el peróxido de hidrógeno, que es producido de acuerdo a la siguiente reacción:



Por su parte el FAD es reducido por el substrato para luego reoxidarse con la producción de peróxido de hidrógeno.



La actividad de LAO fue observada primeramente por Krebs (1933) en los homogenizados de hígado y riñón, más tarde Blanchard et al. (1944) fueron los primeros en aislarla del riñón de rata. La presencia de LAO en venenos de serpientes fue por primera vez descrita por Zeller y Maritz (1944) en el veneno de *Vipera aspis*. La LAO presente en el veneno de las serpientes es más activa que la encontrada en el hígado y riñón de conejo y del mismo modo la actividad de esta enzima es alta en el veneno de los Crotalidae y Viperidae (Zeller, 1948; Mebs, 1970; Jiménez Porras, 1970). Singer y Kearney (1950) la purificaron por primera vez del veneno de *Agkistrodon piscivorus* y posteriormente Wellner y Meister (1960) la cristalizaron a partir del veneno de *Crotalus adamanteus*. Massey y Curti (1967) estudiaron sus propiedades enzimáticas, fisicoquímicas y mecanismos de acción en tanto que, Porter y Bright (1980) estudiaron la inactivación por cambios de pH. Curti et al. (1968) y Coles et al. (1977) reportaron

la inactivación por congelamiento y más adelante Curti et al. (1992) revisaron en detalle las propiedades de las L- y D- aminoácido oxidasas.

Desde entonces se ha encontrado la actividad de la enzima y en algunos casos se ha purificado de los venenos de varias serpientes tanto de la familia Viperidae, Crotalidae como Elapidae en cantidades significativas de masa y con alta actividad enzimática, como es el caso de LAO de *Calloselasma rhodostoma* (30% del veneno total), Ponnudurai et al. (1994) y es desde luego una buena fuente para el estudio de esta enzima. Tan y Ponnudurai (1991), también detectaron LAO en el veneno de serpientes marinas (Familia Hydrophiidae) aunque con baja actividad.

Se ha relacionado la presencia del color amarillo en los venenos con la existencia de la enzima y su cofactor FAD, encontrándose además diferencias en la toxicidad y actividades proteolíticas respecto a los venenos incoloros. Es interesante señalar que la presencia y la concentración de esta enzima puede diferir entre individuos de especies relacionadas, de una misma especie e incluso en un mismo individuo que excepcionalmente puede producir venenos incoloro y amarillo en cada una del par de glándulas venenosas que poseen, lo que se encontró en *Crotalus viridis helleri* (Johnson et al., 1987) y *Crotalus durissus ruruima* (Dos Santos et al., 1993).

A pesar de ser una de las enzimas del veneno primeramente investigadas (Zeller y Maritz, 1944), su rol como constituyente de los venenos no ha sido esclarecido totalmente, ya que se han observado y estudiado diferentes funciones: activador de peptidasas y proteasas tisulares (Zeller, 1951), destructor de precursores de las catecolaminas (Zeller, 1966), inductor de la agregación plaquetaria (Li et al., 1994), inhibidor de la agregación de plaquetas (Takatsuka et al., 2001; Suhr y Kim, 1996), participante en el proceso digestivo de la serpiente (Minton y Minton, 1980), agente antibacteriano (Bradley, 1991; Yarlequé et al., 1997 y Stiles et al., 1991), inductor de apoptosis (Souza et al., 1999), inductor de edema y hemólisis (Ali et al., 2000). Recientemente Tempone et al. (2001) reportó que la enzima de

Bothrops moojeni causa la muerte *in vitro* de los promastigotes de *Leishmania spp.*

Así mismo LAO es una herramienta valiosa con potencial uso en la investigación bioquímica en los siguientes aspectos: determinación de L-aminoácidos en preparaciones de D-aminoácidos (Zeller y Maritz, 1944), preparación de α -cetoácidos a partir de L-aminoácidos (Meister, 1956), identificación de L-aminoácidos separados por cromatografía en papel (Avrameas y Uriel, 1965), preparación de tirosina a partir de 3,5 di-yodo tirosina (Shiba y Cahnmann, 1962), obtención de FAD desprovisto de impurezas (Singer y Kearney, 1950), determinación cuantitativa de fenilalanina en pacientes con fenilcetonuria (Zeller, 1966), determinación de tirosina libre en el suero de pacientes con hipertiroidismo e hipotiroidismo.

Por otro lado Glaser (1948) y Skarnes (1970) describieron el efecto antibacteriano de los venenos de vipéridos; atribuyéndole Skarnes este efecto a LAO. Más tarde Bradley (1991) observó el mismo efecto, tanto en los venenos de elápidos como vipéridos y en forma más específica por acción de la LAO del veneno del elápidos *Pseudechis australis* contra bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Aeromonas hydrophila* un importante patógeno de reptiles y anfibios.

Otros grupos de animales que poseen venenos con propiedades antibacterianas son la abeja *Apis mellifera* (Fennel et al., 1968), que produce la "mellitina", péptido con un peso molecular de 2800 daltons; y el anuro *Bombina variegata pachypus* (Barberio et al., 1987; Mastromei et al., 1991), que posee en su piel, un polipéptido tóxico con un peso molecular de 6700 daltons.

En el Perú se encuentran escasos reportes respecto a esta enzima. Cárdenas et al. (1995) detectaron su presencia en los venenos de las especies peruanas *Lachesis muta*, *Bothrops pictus*, *Bothrops atrox* y *Crotalus durissus terrificus*. Cisneros (1996) y Solís et al. (1999) aislaron la enzima de los venenos de

Lachesis muta y *Bothrops brazili* respectivamente, determinando su sensibilidad a los cambios de pH, diálisis y estabilidad a la desecación por aire y demostrando además su efecto antibacteriano sobre algunas cepas de importancia médica.

Desde el punto de vista de la salud pública, esta serpiente requiere ser profundamente estudiada ya que a pesar de disponer de un antiveneno polivalente contra varias especies de este género preparado por el Instituto Nacional de Salud, se requieren nuevos estudios para modernizar la tecnología de estos antivenenos. Pero el otro aspecto fundamental es el contenido del veneno, siendo politóxico, contiene proteínas cuya investigación bioquímica es necesaria para que algunos de estos componentes puedan ser utilizados como herramientas biotecnológicas en la preparación de fármacos, tal como ocurre con proteínas aisladas como coagulantes o hipotensoras, que son productos industriales de uso médico, los cuales fueron obtenidos de otros venenos ofídicos.

Respecto a la investigación del veneno de *Bothrops atrox* en el Perú, se puede resumir de la siguiente manera: se ha estudiado en forma preliminar su acción citotóxica, edemática, coagulante y hemorrágica (Zavaleta et al., 1992; Nahas et al., 1991), posteriormente se han detectado varias enzimas como 5'Nucleotidasa, exonucleasa y endonucleasa, (Heredia et al., 1982; Yarlequé et al., 1983) y también se ha purificado una proteasa denominada Atroxina (Pantigoso et al., 1996).

Teniendo en cuenta estas premisas y el hecho que Yarlequé et al. 1977 detectara su acción antibacteriana en el veneno de *B. atrox*, así como Tempone (2001) demostró que LAO de serpientes brasileñas tiene acción letal sobre promastigotes de *Leishmania* nos propusimos realizar la investigación sobre esta proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico:

1.1 Veneno: Se utilizó veneno crudo de especímenes adultos de la serpiente *Bothrops atrox*, procedentes de la Zona de Pucallpa, Dpto. de Ucayali, mantenidos en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Fig. No.1). El veneno extraído por presión manual de las glándulas, fue liofilizado y conservado a -8°C .



Fig. N° 1. *Bothrops atrox* “Jergón”

1.2 Cepas microbianas: Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, *Vibrio cholerae* Serotipo Inaba INS *Streptococcus faecalis* INS CP 696 y *Escherichia coli* ATCC 51A266 y los protozoarios *Leishmania braziliensis braziliensis* 0730 en fase promastigote, proporcionada por el

Laboratorio de Servicio de Microbiología, Parasitología y Ambientales de la UNFV y *Trypanosoma cruzi* en fase epimastigote cuya procedencia es de hamsters y ratones albinos infectados en el Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM y cultivados en medio Tobie.

1.3 Animales de experimentación: Se usaron ratones albinos de ambos sexos de 18-20 g de peso procedentes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.

2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA

2.1 Método de Lowry.- En todos los ensayos el contenido proteico del veneno crudo y de la proteína purificada se determinó, empleando el método de Lowry et al. (1951), modificado por Loayza et al. (1985). Para ello se mezcló 0,1 ml de la enzima purificada con 0,4 ml de agua destilada y 2 ml de la solución alcalina (carbonato de sodio al 4%, sulfato de cobre al 2% y tartrato de sodio y potasio al 4% (100:1:1); incubándose a 37 °C por 15 minutos, luego de lo cual se añadió 0,5 ml del reactivo Folin Ciocalteus 1:6, continuando la incubación por 30 minutos adicionales. Finalmente se midió la absorbancia a 660 nm y se determinó la concentración de proteína con respecto a un estándar de albúmina sérica bovina.

2.2 Método de absorción de luz ultravioleta.- Este método se basa en la propiedad que tienen los anillos aromáticos de absorber luz UV. Solamente durante el proceso de purificación de la enzima, el contenido proteico fue estimado midiendo la absorbancia de luz ultravioleta a 280 nm (Warburg y Christian, 1941) en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02.

3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.- La actividad de LAO se determinó por el método descrito en el Worthington Enzyme Manual (1993). En 2,9 ml de buffer Tris HCl 0,2M pH 7,5 conteniendo L-leucina 0,1% y O-dianisidina 0,0065%, se agregaron 10 μ l de peroxidasa al 0,001%. La mezcla se preincubó durante 5 minutos a 37 °C y luego se agregaron 25 μ l de la solución de enzima o veneno crudo, determinándose el incremento de absorbancia a 436 nm. La actividad enzimática fue expresada en μ moles de L-leucina oxidados por minuto. En tanto que la actividad específica se expresó en Unidades/miligramo de proteína. Una unidad de actividad corresponde a la oxidación de 1 μ mol de L-leucina por minuto.

4. ESTABILIDAD AL pH.- Con el propósito de establecer la máxima estabilidad de la enzima al pH, se prepararon una serie de tubos que contenían buffer acetato de amonio 0,1M pH 5,6 y buffer Tris HCl 0,1M pH 7, 8 y 9. De cada buffer se tomaron 2,8 ml y se agregó 0,2 ml del veneno de *B. atrox* 2 mg/ml. Las muestras fueron colocadas a 20 °C, midiéndose la actividad enzimática desde 0 a 96 horas.

5. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA:

5.1 Preparación de la muestra: 80 mg del veneno liofilizado de *Bothrops atrox* se resuspendieron en 1,6 ml de buffer acetato de amonio 0,05M pH 6 y los restos insolubles se eliminaron por centrifugación a 4000 rpm por 20 minutos.

5.2 Cromatografía en Sephadex G-100: El sobrenadante obtenido fue aplicado a una columna de filtración de Sephadex G-100 (49 x 1,1 cm), utilizándose como buffer de elusión acetato de amonio 0,05M pH 6. La corrida se realizó a 20 °C a un flujo de 7,45 ml/h; colectándose fracciones de 2 ml con ayuda de un colector automático LKB y determinándose en ellas la concentración de proteína, así como la actividad enzimática de LAO. Las fracciones con mayor actividad específica fueron reunidas en un pool.

5.3 Cromatografía en CM-Sephadex C-50: El pool obtenido en el paso anterior fue aplicado a una columna de intercambio catiónico de CM-Sephadex C-50 (23 x 1,2 cm), equilibrada con el mismo buffer, colectándose fracciones de 1 ml a una velocidad de flujo de 17 ml/h. Las fracciones con mayor actividad de LAO fueron reunidas para evaluar su pureza y su posterior caracterización.

6. EVALUACIÓN DE LA PUREZA.- La pureza de la LAO fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), de acuerdo al método de Laemmli (1970) . Adicionalmente la pureza fue evaluada por inmunodifusión e inmunoelectroforesis en geles de agarosa al 1% preparados sobre láminas portaobjetos (Ouchterlony y Nilsson, 1978)

6.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).- Con la finalidad de estimar la pureza, así como el peso molecular de la proteína en estudio, se empleó PAGE-SDS de acuerdo al siguiente protocolo:

Reactivos:

- Solución stock de acrilamida: Acrilamida al 30% y bis-acrilamida 0,8%.
- Buffer de gel de resolución: Tris HCl 0,75M, SDS 0,2% pH 8,8
- Buffer de gel de stacking: Tris HCl 0,25M, SDS 0,2% pH 6,8
- Buffer de corrida: Tris HCl 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1% pH 8,3
- Buffer de muestra: Tris HCl 0,06M, SDS 0.05%, glicerol 10% (v/v) y mercaptoetanol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,05%
- El buffer de muestra no reductor carece de mercaptoetanol.

Preparación del gel de resolución:

- Se mezclaron 0,6 ml de agua destilada, 1,2 ml de la solución stock de acrilamida, 1,8 ml del buffer gel de resolución, 5 µl de tetra etil metilen diamino (TEMED) y 0,1 ml de persulfato de amonio 20 mg/ml. Esta mezcla se aplicó a una cámara de electroforesis vertical Techware-Sigma y se dejó gelificar durante 15 minutos.

Preparación del gel de stacking:

- Se mezclaron 0,4 ml de agua destilada, 0,2 ml de la solución stock de acrilamida, 0,8 ml del buffer gel de stacking, 5 µl de TEMED y 50 µl de persulfato de amonio 20 mg/ml. Esta mezcla se aplicó sobre el gel de resolución y se dejó gelificar durante 5 minutos.

Preparación de la muestra:

- 20 µl de la enzima (6,5 µg de proteína) fueron tratados bajo dos condiciones. En un caso mezclando con 5 µl de buffer reductor y en otro con 5 µl de buffer no reductor. Ambas muestras fueron calentadas a 100 °C por 5 minutos, luego de lo cual se aplicaron a los pocillos del gel.

Proteínas estándares:

- Se emplearon 5 µl de una mezcla de albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa); cada proteína a una concentración de 2 mg/ml.

Condiciones eléctricas:

- La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 voltios, durante una hora.

Tinción y decoloración del gel:

- El gel fue teñido durante 5 minutos con una solución de azul brillante de Coomassie 0,1% e inmediatamente después fue sometido a decoloración con varios lavados de una solución conteniendo metanol, ácido acético y agua (25:8:67)

6.2 Inmunodifusión e Inmunolectroforesis.- El veneno crudo y la enzima LAO se analizaron por inmunodifusión e inmunolectroforesis, contra suero antibotrópico polivalente obtenido del Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima.

La prueba de inmunodifusión se llevó a cabo sobre geles de agarosa al 1% en buffer fosfato 0,15M pH 7,0. La agarosa fue disuelta en el buffer indicado a 100 °C por 5 minutos y 3 ml de esta solución se extendieron en láminas

portaobjetos, dejándose enfriar durante 10 minutos. Luego se le hicieron tres pocillos en línea y equidistantes. En el pocillo central se colocó 10 µl de suero antibotrópico en uno de los pocillos laterales 10 µl del veneno crudo (5mg/ml) y en el otro 10 µl de la enzima purificada (0,325 mg/ml). La difusión se llevó a cabo en una cámara húmeda a 20 °C durante 48 horas luego de lo cual se lavó con citrato trisódico al 5% por 10 minutos y finalmente se realizaron seis lavados de seis horas cada uno con NaCl 0,9%. A continuación se hizo un lavado con agua destilada durante 10 minutos y luego la lámina se cubrió con papel filtro humedecido en agua destilada, para colocarla en una estufa a 37 °C por 24 horas. Una vez secos los geles, se procedió a teñirlos con azul brillante de Coomasie al 0,1% por 5 minutos y luego se decoloró con la misma solución decolorante empleada para electroforesis, hasta que se evidenciaron las bandas de proteína (Ouchterlony y Nilsson, 1978).

La prueba de inmunolectroforesis se realizó también en geles de agarosa al 1% en buffer glicina 0,05M pH 8,3. Luego de la gelificación se hicieron dos pocillos cerca de un extremo de la lámina y en ellos se colocó 5 µl de la enzima purificada (0,325 mg/ml) y 5 µl de veneno crudo de *B. atrox* (5mg/ml) para realizar la electroforesis con el buffer antes mencionado. El polo negativo se estableció en el extremo cercano a los pocillos y el polo positivo en el extremo opuesto. Luego de dos horas de corrida con un amperaje de 2 mA por lámina, se hizo una canaleta horizontal al centro de la lámina y en ella se colocaron 30 µl de suero antibotrópico, realizando la inmunodifusión de acuerdo a lo descrito anteriormente (Ouchterlony y Nilsson, 1978).

7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA:

7.1 Determinación del peso molecular.- Adicionalmente al empleo de la técnica electroforética por PAGE-SDS se utilizó la cromatografía de filtración molecular, usando una columna de Sephacryl S-200 (42,4 X 1,1 cm),

equilibrada con buffer Tris HCl 0,05M NaCl 0,15M pH 7,5, en la cual se aplicaron por separado la proteína en estudio y las proteínas estándares a una concentración de 4mg/ml, tales proteínas fueron alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). Para el cálculo del peso molecular se plotearon los V_e/V_o versus el logaritmo de los pesos moleculares (Andrews, 1964).

7.2 Termoestabilidad.- El efecto de la temperatura sobre la enzima purificada fue evaluado preincubando alícuotas de 30 μ l de la enzima a 37, 45, 55, 65, 75 y 100 °C durante 10 minutos. Luego de este tiempo las muestras fueron enfriadas a 4 °C por 30 minutos, midiéndose a continuación la actividad LAO a pH 8,3 con 20 μ l de la muestra.

7.3 pH óptimo.- Se determinó la actividad LAO sobre L-leucina, según lo descrito en el Manual Worthington (1993) a distintos valores de pH. Con tal fin, se utilizó en la mezcla de reacción buffer acetato de amonio 0,2 M a pH 5,0, 5,5, 6,0 y 6,5, y buffer Tris HCl 0,2 M a pH 7, 7,5, 8,0, 8,5 y 9. La actividad enzimática fue dosada con 25 μ l de la enzima y el substrato se preparó al doble de la concentración.

7.4 Efecto de iones metálicos.- Se probó el efecto sobre la actividad LAO de los iones magnesio, manganeso, calcio y zinc, bajo la forma de cloruros a concentraciones finales en la mezcla de reacción de 0,75, 1,5, 3 y 6 mM. La actividad enzimática fue evaluada con 15 μ l de la enzima previamente incubada 5 minutos con el ion respectivo.

7.5 Efecto de algunos inhibidores enzimáticos.- Se evaluó el efecto de algunos inhibidores enzimáticos sobre la actividad L- aminoácido oxidasa, tales como el ácido iodoacético, β -mercaptoetanol, ácido glutámico, EDTA y glutatión a las concentraciones de 2,5, 5,0 y 10 mM. En cada caso, 20 μ l del

agente se preincubaron con 20 μ l de la enzima a 37 °C durante 10 minutos y luego se midió la actividad enzimática con 30 μ l de la mezcla.

7.6 Contenido de carbohidratos asociados a la enzima:

7.6.1 Determinación de hexosas.- El fundamento de esta prueba involucra la hidrólisis de las hexosas presentes produciendo un compuesto incoloro intermediario, el hidroximetil furfural, el cual reacciona con el orcinol formando un compuesto coloreado que puede ser determinado espectrofotométricamente.

En el veneno crudo y en la enzima purificada, se determinó el contenido de hexosas de acuerdo al método de Winzler (1955). La mezcla de reacción contenía 0,1 ó 0,2 ml del veneno de *Bothrops atrox* (10 mg/ml) o de la enzima purificada (0,520 mg/ml), alcalinizada con hidróxido de sodio 3N, completando con agua destilada a 0,5 ml. Luego se añadió 2 ml del reactivo Orcinol-ácido sulfúrico; calentándose posteriormente a 80 °C por 15 minutos y dejando enfriar en agua para inmediatamente medir la absorbancia de esta mezcla a 540 nm. Los valores obtenidos fueron convertidos a mg de hexosa por comparación con un estándar que contenía una mezcla de manosa-galactosa 0,2 mg/ml y finalmente se expresó como porcentaje de hexosa respecto de la cantidad de proteína

7.6.2 Determinación de hexosaminas.- La prueba se fundamenta en la hidrólisis ácida de la muestra lo que provoca la liberación de la hexosamina y su acetilación con acetil acetona; su posterior tratamiento con álcali forma un pirrol, el cual se une al p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich) para formar un compuesto coloreado que espectrofotométricamente se determina a 530 nm (Winzler, 1955).

La mezcla utilizada contenía 0,2 ó 0,4 ml del veneno crudo de *B. atrox* (12,5 mg/ml) o de la enzima purificada (0,520 mg/ml) previamente hidrolizados con ácido clorhídrico 3 N a 100 °C por cuatro horas y

neutralizados posteriormente con hidróxido de sodio 3 N; completando con agua destilada a 0,5 ml. Luego se añadió 0,5 ml de reactivo acetil acetona, se mezcló y se hizo hervir por 15 minutos.

Posteriormente se añadió 2 ml de etanol al 95% y 0,5 ml del reactivo de Ehrlich para medir después de 30 minutos de reposo a 20 °C la absorbancia a 530 nm.

Los valores obtenidos fueron convertidos a mg de hexosamina por comparación con un estándar de glucosamina 0,5 mg/ml. Dichos valores se expresaron como porcentaje de hexosamina respecto de la cantidad de proteína usada.

7.6.3 Determinación de ácidos siálicos.- Esta prueba se fundamenta en la remoción de los grupos acetilo o glicolilo del grupo amino de los ácidos siálicos por un medio fuertemente ácido. El producto de esta reacción se oxida por la acción del periodato. El ácido β -formilpirúvico, se acopla con el ácido 2-tiobarbitúrico, formándose un cromóforo rojo con un máximo de absorción a 549 nm que es extraído de la mezcla con ciclohexanona (Warren, 1959).

La mezcla de reacción contenía: 0,1 ml del veneno crudo de *B. atrox* (12,5 mg/ml) ó 0,2 ml de la enzima purificada (0,520 mg/ml), previamente sometidos a 80 °C por una hora con ácido sulfúrico 0,1N; completándose hasta 0,2 ml en los casos que fuera necesario con agua destilada. Luego se adicionó 0,1 ml de solución de periodato, se homogenizó y se dejó en reposo por 20 minutos a 20 °C, posteriormente se adicionó 1 ml de la solución de arsenito, agitando hasta desaparecer el color amarillo y 2 ml de ácido 2-tiobarbitúrico. Luego los tubos fueron colocados en un baño de agua hirviente por 15 minutos. Luego de que se enfriaron se tomó 1,5 ml de cada uno y se le agregó 1,5 ml de ciclohexanona (1:1), se agitó dos veces y se centrifugó a 3 000 rpm por 10 minutos, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 549 nm.

Los valores obtenidos fueron convertidos a mg de ácido siálico y se expresaron como porcentaje de ácido siálico respecto de la cantidad de proteína usada

8. ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

8.1 Efecto antibacteriano.- El efecto antibacteriano del veneno crudo de *B. atrox* y de la enzima purificada, fue probado sobre bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, *Streptococcus faecalis* INS CP 696, *Escherichia coli* ATCC 51A266 y *Vibrio cholerae* Serotipo Inaba INS, usando el método de cilindro en placa (Grove y Randall, 1955). Alícuotas de 10 µl del veneno de *B. atrox* en cantidades de 10, 25 y 50 µg y 10 µl de la enzima purificada en cantidades de 3, 6 y 12 µg fueron aplicadas respectivamente en orificios hechos en el agar Müeller Hinton. Los controles se hicieron colocando 10 µl de cloruro de sodio al 0.9% en lugar de las muestras en estudio. Así mismo se hicieron pruebas con 10 y 20 µl de peroxidasa al 0.01% incubados con 10 µl de LAO (3, 6 y 12 µg), con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. Cada ensayo se realizó por triplicado.

El agar Müeller Hinton se preparó disolviendo 38 g en un litro de agua, posteriormente se autoclavó a 121 °C por 15 minutos, luego de lo cual se ajustó el pH a $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C.

Se dejó difundir por 24 horas las muestras de veneno crudo y LAO en el agar antes de inocular las bacterias y luego de 24 horas se evaluaron los halos de inhibición bacteriana.

8.2 Efecto antiprotozoario.- Se evaluó la actividad de LAO sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis*, y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cultivados en medio Tobie. A este medio se añadió sangre de conejo desfibrinada e inactivada a una temperatura de 25 °C. El medio constaba de dos fases:

Fase sólida: Extracto de carne 1,5 g, peptona 2,5 g, cloruro de sodio 4 g, agar 7,5 g y agua destilada 500 ml, pH 7,2 - 7,4.

Fase líquida (Solución Locke): Cloruro de sodio 8 g, cloruro de potasio 0,2 g, fosfato ácido de potasio 0,3 g y agua destilada 1 000 ml.

El pH va equilibrado por las sustancias que entran en su composición. Tanto la fase sólida como la fase líquida se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml, los cuales fueron autoclavados a 15 libras de presión y 121 °C de temperatura. El medio autoclavado se conservó herméticamente cerrado a temperatura ambiente.

Para su distribución, la fase sólida fue licuada en baño de agua a 100 °C y luego de enfriarla a 45 °C, se le agregó sangre desfibrinogenada e inactivada de conejo (15%). Luego se distribuyó en matraces más pequeños (10 ml en cada matraz), agregándole posteriormente 2 ml de la fase líquida, la cual contenía 800 UI de penicilina por 100 ml. Los medios preparados se controlaron 48 horas para verificar la ausencia de contaminación. En una cámara aséptica provista de luz UV se procedió a la siembra de los protozoarios *Leishmania braziliensis braziliensis* y *Trypanosoma cruzi* en forma independiente. Luego de 6 días (fase semilogarítmica 1×10^7 promastigotes de *Leishmania*/ml y después de 10 días, 5×10^5 epimastigotes de *Trypanosoma*/ml) se filtraron los sobrenadantes a través de algodón separándose por sucesivas centrifugaciones (3 000 rpm por 10 minutos) hasta obtener el sedimento que contiene los protozoarios. Entonces se tomaron alícuotas de 0,1 ml para completarlas hasta 10 ml con solución Ringer. Luego se procedió a su conteo en una cámara Neubauer usando 0,1 ml.

En los pocillos de una placa para microtitulación se colocaron 20 µl de la enzima purificada en las siguientes concentraciones: 0,8, 0,9, 1, 2, 3, y 4 µg/ml ó 20 µl de veneno crudo en concentraciones de 5, 6, 7, 8, 9, y 10 µg/ml con 100 µl de la solución Ringer conteniendo los protozoarios (1×10^5 /ml en el caso de *Leishmania* ó 5×10^3 /ml para *Trypanosoma*) se completó a un volumen final de 200 µl con el medio de cultivo. Las muestras se incubaron a 25 °C, extrayéndose alícuotas de 20 µl a intervalos de 4 horas para la observación

microscópica y determinar la viabilidad de los protozoarios durante 24 horas. Los controles no contenían enzima y todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

También se hicieron ensayos colocando promastigotes de *Leishmania braziliensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, incubándolos con 20 µl de LAO (1 y 3 µg/ml) y peroxidasa 0,01% (20 µl) en un volumen final de 200 µl para observar el efecto antiprotozoario.

Los resultados obtenidos fueron tabulados empleando el método computarizado de Probits modificado por Castro De la Mata (1996), para establecer la concentración efectiva (CE₅₀), medida que causa el 50% de mortalidad en el tiempo antes indicado.

8.3 Efecto hemolítico.- Se empleó el método de Condrea et al. (1964), para lo cual se obtuvieron 9 ml de sangre venosa humana y se mezcló con 1 ml de citrato de sodio 3,8%. Luego de centrifugar a 3 500 rpm por 5 minutos, el plasma fue retirado y el paquete de glóbulos rojos se resuspendió y lavó 3 veces por centrifugación con 10 ml de cloruro de sodio 0,9% a pH 7,3, descartando en cada oportunidad el sobrenadante. Finalmente los glóbulos rojos se resuspendieron en 10 ml de buffer isotónico (glicina 0,1M, ClNa 0,9% pH 7,3).

La mezcla de reacción contenía 0,8 ml de buffer isotónico, 0,1 ml de glóbulos rojos y 0,1 ml de LAO (0,97 mg/ml) o del veneno crudo de *B. atrox* (5mg/ml) en buffer acetato de amonio 0,05M pH 7,4. Esta mezcla se incubó a 37 °C por 2 horas y la reacción se detuvo con 2 ml de cloruro de sodio 0,9% frío a pH 7,3 conteniendo EDTA 200 mM. Posteriormente se centrifugo a 3 500 rpm por 5 minutos para separar la hemoglobina libre a partir de eritrocitos lisados.

El grado de hemólisis se determinó por la cantidad de hemoglobina liberada y evaluada por espectrofotometro a una longitud de onda de 540 nm y fue expresada como porcentaje total de hemoglobina contenida en 0,1ml de glóbulos rojos empacados y hemolizados totalmente con 5,9 ml de agua destilada.

8.4 Actividad edemática.- Diferentes cantidades de LAO (2.5, 5, 10, 20, 30 y 45 μg) disueltas en 50 μl de solución salina fueron inyectadas en el cojinete de la pata derecha de ratones albinos de 20 g de peso, empleándose para cada dosis grupos de 4 ratones. En el cojinete de la pata izquierda se inyectaron 50 μl de solución salina (control).

Después de 3 horas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a fin de cortar y pesar las patas inyectadas. El edema fue expresado como el porcentaje del incremento del peso de la pata derecha con respecto a la pata izquierda. La dosis edemática mínima (DEM) es definida como la cantidad de toxina que produce un incremento de 30% en el peso (Yamakawa et al., 1976).

8.5 Actividad hemorrágica.- Se ensayó según el método de Kondo (1960), modificado por Lomonte et al. (1996). Para lo cual se inyectó veneno crudo de *B. atrox* o fracción diluída en buffer acetato de amonio 0,05M pH 7,0. La cuantificación del efecto hemorrágico se logró inoculando por vía subcutánea a nivel abdominal, diferentes cantidades del veneno crudo (5, 10 y 15 μg) y de la enzima purificada (2.5, 5 y 10 μg), cada una en un volumen de 0,1 ml en ratones albinos; utilizándose para cada dosis grupos de 4 ratones. Dos horas después, los animales fueron sacrificados y se procedió a examinar las áreas hemorrágicas formadas. En el caso de la prueba positiva se midió el diámetro mayor de cada área y la dosis hemorrágica mínima (DHM) corresponde a la cantidad de muestra que produce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro obtenida al graficar las dosis de las muestras (escala logarítmica) versus el diámetro de las áreas producidas (expresado en mm). La DHM se determinó mediante un análisis de regresión lineal con los datos obtenidos.

RESULTADOS

1. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL pH.- La estabilidad de la enzima se evaluó utilizando buffer acetato de amonio 0,1M a diferentes valores de pH (5 y 6) y buffer Tris HCl 0,1M pH 7, 8 y 9. La actividad de LAO en el veneno de *Bothrops atrox* mantenida a diferentes valores de pH se muestra en la Tabla No. 1. Se observa que la enzima tuvo mayor estabilidad a pH 6,0. En cambio a valores de pH 8 y 9 pierde actividad rápidamente, ya que si comparamos la actividad inicial a pH 8 con respecto a pH 6, sólo se registró un 49% en tanto que a las 96 horas la actividad fue totalmente anulada. Así mismo a pH 9 la pérdida inicial fue mayor, ya que solo se encontró un 16%, mientras que a las 48 horas la actividad fue totalmente abolida.

pH	% de la Actividad de L-Aminoácido Oxidasa		
	0 horas *	48 horas	96 horas
5	80,0	63,6	69,0
6	100,0	103,6	101,8
7	90,9	94,5	85,4
8	49,0	20,0	0,0
9	16,3	0,0	0,0

* Actividad inicial

Tabla 1. Estabilidad de la L-Aminoácido Oxidasa del veneno de *Bothrops atrox* “Jergón” a diferentes tiempos y pH.

2.- PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA.- Al pasar el veneno crudo de *Bothrops atrox* por una columna de Sephadex G-100, se obtuvo un perfil cromatográfico de proteínas, en el que se pueden observar 3 picos de proteína, encontrándose la actividad LAO en el primer pico (Fig. No. 2), lo

que representa un 17% del total de proteína, siendo la enzima purificada 5,7 veces con un rendimiento del 98,5%.

Cuando la fracción que contiene LAO se purificó por una columna de CM-Sephadex C-50, se observó un pico de proteína eluído directamente con el buffer de elución a pH 6,0 y luego se eluyeron pequeños picos al utilizar el buffer de elución conteniendo NaCl 1 M (Fig. No. 3). La actividad LAO estuvo concentrada en el pico de proteína eluído sin cloruro de sodio; representando el 2,17% del total de proteína, con un factor de purificación de 12,14 y un rendimiento del 26,40 % (Tabla No. 2).

	Proteína		AE (Unid/mg)	UTA	Rendimiento (%)	Purificación
	mg	%				
Crudo	67,20	100,00	0,34	22,80	100,0	1,00
Sephadex G-100	11,46	17,05	1,96	22,46	98,5	5,70
CM-Sephadex C-50	1,46	2,17	4,13	6,02	26,4	12,14

AE : Actividad específica

UTA : Unidades totales de actividad

Tabla 2. Purificación de la L-Aminoácido Oxidasa de *Bothrops atrox* “Jergón”

3. EVALUACIÓN DE LA PUREZA Y PESO MOLECULAR.- Los ensayos electroforéticos en PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras, mostraron que la enzima purificada corresponde a una única banda homogénea, la cual varía en su movilidad electroforética en condiciones reductoras y no reductoras. Estos resultados demuestran que LAO es una proteína de alto peso molecular y que esta formada por dos cadenas polipeptídicas iguales con un peso de 63,1 kDa cada una calculado por PAGE-SDS, usando mercaptoetanol y de 57,7 kDa cada una sin el agente reductor (Fig. 4 y 5).

Fig. N° 2. Purificación de la L-aminoácido Oxidasa de *Bothrops atrox* en Sephadex G-100. Las condiciones cromatográficas fueron: tamaño de la columna (49x1.1 cm), flujo de 7,45 ml/h, eluente buffer Acetato de Amonio 0,05M, pH 6. Se colectaron fracciones de 2 ml.

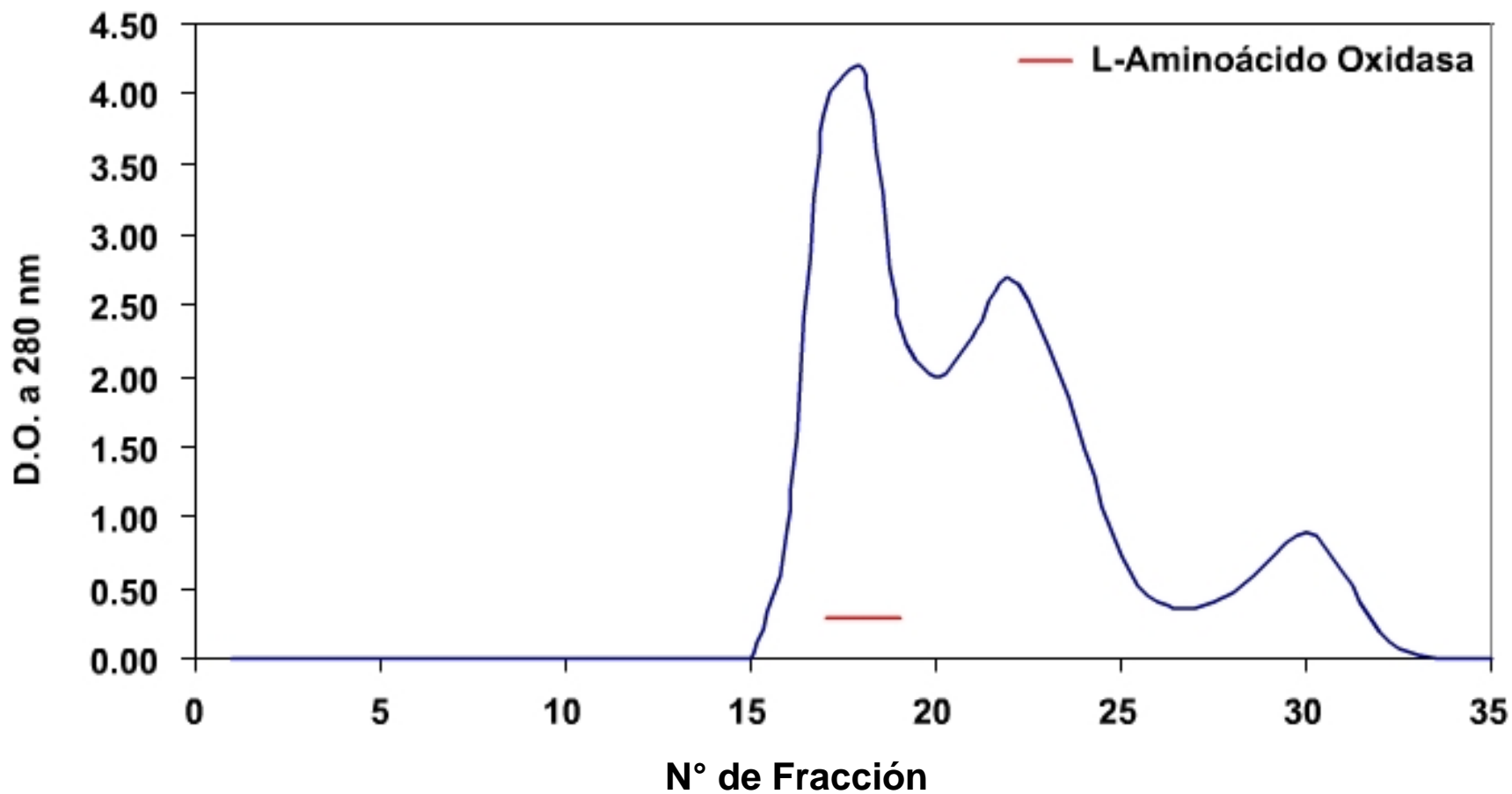
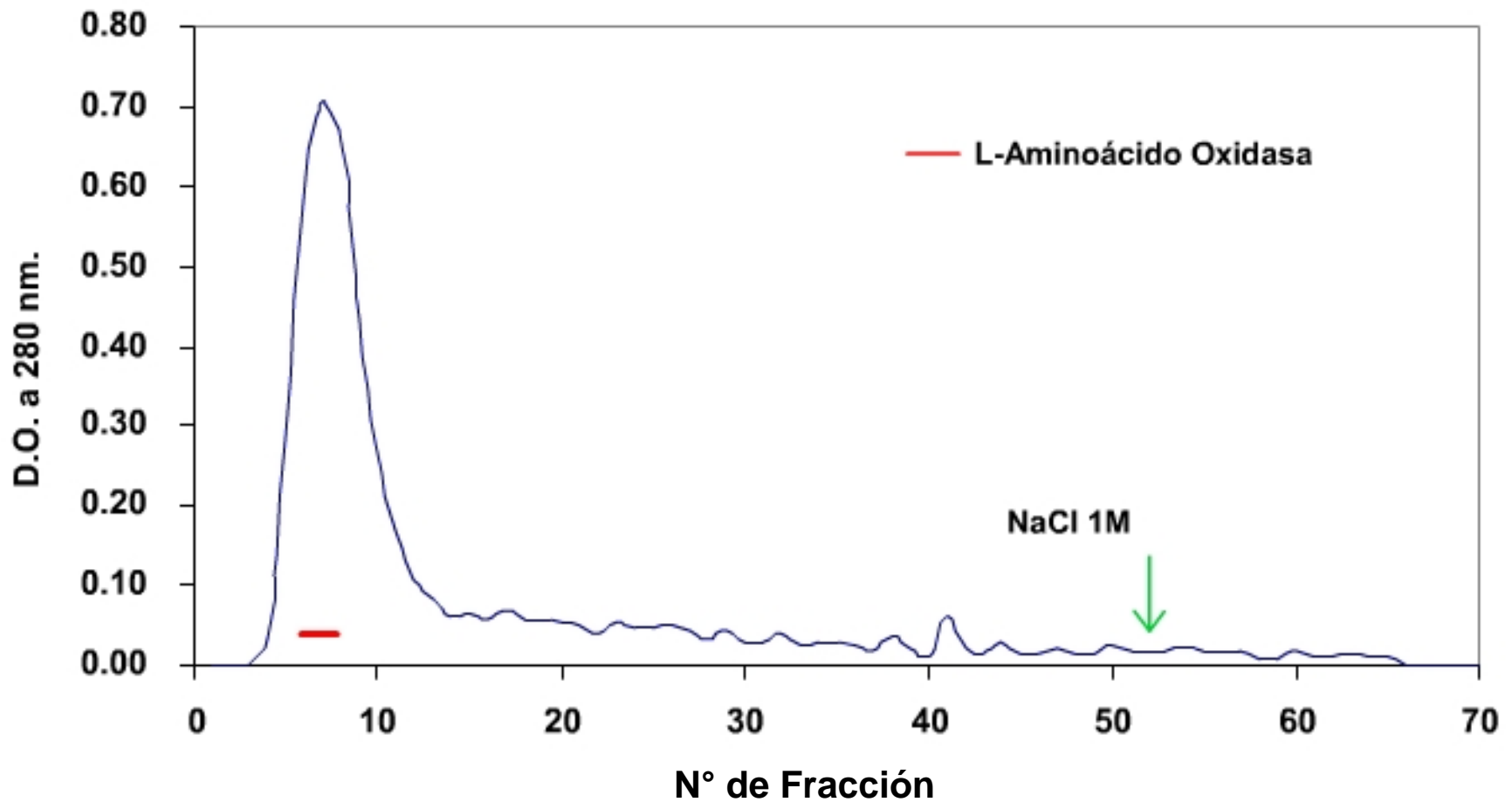
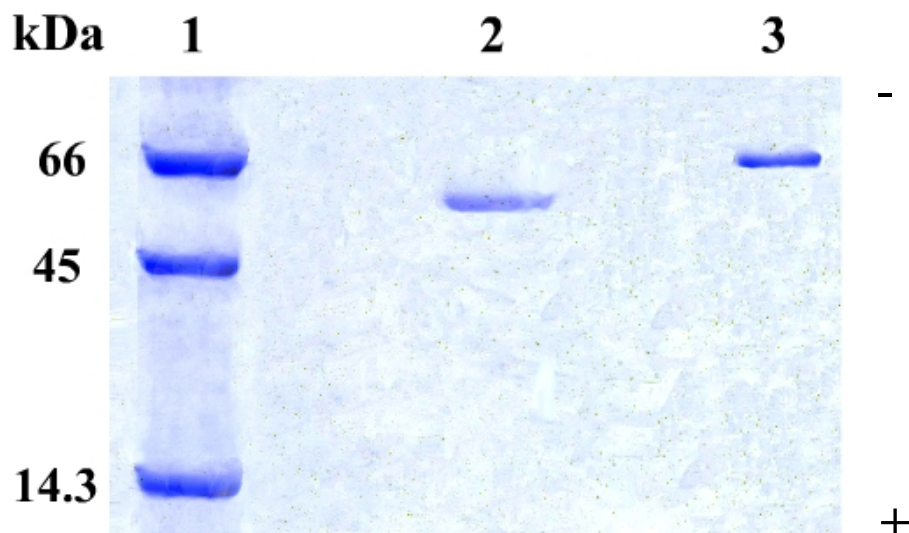


Fig. N° 3. Purificación de la L-aminoácido Oxidasa de *Bothrops atrox* en CM-Sephadex C-50. Las condiciones cromatográficas fueron: tamaño de la columna (23x1.2 cm), flujo de 17 ml/h, eluente buffer Acetato de Amonio 0,05M, pH 6. Se colectaron fracciones de 1 ml.



Adicionalmente al calcular el peso molecular por cromatografía de filtración se obtuvo un valor de 127,8 kDa (Fig. No. 6).

Las pruebas de inmunodifusión e inmunolectroforesis, mostraron una sola línea o arco de precipitación al enfrentar LAO con el antiveneno botrópico, demostrándose la antigenicidad de la enzima. (Fig. No. 7). Así mismo, el veneno crudo en ambos ensayos reveló la presencia de varios componentes antigénicos correspondiente a los arcos de precipitación observados (Fig. No.7).



1. Estándar de pesos moleculares: Albúmina sérica bovina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa) y Lisozima (14,3kDa).
2. Enzima no reducida (57,73 kDa).
3. Enzima reducida (63,12 kDa).

Fig. N° 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la L-Aminoácido Oxidasa de *Bothrops atrox*

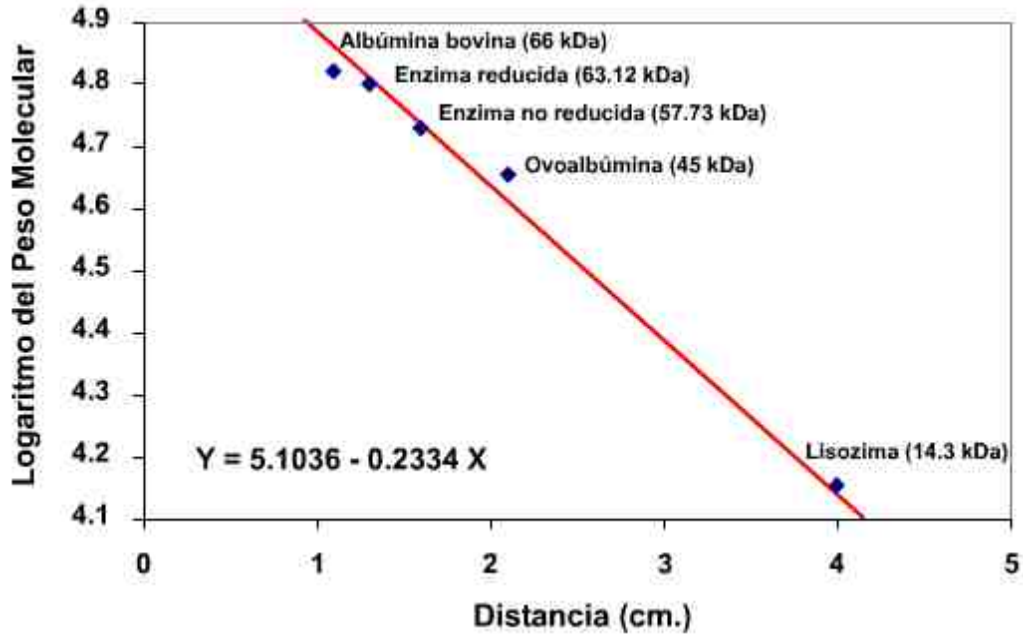


Fig. N° 5. Determinación del peso molecular de la L-Aminoácido Oxidasa por electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-SDS.

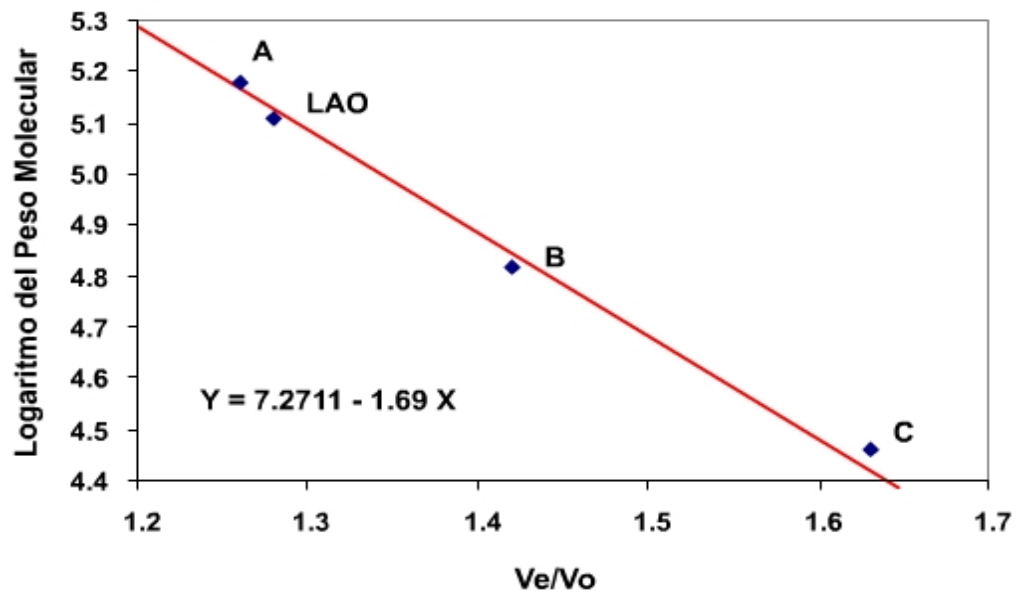


Fig. N° 6. Determinación del peso molecular de la LAO por cromatografía en Sephacryl S-200. El peso de LAO fue de 127,87 kDa calculado por comparación con una curva estándar de alcohol deshidrogenasa de 150 kDa (A), albúmina bovina 66 kDa (B) y anhidrasa carbónica de 29 kDa (C).

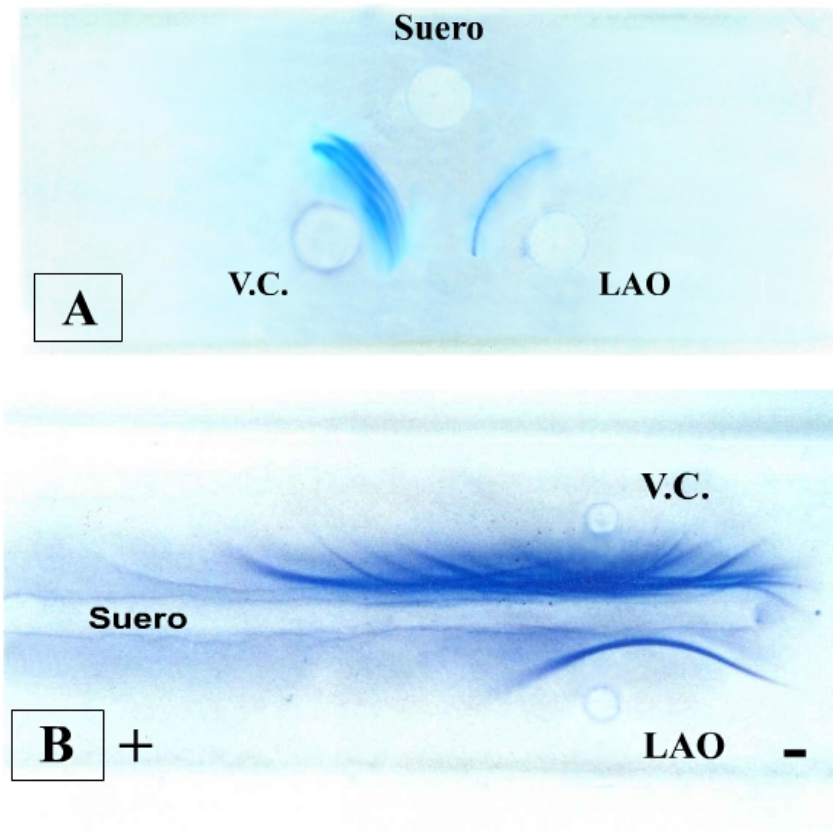


Fig. 7. Inmunodifusión (A) e Inmunonelectroforesis (B) del veneno crudo (VC) y la enzima LAO de *B. atrox*. En ambos casos el veneno crudo formó varias bandas de proteína con el suero antiofídico mientras que LAO originó una sola banda de proteína.

- 4. TERMOESTABILIDAD.-** Como se observa en la Fig. No. 8, la enzima es termoestable hasta los 55 °C, reduciendo su actividad a 54,76% cuando es tratada a temperaturas de 65 °C. Cuando el tratamiento térmico es de 75 °C la actividad se anuló totalmente.

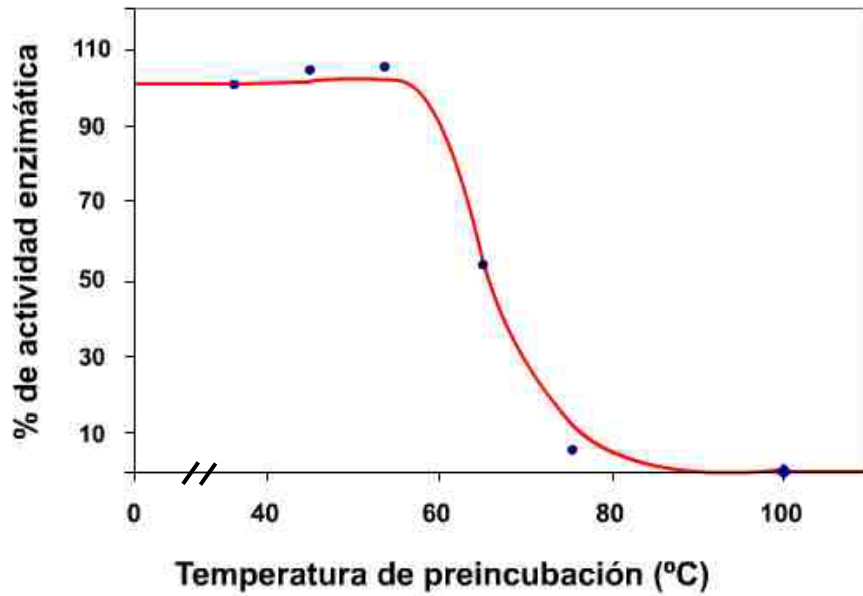


Fig. N° 8. Termostabilidad de la L-Aminoácido Oxidasa a pH 8,3.

5. **pH ÓPTIMO.**- Por el método descrito en el Worthington Enzyme Manual (1993), se demostró la actividad de LAO usando como sustrato L-leucina, un pH óptimo de 8,3 (Fig. No. 9).

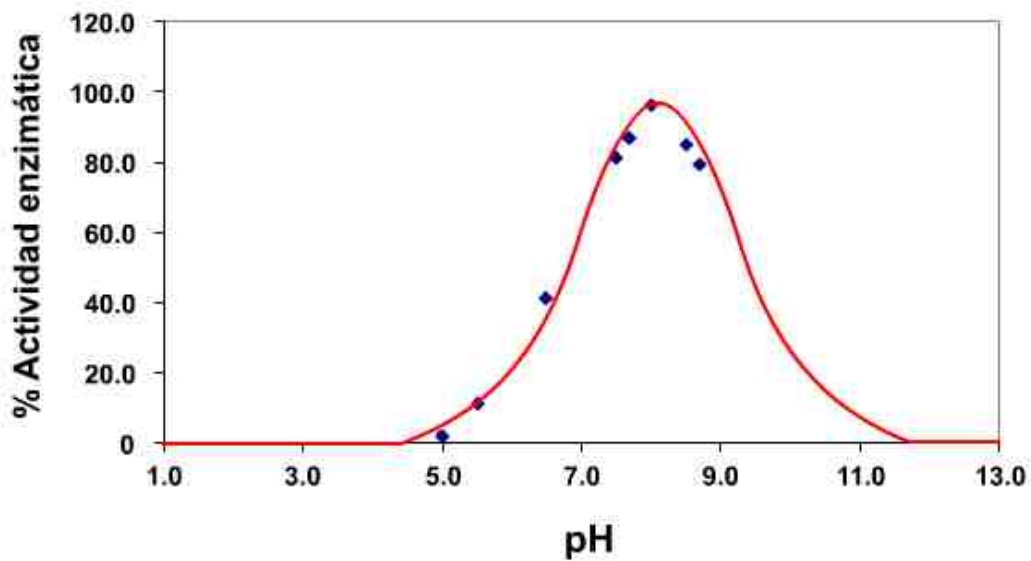


Fig. N° 9. Curva de pH óptimo de LAO para L-Leucina 7,5 mM.

6. EFECTO DE IONES METÁLICOS.- Los ensayos efectuados mostraron que la adición de Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} a concentraciones finales de 0,75, 1,5, 3 y 6 mM no modificaron significativamente la actividad de la enzima, sin embargo el ion Zn^{2+} inhibió a la enzima conforme se incrementaba su concentración, ocasionando una anulación total de la actividad enzimática al usarse en solución 6 mM de Zn^{2+} (Tabla No. 3).

Agente	Concentración (mM)	Actividad enzimática (%)
Control	0.00	100,0
Ca^{2+}	0,75	103,8
	1,50	103,8
	3,00	82,2
	6,00	59,9
Mg^{2+}	0,75	100,0
	1,50	95,6
	3,00	86,9
	6,00	83,9
Mn^{2+}	0,75	102,5
	1,50	99,5
	3,00	95,0
	6,00	90,0
Zn^{2+}	0,75	64,3
	1,50	62,0
	3,00	56,5
	6,00	0,0

Tabla N° 3. Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad de LAO.

7. EFECTO DE ALGUNOS INHIBIDORES ENZIMATICOS.- De los inhibidores enzimáticos ensayados, el glutatión y el β -mercaptoetanol a concentraciones de 2,5 5 y 10 mM respectivamente mostraron un marcado efecto inhibitorio, mientras que iodoacetato y PMSF 5mM tuvieron un ligero efecto en la actividad enzimática (Tabla No.4).

Agente	Concentración (mM)	Actividad enzimatica (%)
Control	0,0	100,0
Glutation	2,5	43,4
	5,0	21,7
	10,0	13,0
PMSF	2,5	95,6
	5,0	91,3
	10,0	84,5
β-Mercaptoetanol	2,5	89,3
	5,0	17,5
	10,0	6,5
EDTA	2,5	112,7
	5,0	106,2
	10,0	102,3
Ácido glutámico	2,5	100,8
	5,0	98,3
	10,0	95,7
Iodo Acetato	2,5	84,7
	5,0	76,4
	10,0	59,3

Tabla N° 4. Acción de algunos inhibidores enzimáticos sobre la actividad de LAO

8. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS.- Inicialmente por el método de Lowry se determinó que el veneno de *B. atrox* contiene un 86,5% de proteína y la LAO de 81,61%. Respecto a la presencia de carbohidratos, para el veneno crudo se encontró 1,73% de hexosas, 0,81% de hexosaminas y 0,21% de ácidos siálicos; es decir un total de 2,75% de carbohidratos asociados. En cambio la enzima purificada registró 14,3% de hexosas, 2,18% de hexosaminas y 0,57% de ácidos siálicos, con un total de 17,05% de carbohidratos, lo que demuestra que se trata de una glicoproteína (Tabla No. 5).

Componente	%	
	Veneno Crudo	L- Aminoácido Oxidasa
Proteína	86,5	81,6
Hexosa	1,7	14,3
Hexosamina	0,8	2,1
Ácidos siálicos	0,2	0,5
Total de carbohidratos asociados	2,7	17,0

Tabla 5. Carbohidratos asociados al veneno y a la LAO de *Bothrops atrox*.

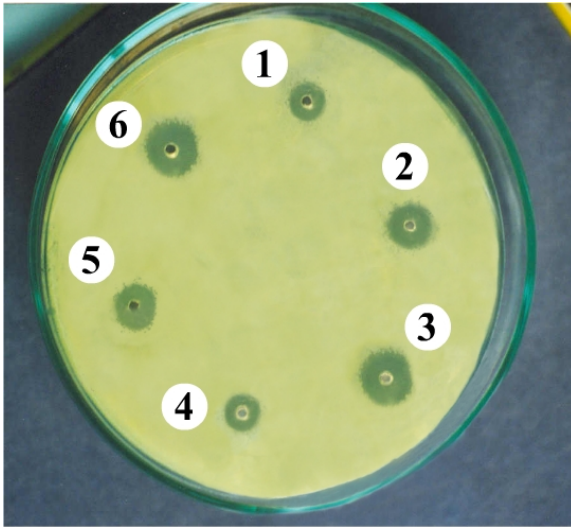
9. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

9.1 Actividad antibacteriana: El efecto antibacteriano del veneno crudo de *B. atrox*, así como de la enzima purificada se visualizó claramente por el método de cilindro en placa. Los resultados se muestran en la Tabla No. 6 y las figuras 10 y 11; observándose halos de inhibición aunque con variaciones en la susceptibilidad de las diferentes especies. Las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p y *Streptococcus faecalis* INS CP 696 y la Gram negativa *Vibrio cholerae* Serotipo Inaba INS fueron más sensibles a la acción del veneno y de la enzima LAO, siendo el diámetro de la zona de inhibición de 20, 13 y 14 mm respectivamente con 50 µg de veneno y de 21, 13 y 19 mm respectivamente con 12 µg de enzima purificada. En cambio *Escherichia coli* ATCC 51A266, bacteria Gram negativa mostró halos de inhibición que indicaban poca sensibilidad al veneno y a la proteína en estudio.

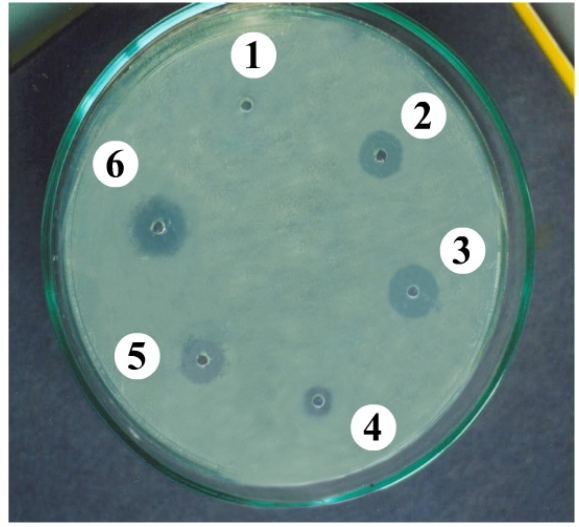
No se observó halos de inhibición de crecimiento bacteriano cuando se incubó 10 µl de LAO (3, 6 y 12 µg) con 10 y 20 µl de peroxidasa 0,01% con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*.

Muestra (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>E. coli</i>
LAO				
3	10	5	9	0
6	12	10	11	0
12	21	13	19	6
V. crudo				
10	10	0	7	0
25	15	12	9	0
50	20	13	14	10

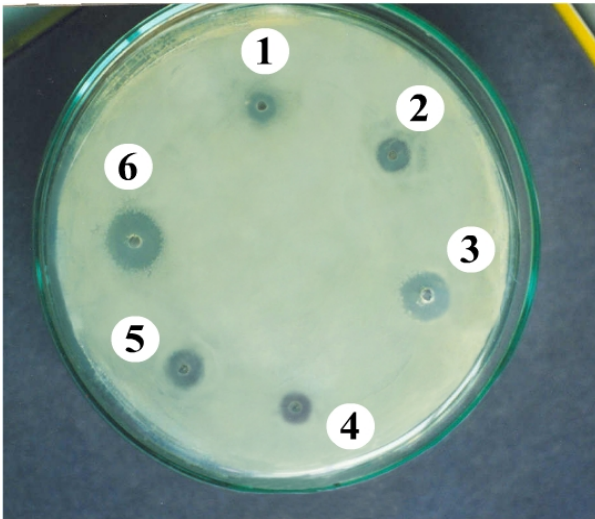
Tabla N° 6. Efecto antibacteriano del veneno crudo y de LAO de *Bothrops atrox* por el método de cilindro en placa.



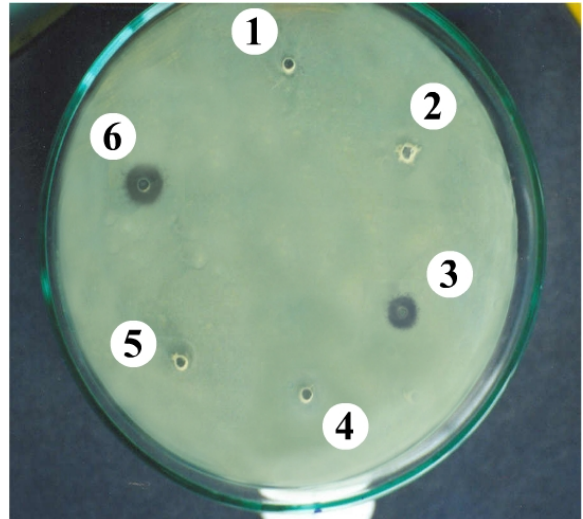
Staphylococcus aureus



Vibrio cholerae



Streptococcus faecalis



Escherichia coli.

Veneno Crudo (μg)

1) 10

2) 25

3) 50

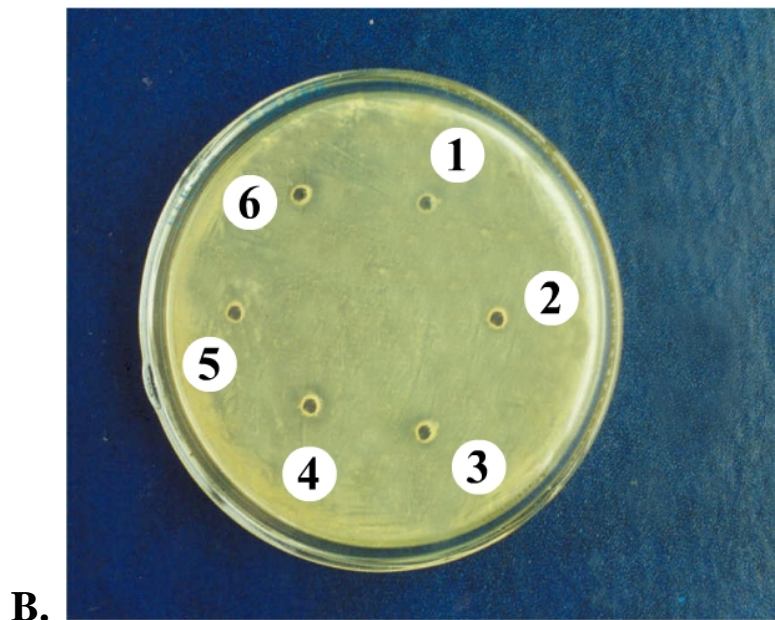
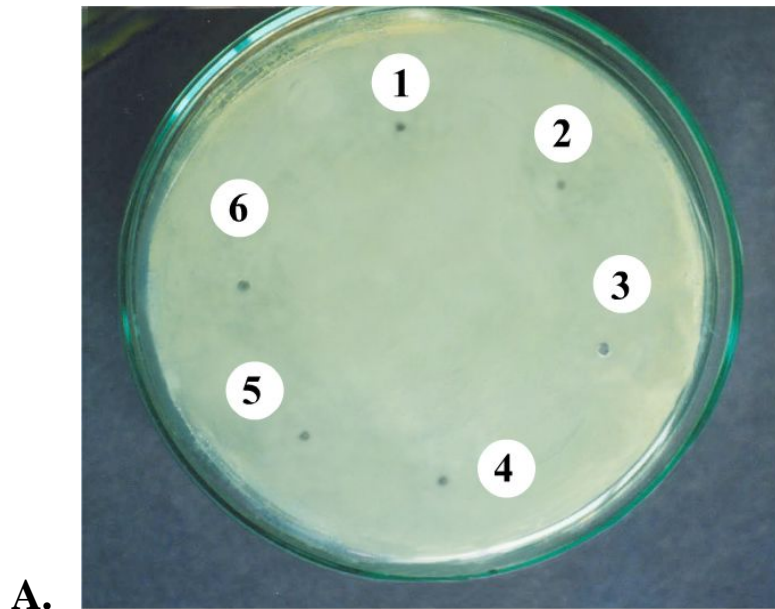
L-aminoácido oxidasa (μg)

4) 3

5) 6

6) 12

Fig. N° 10. Efecto inhibitorio del veneno crudo y de la LAO de *Bothrops atrox* por el método de cilindro en placa.



- 1) 3 μg de LAO + 10 μl de peroxidasa 0,01%
- 2) 3 μg de LAO + 20 μl de peroxidasa 0,01%
- 3) 6 μg de LAO + 10 μl de peroxidasa 0,01%
- 4) 6 μg de LAO + 20 μl de peroxidasa 0,01%
- 5) 12 μg de LAO + 10 μl de peroxidasa 0,01%
- 6) 12 μg de LAO + 20 μl de peroxidasa 0,01%

Fig. N° 11. Efecto de la L-Aminoacido Oxidasa sobre *V. cholerae* (A) y *Staphylococcus aureus* (B) en presencia de peroxidasa de rabanito.

9.2 Efecto Antiprotozoario: Los resultados del efecto *in vitro* del veneno crudo como de la enzima purificada se muestran en la Figura No. 12, encontrándose un CE_{50} para el veneno crudo de 7,82 $\mu\text{g/ml}$ y de 1,33 $\mu\text{g/ml}$ para la enzima purificada contra promastigotes de *L. braziliensis*. Así mismo, la CE_{50} para epimastigotes de *T. cruzi* se esquematizan en la Fig. No. 13, registrándose una CE_{50} 7,95 $\mu\text{g/ml}$ para el veneno crudo y de 1,38 $\mu\text{g/ml}$ para LAO (Tabla No. 7). Promastigotes de *Leishmania braziliensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados con LAO (1 y 3 $\mu\text{g/ml}$) y peroxidasa 0,01% (20 μl) mostraron 100% de supervivencia.

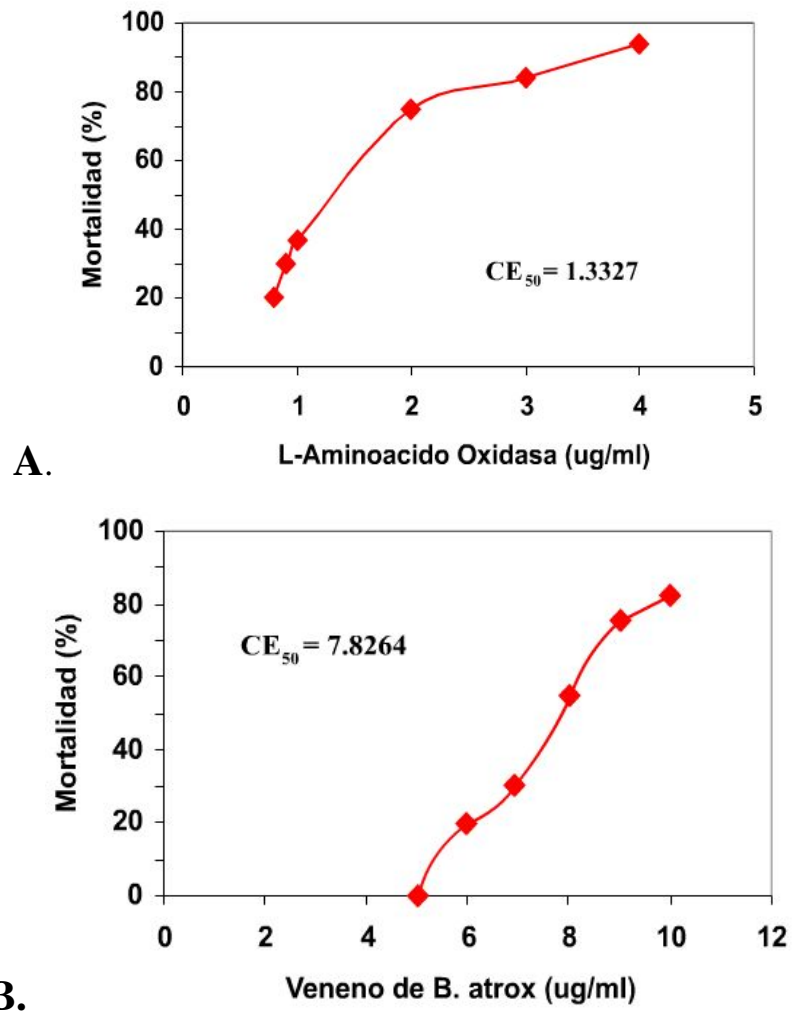


Fig N° 12. Mortalidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* a diferentes concentraciones de LAO (A) y veneno crudo (B) de la serpiente *Bothrops atrox*.

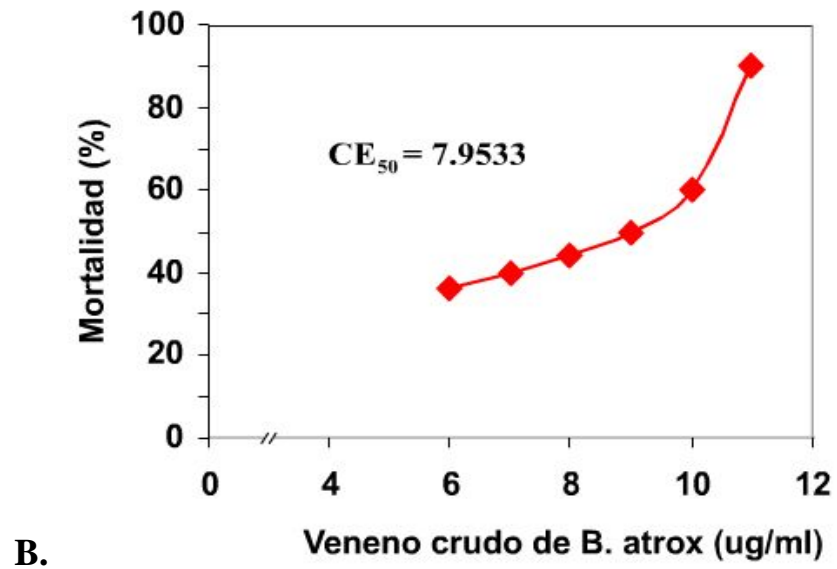
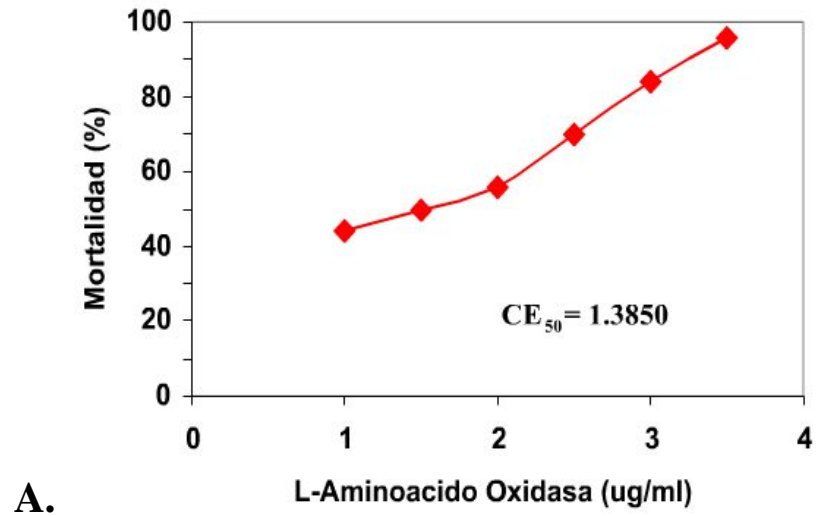


Fig N° 13. Mortalidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a diferentes concentraciones de L-aminoácido oxidasa (A) y veneno crudo (B) de la serpiente *Bothrops atrox*.

Muestra	Veneno crudo		L-aminoácido oxidasa	
	CE ₅₀ (µg/ml)	r	CE ₅₀ (µg/ml)	r
<i>L. braziliensis</i>	7,82 (± 0,0063)	0,9891	1,33 (± 0,018)	0,9461
<i>Trypanosoma cruzi</i>	7,95 (± 0,0052)	0,9058	1,38 (± 0,011)	0,9860

CE₅₀ = Concentración efectiva 50% r = coeficiente correlación lineal

Tabla 7. Concentración efectiva 50% del veneno crudo de *Bothrops atrox* y LAO contra promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* expuestos a 24 horas

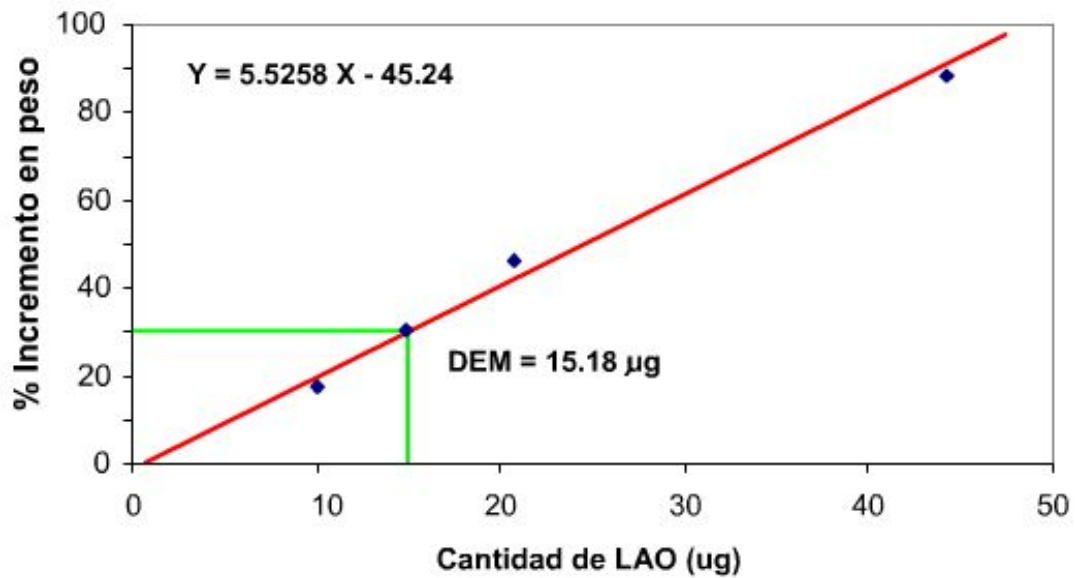
9.3 Actividad hemolítica: El veneno crudo mostró tener actividad, hemolítica, obteniéndose el valor de 1,84 mg de hemoglobina liberada en 0,1 ml de glóbulos rojos pero, la LAO purificada no presentó esta actividad.

9.4 Actividad edemática: La enzima purificada del veneno de *B. atrox* fue capaz de inducir edema en el cojinete plantar de ratones albinos. Los incrementos en peso obtenidos con 5, 10, 15 y 20 µg fueron 10,3, 14,7, 27,6 y 43,13% respectivamente, determinándose una DEM de 15,18 µg de proteína (Fig. No. 14 y 15).



1. Control
2. Actividad de LAO (20 µg)

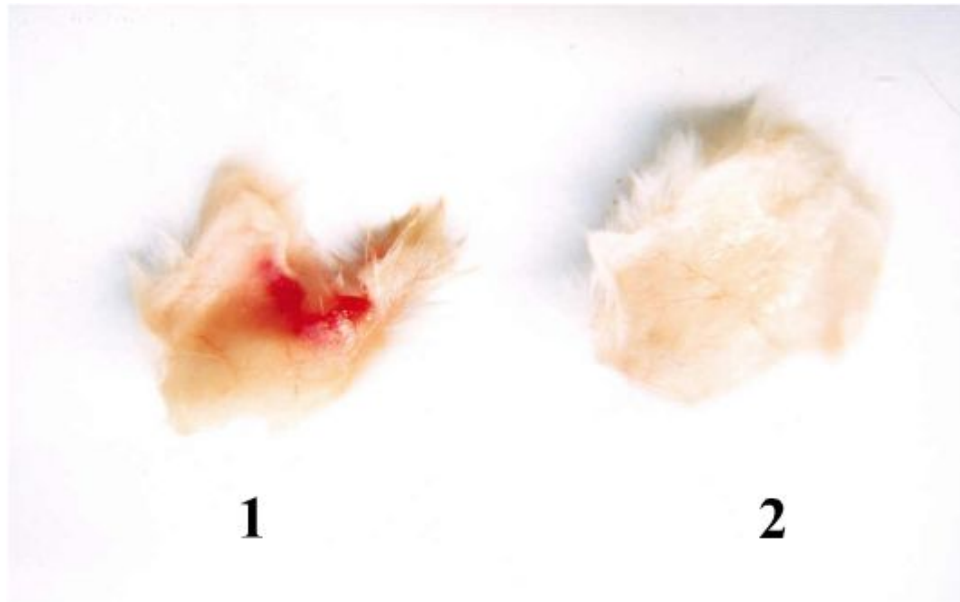
Fig. N° 14. Formación de edema por acción de L-Aminoácido Oxidasa de *Bothrops atrox*.



DEM : Dosis edemática mínima

Fig. N° 15. Efecto edemático de la L-Aminoácido oxidasa.

Actividad hemorrágica: La enzima purificada no presentó actividad hemorrágica aún cuando se utilizaron concentraciones de 2,5, 5 y 10 μg . Sin embargo el veneno crudo si presentó esta actividad la cual no fue cuantificada (Fig. No. 16).



1. Actividad del veneno crudo (10 μg).
2. Actividad de la L-Aminoácido Oxidasa (10 μg).

Fig. N° 16 Actividad hemorrágica del veneno crudo con respecto a la enzima purificada.

DISCUSIÓN

1. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL PH

La necesidad de establecer el buffer y el pH adecuados para el aislamiento de la enzima, motivaron realizar una serie de ensayos, los cuales permitieron demostrar que la actividad de LAO se mantiene en el rango de pH de 5 a 6, mientras que a pH alcalinos, la actividad se pierde rápidamente (Tabla No. 1).

Trabajos previos han reportado que la máxima estabilidad de LAO se encuentra a pH 6 con los venenos de *Bothrops pictus* y *L. muta* (Yarlequé et al., 1997) y al mismo valor con el veneno de *Bothrops brazili* (Solís et al., 1999). Así mismo se registró una rápida pérdida de actividad cuando dichos venenos fueron expuestos a pH alcalino de 8 y 9. Coles et al. (1980) estudiando este fenómeno a 38 °C con la enzima del veneno de *Crotalus adamanteus* hallaron una progresiva inactivación en el rango de 5,5 a 7,5; explicando un equilibrio entre las formas activa e inactiva a pH 6,5. Previamente Wellner (1966) había comparado las formas activa e inactiva de la enzima de *C. adamanteus* por espectrofotometría, dispersión óptica rotatoria y técnicas inmunoquímicas, concluyendo que la inactivación de la enzima a pH 7,5 a 38 °C estaba asociada a cambios conformacionales en su centro activo y en el modo de unión del FAD a la proteína. Los resultados presentados en la Tabla No. 1 indican claramente que LAO de *B. atrox* tiene una máxima estabilidad a pH 6, cuando se le mantiene con buffer acetato de amonio 0,1 M a 20 °C. Esta información fue fundamental para la posterior purificación de la enzima. Aún cuando las enzimas de este tipo en los diferentes venenos pueden presentar variaciones estructurales que a su vez se manifiestan en su actividad, la estabilidad que muestran en un rango de pH tan restringido establece una similitud en su comportamiento frente al medio de reacción, lo que podríamos considerar como una característica de LAO de los venenos viperinos como los de *L. muta*, *B. pictus*, *B. brazili*, *C. Adamanteus*, etc.

2. PURIFICACIÓN DE LA L-AMINOACIDO OXIDASA

Como se indicó previamente la mayoría de los venenos vipéridos son de color amarillo, lo que se debe a la presencia de la riboflavina que a su vez forma parte del grupo prostético (FAD) y éste a su vez permite seguirla con facilidad durante su purificación.

Como se muestra en la figura No. 2, LAO de *B. atrox* fue purificada utilizando una filtración molecular en Sephadex G-100 seguida de un intercambio catiónico en CM-Sephadex C-50 (Fig. No. 3); esta metodología, ha permitido obtener LAO con un grado de purificación equivalente a 12,14 veces con respecto al veneno crudo, un rendimiento de 26,40% y una recuperación de proteína activa de 2,17%. Similares resultados obtuvieron Sánchez y Magalhaes (1991) con el veneno de *Lachesis muta muta* del Brasil, utilizando una columna de Sephadex G-100 y posteriormente un intercambio aniónico en DEAE Celulosa, dando lugar a una purificación de 11 veces y un rendimiento del 40%.

De otros venenos de vipéridos y elápidos se ha obtenido la misma enzima parcial o totalmente purificada: así Singer y Kearney (1950) la purificaron de *Agkistrodon piscivorus*, luego, Suzuki e Iwanaga (1960) de *Agkistrodon halys blomhoffii*, Wellner y Meister (1960) la obtuvieron al estado cristalino del veneno de *Crotalus adamanteus*, Shaham y Bdolah (1973) de *Vipera palestinae*, Kurth y Aurich (1973) de *Vipera ammodytes* y Sugiura et al. (1975) del veneno de *Agkistrodon caliginosus*. Por su parte Tan et al. (1986) obtuvieron la enzima del veneno de *Calloselasma rhodostoma* “Víbora de Malasia” usando DEAE Sephacel a pH 8,7 y luego la purificaron del veneno de *Naja naja sputatrix* “Cobra de Malasia”, empleando un sistema de SP-Sephadex C-25 (Tan y Tan, 1987). Posteriormente la enzima fue purificada del veneno de *Ophiophagus hannah* “Cobra rey”, una serpiente que habita el sudeste de Asia, utilizando primero una columna de intercambio iónico de DEAE Sephacel equilibrada con buffer Tris HCl pH 7,4

0,02M, seguida de una filtración molecular en Sephadex G-75 equilibrada con el mismo buffer (Tan y Saifuddin, 1989).

En el veneno de *Bothrops atrox* al igual que en varios venenos vipéridos, la fracción donde se encuentra LAO aparece en el primer pico de proteína en una columna de filtración molecular. Sin embargo se han reportado venenos ofídicos que contienen más de un tipo de LAO. Stiles et al. (1991) y Tan y Tan (1989) estudiaron el veneno de *Trimeresurus sumatranus sumatranus*, serpiente del sudeste asiático, encontrando dos fracciones de LAO al someter la ponzoña al pasaje por columnas de DEAE Sephacel equilibrada con buffer Tris HCl 0.02M, pH 7, siendo diferenciables además, porque la primera contenía 3346 unidades/mg de proteína y la segunda 2489 unidades/mg de proteína.

Así mismo se ha demostrado que existen enzimas de este tipo de naturaleza ácida, neutra y básica, pero lo que aún no se conoce es que si la diferencia de cargas modifican su acción farmacológica tal como ocurre con otras enzimas ofídicas como las 3 fosfolipasas del veneno de *Agkistrodon halys pallas*, donde la ácida tiene actividad antiplaquetaria, la neutra es neurotóxica y la básica es hemolítica (Du et al., 1998). Siendo LAO de *B. atrox* una proteína ácida, probablemente las propiedades biológicas que describiremos más adelante estén relacionadas, entre otros factores con su densidad de carga.

Solís, et al. (1999) purificó LAO del veneno de *Bothrops brazili*, utilizando la misma metodología señalada en esta investigación, ensayando los dos pasos cromatográficos en ambos sentidos, con los mismos resultados. Este método inicialmente fue empleado por Yarlequé et al. (1997) para purificar la enzima de algunas serpientes peruanas como *Lachesis muta*, *Bothrops pictus* y *Crotalus durissus* y el hecho que por la misma metodología se logre purificar la enzima de los distintos venenos, explicaría una semejanza estructural entre las LAOs de las especies de la Familia Viperidae que habitan en el país.

Como se observa en la figura No. 2, en el paso a través de la columna de exclusión molecular en Sephadex G-100, la mayor actividad enzimática de LAO se

localiza en la primera fracción, indicando que se trata de una proteína de alto peso molecular. De igual forma, en el paso por la columna de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-50 a pH 6, la enzima eluye directamente sin necesidad de la fuerza iónica, lo que nos indica que a este pH, la carga neta de la proteína es negativa, de ello se deduce que su punto isoeléctrico es menor de 6 y por lo tanto se trata de una proteína ácida; esta propiedad es similar a las enzimas de los venenos de *Crotalus adamanteus* (De Kok y Rawitch, 1969); *Lachesis muta muta* (Sánchez, E., 1982); *Bothrops moojeni* (Tempone et al., 2001); *Calloselasma rhodostoma* (Macheroux et al., 2001) e incluso al del elápidio *Ophiophagus hannah* (Li et al., 1994); pero difieren de sus homólogas purificadas de los venenos de las serpientes *Trimeresurus flavoviridis* que posee un punto isoeléctrico de 8,4 (Nakano et al., 1972) y *Naja naja kaouthia* con 8,12 (Sakurai et al., 2001).

La enzima L-aminoácido oxidasa purificada en este estudio fue considerada altamente pura, al obtener en el segundo paso, es decir usando la columna de CM Sephadex C-50, una superposición de los picos de proteína y de actividad LAO; pero además, se demuestra al observar una sola banda proteica por PAGE-SDS y una sola línea de precipitación tanto en la inmunodifusión como en la inmunoelectroforesis (Figuras 4 y 7).

3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA:

3.1 Peso Molecular

El peso molecular de la enzima fue de 127,8 kDa, al usarse una columna de filtración en Sephacryl S-200 y de 63,1 kDa por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras. Esto sugiere que la enzima es un dímero no covalente, constituida por dos sub-unidades, cada una de 63,1 kDa.

El valor obtenido por filtración molecular está dentro del intervalo de valores de pesos moleculares (110-150 kDa) bajo condiciones no reductoras obtenido

para otras L-aminoácido oxidasas de venenos de serpientes (Du y Clemetson, 2002), como se muestra en la Tabla No. 8.

Espece de serpiente	Peso molecular obtenido por cromatografía de filtración en kDa	Peso molecular obtenido por electroforesis en PAGE-SDS en kDa
<i>A. contortrix laticinctus</i>	120	60
<i>Bothrops brazili</i>	126	60
<i>Bothrops moojeni</i>	140	69
<i>Crotalus atrox</i>	100	55
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	132	66
<i>N. naja kaouthia</i>	112	57
<i>Ophiophagus hannah</i>	135	65
<i>Pseudechis australis</i>	142	56
<i>T. mucrosquamatus</i>	140	70

(Du. et. al., 2002)

Tabla 8. Pesos moleculares de L- aminoácido oxidasas obtenidas de venenos de serpientes

En cuanto al análisis de peso molecular por PAGE-SDS, tanto bajo condiciones reductoras y no reductoras, LAO de *B. atrox* mostró una sola banda de proteína pero con diferentes movilidades electroforéticas, observándose mayor movilidad bajo condiciones no reductoras con un valor de 57,7 kDa en lugar de 63,1 kDa bajo condiciones reductoras. Esto sugiere que la enzima poseería en cada subunidad por lo menos un enlace disulfuro intracatenario, el cual al no estar reducido, impediría el despliegue total de las cadenas y por tanto su velocidad en el campo electroforético sería mayor. La presencia de puentes disulfuros ha sido determinada en la enzima purificada de otros venenos, como el de *Crotalus adamanteus* (De Kok y Rawitch, 1969) y en el caso de la enzima de *Ophiophagus hannah*, mediante estudios de carboximetilación (Li et al., 1994), se ha demostrado que por PAGE-SDS en presencia o ausencia de

β -mercaptoetanol aparecía una banda de similar movilidad con un peso molecular de 65 kDa. Sin embargo también se han encontrado enzimas de este tipo con estructuras monoméricas, como la de *Echis macmahoni* (Ali et al., 2000), en la que por espectrofotometría de masa se tuvo un valor de 58,7 kDa en condiciones no reductoras, la de *Trimeresurus flavoviridis* (Takatsuka et al., 2001) y de *Agkistrodon halys blomhoffii* (Abe et al., 1998), que registraron pesos moleculares de 55 y 60 kDa respectivamente.

3.2 Termoestabilidad

En cuanto a la tolerancia al tratamiento térmico, se ha demostrado que la enzima es una proteína termoestable hasta los 55 °C perdiendo rápidamente su actividad a partir de 60 °C como se observa en la figura No. 8. Esto contrasta con lo hallado para LAO de *A. piscivorus* en la que el grado de inactivación se incrementa en el rango de 25 a 45 °C (Singer y Kearney, 1950). Por otro lado LAO de *B. atrox* al ser calentada a 60 °C por una hora, disminuye su actividad en un 50%, comportamiento muy similar a la proteína de *B. brazili* (Solís et al., 1999), más no a la de *C. adamanteus* que pierde toda su actividad a 60 °C por 30 minutos (De Kok y Rawitch, 1969). Esto último puede ser atribuido a la presencia de por lo menos un puente disulfuro, señalado previamente al analizar los experimentos electroforéticos y también a un alto porcentaje de carbohidratos encontrados en la enzima.

El hecho de que LAO de *B. atrox* no pierda actividad hasta los 55 °C, pese a ser un dímero no covalente podría deberse además de lo mencionado anteriormente, a que la unión de las subunidades sea fundamentalmente hidrofóbica al interactuar los grupos no polares de los aminoácidos, de modo que al aumentar la temperatura estas uniones se hacen más intensas, a diferencia de lo que ocurre con los enlaces iónicos y de hidrógeno que a temperaturas entre 40 y 50 °C comienzan a romperse (Wodd et al., 1974).

Pasados los 55 °C la actividad enzimática decrece rápidamente hasta los 75 °C, debido probablemente a cambios conformacionales que alteran el sitio activo de la enzima, la unión de las subunidades y la interacción de la proteína con su grupo prostético FAD (Wellner, 1966).

3.3 pH óptimo

Por otro lado, los ensayos para establecer el pH óptimo de LAO de *B. atrox*, permitieron demostrar que la máxima actividad se registraba a pH de 8,3 usando L- leucina como sustrato, en tanto que en el rango de pH 7,5 a 8,7 se encontró no menos del 80% de la actividad máxima (Figura No. 9). Estos valores tienen semejanza a los reportados para las LAOs obtenidas de *Agkistrodon caliginosus* en el rango de pH de 8,0-8,5 (Sugiura et al., 1975); *Crotalus adamanteus* 7,5 (Wellner y Meister, 1960); *Lachesis muta* 7,5 (Cisneros, 1996) y *Bothrops brazili* 8,5 (Solís et al., 1999). Se ha descrito que el pH óptimo varía dependiendo del aminoácido usado como sustrato (Page y Van Etten, 1971); por ejemplo la oxidación de L- leucina es 7,5 para LAO de *C. adamanteus*, pero la enzima no oxida L- lisina y ornitina a pH 7,5, sino a pH 9,4.

Paik y Kim (1965) estudiaron ampliamente la relación existente entre pH-sustrato con el veneno de *C. adamanteus* y encontraron que la enzima exhibía diferentes curvas de pH, dependiendo del aminoácido usado como sustrato; esto concuerda con lo encontrado por Solís et al. (1999), quienes registraron curvas diferentes de pH trabajando con la enzima aislada de *B. brazili* usando como sustratos, L- leucina, L-metionina, L-fenilalanina, y L-arginina el pH óptimo fue 8,5; mientras que con L-iso-leucina fue 8,0 con L-triptofano fue 7,5 y usando L-lisina el valor fue 9.

La curva de pH obtenida usando L-leucina como sustrato es la resultante del comportamiento ácido base de la proteína frente al aminoácido, ya que en el pH óptimo, tanto la enzima como el sustrato exhiben un equilibrio iónico en

particular, que permite que exista la mayor probabilidad de que el sustrato encaje y sea mantenido firmemente en el centro activo de manera que este orientado correctamente respecto a los grupos catalíticos de la enzima para que tenga lugar la reacción. En la mayoría de las enzimas, la curva de pH es acampanada, debido a que existen por lo menos dos grupos funcionales que se disocian en su sitio activo, para posibilitar su interacción con la molécula de sustrato.

En el perfil obtenido de pH-actividad (Figura No. 9), se observó un 50% de actividad en la parte ascendente de la curva a pH 7 y en la parte descendente a pH 9. El grupo imidazol de la histidina ($pK_a = 6$), el grupo sulfhidrilo de la cisteína ($pK_a = 8,33$) y el grupo p-hidroxilo de la tirosina ($pK_a = 10,07$), parecerían ser necesarios para la actividad enzimática, ya que podrían explicar la parte ascendente y descendente de la curva tal como lo describe Fersht et al. (1980).

Tan y Swaminathan (1992) al investigar las propiedades de la LAO en el veneno de *Naja naja kaouthia* encontraron que la enzima fue muy activa con la L- fenilalanina y L-tirosina y moderadamente activa sobre la L- leucina. L- metionina y L-triptofano, cuando ésta presenta un pH óptimo de 8,5. De acuerdo a Ueda et al. (1988), la LAO del veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* oxida L-metionina rápidamente a pH 7,5, en contraste la enzima del veneno de *L. muta* no la oxida tan fácilmente (Cisneros, 1996).

En los venenos de serpientes, la especificidad del sustrato para esta enzima varía de una especie a otra (Zeller y Maritz, 1944), por lo tanto tenemos que considerar que el valor de pH para la reacción enzimática, determina la mayor o menor eficiencia del sustrato.

3.4 Efecto de iones metálicos

De acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla No. 3, se observa que los iones divalentes calcio, manganeso y magnesio no alteran la actividad

enzimática de LAO, lo que indicaría que la enzima no los requiere salvo el caso del ion zinc que ejerce efecto inhibitorio. A diferencia de la LAO de *C. adamanteus* que requiere de Mg^{2+} (Paik y Kim 1965), LAO de *B. atrox* no es afectada por este ion, ni registra inhibición por Ca^{2+} . Estos datos tienen similitud a los hallados con las enzimas de *L. muta* y *B. brazili* (Cisneros, 1996; Solís et al., 1999) que mostraron ser inhibidas por Zn^{2+} .

En cuanto a los iones Zn^{2+} a diferencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} en solución tienden a formar más fácilmente iones complejos con iones negativos u otras moléculas pequeñas llamadas ligandos; estos tienen como característica común tener un par de electrones no compartidos que pueden donar al ion metálico (Bender y Brubacher, 1977). Así pues, para mencionar solo dos posibilidades, las proteínas a través de los átomos de nitrógeno del grupo imidazol de un residuo de histidina o a través del grupo sulfhidrilo de la cisteína podrían unirse a este ion metálico.

La acción inhibitoria del ion metálico podría deberse a su capacidad de inducir un cambio conformacional en la proteína de manera que reduzca su actividad enzimática, o la de unirse a un residuo esencial del centro activo de la enzima, de modo reversible (Bender y Brubacher, 1977).

3.5 Efecto de algunos inhibidores enzimáticos

El uso de agentes químicos capaces de modificar diferentes tipos de grupos funcionales presentes en las enzimas, es un método útil para establecer si tales grupos son necesarios para la actividad catalítica.

El PMSF, agente que fosforila el grupo hidroxilo del aminoácido serina presente en el sitio activo de ciertas enzimas, no mostró un marcado efecto inhibitorio sobre LAO de *B. atrox*, de lo que se deduce que este aminoácido no está presente, o de estarlo, el mismo no se encuentra implicado en la actividad catalítica de la enzima purificada. Por tanto la proteína aislada no es una serino-enzima Tabla No. 4.

Del mismo modo, LAO de *B. atrox* no fue afectada por EDTA, agente quelante que liga cationes divalentes, por lo que se asume que LAO no precisa de iones metálicos divalentes para su actividad y estos resultados concuerdan con los hallados por Ueda et al. (1988) al demostrarse que el EDTA no inhibe la LAO de *Trimeresurus mucrosquamatus*.

En contraste el β -mercaptoetanol agente reductor capaz de escindir enlaces disulfuros, mostró un marcado efecto inhibitorio sobre la enzima purificada, lo que es una clara evidencia que los enlaces disulfuros intracatenarios, demostrados por PAGE-SDS, son esenciales para mantener la actividad de la enzima.

Así mismo el iodoacetato, agente alquilante que reacciona con los grupos sulfhidrilos de los restos de cisteína, presentes en el centro activo de ciertas enzimas formando los derivados S-carboximetilados, mostró un efecto inhibitorio parcial sobre la enzima purificada a medida que se aumenta su concentración (Tabla No.4), lo que indicaría la presencia de un residuo de cisteína de menor importancia en el centro activo. Resultados semejantes se obtuvieron con las enzimas purificadas de *Lachesis muta* (Cisneros, 1996), *Bothrops brazili* (Solís et al., 1999) y *Vipera aspis* (Zeller, 1948), en el último caso, el autor señala al iodoacetato como un inhibidor competitivo.

Por otro lado la acción del glutatión, tripéptido que se encuentra en todas las formas de vida y se requiere para la actividad de varias enzimas; produce sobre LAO de *B. atrox* un marcado efecto inhibitorio en los valores de actividad específica de la enzima. El efecto del glutatión se debería a la reducción de la flavina, (Mannervick et al., 1980) indicándonos que el FAD esta directamente envuelto en el mecanismo catalítico de la acción enzimática. Sin embargo, no se puede descartar que adicionalmente el glutatión cause la escisión de enlaces disulfuros presentes en la enzima purificada, debido a que el agente

posee un grupo sulfhidrilo (Barker, 1975). Resultados similares se encontraron en las enzimas aisladas de *L. muta* y *B. brazili*. Por su parte el ácido glutámico no mostró una acción significativa a las diferentes concentraciones empleadas, lo que refuerza la posibilidad de que cisteína y no ácido glutámico sea determinante en la acción inhibitoria analizada para el caso de glutatión.

3.6 Naturaleza glicoproteica

Uno de los detalles más interesantes que se abarcó en esta investigación, fue la asociación de carbohidratos a la estructura proteica de LAO. En primer lugar, usando el método de Lowry et al. (1951), se determinó que el veneno de *Bothrops atrox* contiene 86,5% de proteína y 2,75% de carbohidratos asociados. En cambio, la enzima purificada mostró ser una glicoproteína (81,6% de proteína), conteniendo 14,3% de hexosas, 2,18% de hexosaminas y 0,57% de ácidos siálicos, (Tabla No. 5). Otros valores en contenido proteico encontrados para las especies del género *Bothrops* fueron muy similares al veneno de *B. atrox*: *B. brazili* 92,04%, *B. barnetti* 87,9% y *B. pictus* 69,29% (Solís et al., 1999; Oshima e Iwanaga, 1969 y Cárdenas et al., 1995). Así mismo, respecto al contenido de carbohidratos el valor de 2,75% obtenido para el veneno de *B. atrox* es muy semejante al de *B. brazili* 2,64%, *B. jararaca* 3,6% y *C. adamanteus*. 2 a 5% (Solís et al. 1999, Oshima e Iwanaga, 1969 y De Kok y Veeger, 1968). El contenido de carbohidratos asociados a LAO de *B. atrox* de 17,05%, es cercano a 23,4% hallado en *O. Hannah* y 18,84% en *B. brazili*, pero difiere del 5,4% encontrado en *C. adamanteus*. Un posible rol de los oligosacáridos en las glicoproteínas es el modular sus propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad, viscosidad, estabilidad de carga. Respecto a éste último punto al tratar L-aminoácido oxidasa de *C. adamanteus* con neuraminidasa y proceder a la electroforesis en condiciones no desnaturizantes, se observó una disminución de su movilidad electroforética (De Kok y Rawitch, 1969). Otro rol probable de los carbohidratos sería

proteger a la enzima de la proteólisis, teniendo en cuenta el entorno fuertemente proteolítico del veneno (Dos Santos et al., 1993).

3.7 Antigenicidad

Los venenos ofídicos en general, son compuestos fuertemente antigénicos debido a su elevado contenido proteico ya que, la mayoría de estas proteínas tienen pesos moleculares mayores a 20 kDa. En este caso se demostró mediante ensayos de inmunodifusión e inmunoelectroforesis (Figura No. 7), la antigenicidad de LAO del veneno de *B. atrox* frente al suero antibotrópico polivalente. Dicha propiedad también ha sido demostrada para LAO de otros venenos tales como *C. adamanteus* (De Kok y Rawitch, 1969), *L. muta* (Sánchez, 1982), *O. hannah* (Tan et al., 1993), *C. rhodostoma* (Tan y Ponnudurai, 1994) y *B. brazili* (Solís et al., 1999).

Las características demostradas para la enzima purificada a las que puede deber su antigenicidad son: su alto peso molecular de 127,8 kDa, ya que aumenta la probabilidad de expresar mayor cantidad de determinantes antigénicos y a su naturaleza glicoproteica, ya que una mayor complejidad de la molécula contribuye a su antigenicidad.

Anticuerpos presentes en el suero antibotrópico polivalente obtenido de caballos inmunizados contra venenos de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. brazili*, *B. hyoprora* y *B. barnetti*, exhibieron una fuerte reacción antígeno-anticuerpo con la enzima purificada del veneno de *B. atrox*, demostrándose la presencia de determinantes antigénicos similares en las LAO de estos venenos. Dicha reactividad cruzada ha sido también demostrada por ELISA indirecto, de varios venenos crotálicos y elápidos con anticuerpos preparados contra las LAO de *O. hannah* y *C. rhodostoma* (Tan et al., 1993; Tan y Ponnudurai, 1994)

4. ACCION BIOLÓGICA

4.1 Efecto antibacteriano

Tanto el veneno crudo como la enzima purificada del veneno de *B. atrox* mostraron efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Dicho efecto fue más evidente con bacterias Gram positivas que con Gram negativas (Tabla No. 6 y Figura No. 10)

Adicionalmente medimos la actividad LAO de la enzima en los cultivos bacterianos en presencia de peroxidasa, observando que la actividad antibacteriana se inhibía (Figura No. 11); Esto podría ser atribuido al hecho de que la peroxidasa actuaría sobre el peróxido de hidrógeno descomponiéndolo en agua y oxígeno.

El efecto antibacteriano sobre *S. faecalis* se entiende por ser esta bacteria catalasa negativa; en cambio el efecto sobre *S. aureus* pese a ser catalasa positiva, se puede deber a que esta bacteria no produce suficiente cantidad de catalasa durante su crecimiento para contrarrestar la producción de peróxido de hidrógeno formado por LAO y por lo tanto actuaría como un agente bactericida puesto que sería fuertemente oxidante, ya que en altas concentraciones causaría inestabilidad a nivel de la membrana celular.

Stiles et al. (1991), reportaron que varios venenos de serpientes tienen efecto antibacteriano contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. De acuerdo con sus estudios los venenos más activos fueron los de cobras asiáticas y africanas (*Naja sp.*), de elápidos australianos como *Notechis scutatus scutatus* y *Pseudechis australis* así como cascabeles norteamericanas del género *Crotalus*. Hay un solo reporte aislado de elápidos con propiedades antibacteriales asociadas con el factor lítico directo de 7 000 daltons de peso molecular del veneno de *Hemachatus haemachatus* (Aloof-Hirsch et al. 1968). Stiles et al. (1991), también reportaron que a través de ensayos cromatograficos relacionados a actividad antibacteriana de *N. naja atra*, *N.*

nigricollis, *N. haje haje* y *P. australis* que solo se registra este efecto en venenos amarillos y las fracciones de alto peso molecular (mayores a 100 kDa) concluyendo que este efecto en los venenos de elápidos examinados es debido a la enzima LAO (~140 kDa) y no al factor lítico directo.

A la fecha no se conoce con precisión el mecanismo de acción de la enzima LAO implicada en la inhibición bacteriana, pero se sabe que unida al FAD este grupo prostético es reducido al reaccionar con los diferentes L-aminoácidos que se encuentran en el medio y que posteriormente la enzima se reoxida para formar peróxido de hidrógeno. Por todo ello al peróxido de hidrógeno se le atribuye la acción antibacteriana, debido a su capacidad oxidante que lesiona membranas, proteínas y causa escisiones en los ácidos nucleicos. Además el peróxido de hidrógeno inactiva a las células oxidando grupos sulfidrilos libres. Muchas de las enzimas celulares poseen grupos –SH y únicamente pueden funcionar si estos permanecen libres y reducidos. De allí que agentes oxidantes que se combinan con los grupos –SH como el peróxido de hidrógeno son fuertemente inhibidores.

Por su parte Wei Ji-Fu et al., 2002 reportaron que la LAO de *T. mucrosquamatus* inhibía el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus dysenteriae*, este efecto lo eliminó con catalasa sugiriendo que el peróxido de hidrógeno estaba involucrado en el efecto antibacteriano, tal como se observa para LAO de *B. atrox*. La evidencia de que otras enzimas como la glucosa oxidasa y la xantina oxidasa generen peróxido de hidrógeno durante la oxidación aeróbica de sus substratos, ha permitido también demostrar la relación entre la presencia de peróxido de hidrógeno y la inhibición en el crecimiento bacteriano (Green y Pauli, 1943). Así mismo es interesante aclarar el caso de la D-aminoácido oxidasa, la cual cataliza la desaminación oxidativa de los D-aminoácidos generando también peróxido de hidrógeno pero en cantidades subletales, debido a un fenómeno de polimerización a nivel de los α -cetoácidos que ocurrirían durante la reacción enzimática (Skarnes, 1970).

Los resultados de esta investigación los podemos comparar con los datos reportados por Stiles et al., 1991, ya que al utilizar 6,25 µg de la enzima de *C. adamanteus* produjo un halo de inhibición de 10 mm sobre *S. aureus* mientras que, en el caso de LAO de *B. atrox* se utilizó 6 µg para producir un halo de 12 mm. De acuerdo al Manual Difco (1984) 30 µg de tetraciclina producen halos de inhibición mayores o iguales a 19 mm sobre bacterias Gram positivas o negativas y se considera que el microorganismo es sensible a la droga. En cambio con la enzima purificada de *B. atrox* se encontró que con 12 µg sobre *S. aureus* y *V. cholerae*, se produjeron halos de inhibición de 21 y 19 mm respectivamente.

Así mismo los presentes resultados obtenidos, son similares a los reportados por Yarlequé et al. (1997), para el veneno crudo y LAO de *L. muta* y *B. pictus* sobre *S. aureus* y *V. cholerae*. Mientras que para *E. coli* los valores solo son similares a las concentraciones de 50 µg para el veneno crudo y 12 µg para la enzima purificada. Igual similitud se presenta con el veneno y la enzima purificada de *B. brazili* (Solís et al., 1999). En cambio una diferencia importante de señalar es que el veneno de *B. atrox* tiene un mayor efecto antibacteriano sobre *S. faecalis*, mientras que en los otros venenos de serpientes peruanas se registró menor actividad.

De acuerdo con todo lo señalado, existen venenos de diferentes especies de serpientes que habitan en diversas regiones del mundo, los cuales contienen LAO, tal como se muestra en la Tabla No. 9. Así tenemos que los venenos de cinco especies de cobras africanas y asiáticas del género *Naja* muestran un fuerte efecto contra *Aeromonas hydrophila* 7965. En tanto que las ponzoñas de especies marinas, como *Enhydrina schistosa*, *Hydrophis cyanocinctus* y *Laticauda sp.*, así como la serpiente "coral" *Micrurus fulvius fulvius* carecen de esta actividad. Excepciones notables fueron los venenos de una cobra asiática (*Naja naja oxiana*) y una cobra africana (*Naja melanoleuca*) en las que no se encontró actividad antibacteriana. También podemos observar en la Tabla No.

9 que los venenos de los elápidos australianos *Notechis scutatus scutatus* y *Pseudechis australis* mostraron potente actividad antibacteriana.

Veneno	Pa	Sa	Ec	Ah	Bs
ELAPIDAE					
<i>Enhydrina schistosa</i>	0	0	0	0	0
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	0	0	0	0	0
<i>Laticauda laticaudata</i>	0	0	0	0	0
<i>Micrurus fulvius</i>	0	1	0	0	1
<i>Naja haje haje</i>	0	4	0	7	3
<i>Naja naja atra</i>	0	3	0	6	1
<i>Naja melanoleuca</i>	0	0	0	0	0
<i>Naja mossambica</i>	0	3	0	5	2
<i>Naja nigricollis</i>	0	5	0	6	1
<i>Naja nivea</i>	0	2	0	6	1
<i>Naja naja oxiana</i>	0	0	0	0	1
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	1	7	0	10	3
<i>Pseudechis australis</i>	0	7	1	11	5
VIPERIDAE					
<i>Crotalus adamanteus</i>	2	8	1	12	5
<i>Crotalus atrox</i>	3	8	1	11	3
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0	0	0	0	1
<i>C. scutulatus scutulatus</i>	2	9	1	11	5
<i>Echis carinatus</i>	4	8	1	12	5

Pa = *Pseudomonas aeruginosa*, Sa = *Staphylococcus aureus*,
 Ec = *Escherichia coli*, Ah = *Aeromonas hydrophila*, Bs = *Bacillus subtilis*

Tabla 9. Efecto antibacteriano de diferentes venenos de serpientes por el método de difusión en disco.

La presencia de color amarillo en el veneno, lo que está en relación con la actividad de LAO se demuestra claramente en dos hechos: por un lado, la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* a diferencia de sus congéneres tiene un veneno incoloro y siendo su acción fuertemente neurotóxica carece de actividad antibacteriana. Por otro lado los estudios de Kornalik y Master (1964), han demostrado que el veneno de color amarillo obtenido de algunos especímenes de *Vipera ammodytes* contiene por lo menos 200 veces más LAO que aquellos de color blanco extraídos de otros ejemplares. Por último dos venenos ligeramente amarillos como los de *Naja melanoleuca* y *Naja naja oxiana* fueron negativos mientras que, cinco venenos marcadamente amarillos de otras especies del género *Naja* fueron positivos en cuanto a la acción antibacteriana.

Adicionalmente es necesario resaltar que en este estudio, de las bacterias utilizadas *S. aureus* fue la más sensible lo que se debería a que a pesar de producir catalasa, la concentración de esta enzima no es suficiente para contrarrestar la actividad bactericida producida por el peróxido de hidrógeno a consecuencia de la actividad de LAO.

4.2 Efecto antiprotozoario

Otro aspecto de nuestra investigación se ha referido a la acción antiprotozoaria.

Tal como se ha referido en el presente estudio el veneno de *Bothrops atrox* y la enzima mostraron tener actividad anti-leishmánica. La CE_{50} de la enzima purificada contra promastigotes de *L. braziliensis braziliensis* fue de 1,33 $\mu\text{g/ml}$, siendo su actividad seis veces más alta que para el veneno crudo y de 1.38 $\mu\text{g/ml}$ contra epimastigotes de *T. cruzi*, cuya actividad es de 4,8 veces más alta que el veneno total (Tabla No. 7 y Fig. No. 12 y 13). Los datos aquí presentados tienen especial relevancia pues serían la base para establecer

métodos alternativos para enfrentar enfermedades parasitarias de nuestro país.

La enfermedad de Chagas causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* se estima que afecta a millones de personas en Centro y Sur América (Moncayo, 1993) y el tratamiento de pacientes está basado en drogas como nifurtimox y benznidazole que exhiben efectos tóxicos en humanos y solo una pequeña parte de pacientes crónicos son curados por éstas (Morello, 1988). En áreas endémicas la transmisión por transfusión de sangre aumenta día a día (Pinto y Brener, 1984), siendo la única manera de anular este efecto el uso de violeta genciana, la que sin embargo colorea la sangre y genera rechazo para la transfusión. Empero la irradiación con luz visible y adición de ascorbato permite una reducción en la dosis y tiempo de contacto con la sangre (Do Campo et al., 1988).

Varios análogos heterocíclicos como cristal violeta han mostrado tener un efecto sobre los epimastigotes (De Diego et al., 1988). A pesar de ello, la industria farmacéutica tiene poco interés en esta área, ya que cualquier programa de investigación es costoso y no justifica según ellos una base comercial (Gutteridge, 1987).

Por otro lado la leishmaniasis es causada por el protozoo parásito *Leishmania spp.* el cual es transmitido al vertebrado hospedero por la picadura de los mosquitos de los géneros *Lutzomya* (Nuevo Mundo) y *Phlebotomus* (Viejo Mundo). Las manifestaciones patológicas varían con las especies, las cuales son ampliamente distribuidas en áreas tropicales y subtropicales. Lo extenso y severo de este grupo de enfermedades son importantes problemas de salud. En nuestro país se observan dos tipos de Leishmaniasis: Leishmaniasis cutánea o “uta” cuyo agente etiológico es *Leishmania (viannia) peruviana* y Leishmaniasis mucocutánea selvática o “espundia”, cuyo agente etiológico es *Leishmania (viannia) braziliensis*. Estas enfermedades presentan una alta resistencia al tratamiento antimonial, la quimioterapia está limitada al uso de antimoniales pentavalentes como stibogluconato de sodio (Pentostan), N-metilglucamine (Glucantine), amphotericin B o pentamidine, las cuales son

tóxicas y de difícil administración debido al largo tratamiento y alto costo (Oullette y Papadopoulou, 1993). Además en pacientes tratados aparentemente en forma satisfactoria se ha reportado la presencia del parásito, usando la reacción en cadena de la polimerasa empleando el oligonucleótido específico (Guevara, et al., 1993).

Por todo lo expuesto se hace necesario continuar con la búsqueda de agentes de fuentes naturales como una alternativa para su utilización, ya que estos por su disponibilidad, bajo costo, estabilidad y pocas reacciones colaterales, resultarían idóneos para este tipo de enfermedades.

Tempone et al. (2001), reportaron que LAO aislada del veneno de *B. moojeni* evidenció una CE_{50} de 1,44; 1,19; 1,08 $\mu\text{g/ml}$ contra promastigotes de *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. chagasi*, respectivamente. En el caso de promastigotes de *L. amazonensis* la actividad de LAO fue 5 veces más alta comparada con el veneno crudo 7,56 $\mu\text{g/ml}$. La diferencia podría estar en la restricción del sustrato y otros hechos involucrados en el medio de cultivo en los ensayos *in vitro* que provocaron una acción menos eficiente de la enzima. Tal vez una explicación para comprender el efecto anti leishmánico de LAO sería que el estrés oxidativo producido por el peróxido de hidrógeno podría activar el "Shock proteico" descrito para *Leishmania sp*, ya que se induciría la actividad proteolítica dentro de la célula y también se afectaría la función mitocondrial debido al incremento de las concentraciones de calcio que lleva a la activación de otras enzimas como xantina oxidasa, óxido nítrico sintetasa y fosfolipasa con incremento secundario de radicales libres que amplifican el estrés oxidativo inicial. Es importante resaltar que Tempone, et al. (2001) mostraron que no hay evidencia de otras proteínas en el veneno de *B. moojeni* con actividad anti leishmánica. Es también interesante notar que la incubación de LAO con amastigotes de *Leishmania* no los afecta, lo que sugiere que en este estadio dichos parásitos tienen un eficiente sistema de protección contra radicales libres y peróxido de hidrógeno; las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y otras actuarían en el mecanismo de defensa antioxidante. En cambio los promastigotes son deficientes en catalasa y glutatión peroxidasa y

pueden ser eliminados en un 80-95% por el peróxido de hidrógeno producido por los macrófagos durante la infección (Pessatti et al., 1995). En concordancia con todo lo dicho, Tempone et al. (2001) también observaron que los promastigotes eran más susceptibles que los amastigotes a la enzima purificada de *B. moojeni*.

Los presentes resultados junto con el trabajo de Tempone (2001) y el de Fernández-Gómez et al., (1994), son los únicos que evidencian una acción antiprotozoaria de la enzima purificada.

No habiéndose encontrado otra enzima ni fracción con esta actividad en venenos ofídicos, lo cual puede señalarse adicionalmente como un modo de diferenciar a los venenos de serpientes.

Como se ha demostrado, LAO de *B. atrox* es capaz de producir muerte en *L. braziliensis* y de acuerdo con los estudios referidos, (Tempone, 2001) si una enzima es generadora de peróxido de hidrógeno como el caso de *B. moojeni* y este producto es llevado hacia la vacuola parasitophora, el resultado sería un tratamiento altamente específico no sólo para leishmaniasis sino también contra otros parásitos intracelulares.

Fernández-Gómez et al. (1994) reportaron que los venenos de *Naja haje* y *Cerastes cerastes* a una concentración de 100 µg/ml inhibieron fuertemente el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. donovani infantum in vitro*, obteniéndose resultados muy similares cuando los cultivos fueron tratados con benznidazole (100 µg/ml). Así mismo el veneno de *Vipera lebetina* solo tuvo un moderado efecto con *T. cruzi*, más no con *L. donovani infantum*, de acuerdo con la concentración del veneno. Dichos investigadores también trabajaron con venenos de escorpiones y arañas: *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, *Agelena gracilis* y *Agelena lobiryntica*, los cuales no tuvieron actividad inhibitoria en el crecimiento parasitario. Así también el análisis electroforético en PAGE.SDS permitió averiguar los componentes de los venenos que interactuaban inhibiendo el crecimiento de los parásitos y estos estaban en un rango entre 40 y 69 kDa.

En resumen la acción antibacteriana y antiprotozoaria de LAO obtenida del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*, constituye una valiosa evidencia a favor de convertir a esta enzima en una potente herramienta terapéutica, dada la especificidad de su acción.

4.3 Edema y hemorragia

En cuanto a esta actividad formadora de edema, se define como el incremento en la permeabilidad microvascular que conduce a una extravasación de fluido y su acumulación en los espacios intersticiales de los tejidos. Sin embargo muy pocos estudios se han realizado para determinar la naturaleza exacta del mecanismo del edema causado por LAO, aunque en algunos casos se ha determinado la dosis edemática mínima (DEM); así por ejemplo para *Ophiophagus hannah* “Cobra real”, la DEM es 6,1-6,8 µg/pata en ratones (Tan y Choy, 1994), 8 µg/pata de ratón para *Trimeresurus mucrosquamatus* (Wei Ji-Fu et al., 2002) y para *Eristocophis macmahoni* 4,8 µg/pata de ratón (Ali et al., 2000).

En nuestro caso para la enzima purificada de *Bothrops atrox*, hemos encontrado una DEM de 15,18 µg de proteína (Figura No. 15), lo que nos indica que LAO de este veneno tiene una moderada acción edemática equivalente a un 30% del máximo valor encontrado para una enzima de este tipo procedente de un veneno ofídico (Figuras No. 14 y 15).

Estudios previos revelaron que el edema inducido por venenos de serpientes es debida a la acción directa de alguna de sus toxinas o son mediadas por la liberación de autocoides como histamina, 5-hidroxitriptamina y sustancias de baja reactividad como prostaglandinas, serotoninas y kininas, (Ali et al., 1999). Así mismo se ha reportado que existen otros inductores de edema como ciertas proteasas y fosfolipasas ofídicas.

Por otro lado se tienen evidencias que la actividad de LAO de *O. hannah* que induce la formación de edema no fue inhibida por difenhidramina o dexametasona que son drogas antihistamínicas, sin embargo pre

administrando glutatión a los ratones se inhibe la actividad de la enzima, sugiriendo que el peróxido de hidrógeno liberado por acción desaminativa de la proteína está involucrado en la formación del edema, debido a que reduce a la flavina, lo que permitiría asumir que el FAD está directamente involucrado en el mecanismo catalítico (Tan y Ponnudurai, 1991). Otro posible camino para la acción inhibitoria del glutatión sobre LAO es su capacidad para escindir enlaces disulfuros presentes en la enzima, debido a que la proteína posee un grupo sulfhidrilo.

Otro aspecto muy interesante de resaltar es que si algunas L-aminoácido oxidasas ofídicas son capaces de inducir edema, tal como ocurre con la de *B. atrox*, esto sería una evidencia de su activa participación en el proceso inflamatorio posterior a la mordedura, por ello un estudio exhaustivo sobre el modo de bloquear a la enzima permitiría desarrollar métodos terapéuticos de gran utilidad en el control de este mecanismo y por ende en la preparación de fármacos específicos de uso humano.

En cuanto a la hemorragia, nuestra enzima en estudio no mostró esta actividad y la observación de este efecto en el veneno crudo la atribuimos a la actividad de Atroxina previamente aislada de este veneno (Pantigoso et al., 1996) y alguna otra hemorragina específica que podría estar presente (Fig. No. 16). En general no se ha encontrado acción hemorrágica de LAO en venenos ofídicos, salvo el caso de de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, en cuyo caso la acción hemorrágica podría atribuirse a la apoptosis de células endoteliales y otras células vasculares, según lo reportado por Souza et al. (1999).

De la misma manera la actividad hemolítica que tampoco muestra LAO de *B. atrox* sólo se ha reportado para la enzima de los venenos de *Trimeresurus flavoviridis* (Abe et al., 1998) y *Eristocophis macmahoni* (Ali et al., 2000).

CONCLUSIONES

1. El veneno de la serpiente *Bothrops atrox* posee una L-aminoácido oxidasa, la cual fue purificada al estado homogéneo en dos pasos cromatográficos: una columna de Sephadex G-100, seguida de un fraccionamiento en CM-Sephadex C-50 a pH 6.
2. Estructuralmente la enzima es una glicoproteína ácida formada por dos cadenas polipeptídicas, las cuales presentan al menos un puentes disulfuro, con un peso molecular de 63,12 kDa cada una.
3. La enzima es sensible al tratamiento térmico por encima de 55 °C, así como a la acción de mercaptoetanol, glutatión y a los iones Zn^{2+} .
4. La enzima purificada es una proteína inmunogénica que reacciona con el antiveneno botrópico polivalente y además causa un moderado edema en ratones albinos.
5. LAO mostró efecto antibacteriano, así como antiprotozoario contra promastigotes de *Leishmania braziliensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

ABE Y, SHIMOYAMA Y, MUNAKATA H, ITO J, NAGATA N, OHTSUKI K. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL *in vitro*. Biol Pharm Bull 1998; 21: 924-927.

ALI SA, HAMID F, ABBASI A, ZAIDI Z, SHEHNAZ Z. Pharmacological effects of the leaf-nosed viper snake (*Eristocophis macmahoni*) venom and its HPLC fractions. Toxicon 1999; 37 (8): 1095-1107.

ALI SA, STOEVA S, ABBASI A, ALAM JM, KAYED R, FAIGLE M, NEUMEISTER B, VOELTER W. Isolation, structural and functional characterization of an apoptosis-inducing L- amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. Arch Biochem Biophys 2000; 384: 216-226.

ALOOF-HIRSCH S, DEVRIES A, BERGER A. The direct lytic factor of cobra venom: Purification and chemical characterization. Biochim Biophys Acta 1968; 154: 53-60.

ANDREWS P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem J 1964; 91: 222-233.

AVRAMEAS S, URIEL J. Methode de coloration des acides amines a Paide de la L-aminoacideoxhidrase. J Compt Rend 1965; 261: 584 – 586.

BARBERIO C, DELFINO G, MASTROMEI G. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous “venom” of the yellow bellied, toad (*Bombina variegata pachypus*). Toxicon 1987; 25(8): 899-909.

BARKER R. Química orgánica de los compuestos biológicos. 1ra ed. Barcelona: Edit. Alambra; 1975.

BENDER M, BRUBACHER L. Catálisis y acción enzimática. 1ra ed. Barcelona: Edit. Reverte; 1977.

BLANCHARD M, GREEN DE, NOCITO V, RATNER S. L-Amino acid oxidase of animal tissue. J Biol Chem 1944; 155: 421 - 440.

BRADLEY G. Antibacterial effects of different snake venoms purification characterization of antibacterial proteins from *Pseuchis australis* (Australian king). Toxicon 1991; 29(9): 1129-1141.

CAMPBELL J, LAMAR W. The venomous reptiles of Latin America. New York: Crustock Publishing Associated; 1989. p. 192-197.

CARDENAS J, PANTIGOSO C, MALAGA O, YARLEQUÉ A. Contenido proteico y algunas actividades enzimáticas en tres venenos de serpientes mantenidas en cautiverio. Bol Soc Quim del Perú 1995; LXI(3): 151- 163.

CARRILLO, N. Contribución al conocimiento de las serpientes venenosas del Perú de las familias Viperidae, Elapidae e Hydrophiidae. Publicaciones del Museo de Historia Natural Javier Prado. UNMSM 1983; Serie A (30): 55.

CARRILLO N, ICOCHEA J. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural Javier Prado. UNMSM. 1995; Serie A (49): 27.

CASTRO DE LA MATA R. Manual del programa de estadística para ensayos biológicos. Servicio de Control de calidad. UPCH Lima: Perú; 1996.

CISNEROS Y. Características bioquímicas de una proteína antibacteriana aislada del veneno de *Lachesis Muta* "Shushupe" (Tesis para optar al Título profesional de Biólogo) Lima: UNMSM; 1996.

COLES CJ, EDMONDSON DE, SINGER TP. Reversible inactivation of L- amino acid oxidase. Properties of the three conformational forms. J Biol Chem 1977; 252: 8035-8039.

COLES CJ, EDMONDSON DE, SINGER TP. Mechanism of the reversible activation-desactivation of L- amino acid oxidase. Flavins and Flavoproteins. Tokio: Japan Scientific Press; 1980. p. 101-105.

CONDREA E, DE VRIES A, MAGER J. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venom. Biochim Biophys Acta 1964; 84:60.

CURTI B, MASSEY V, ZMUDKA M. Inactivation of snake venom L- amino acid oxidase by freezing. J Biol Chem 1968; 243: 2306-2314.

CURTI B, RONCHI S, IMONETTA S. D- and L- amino acid oxidases. In: Mueller F, editor. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme, Boca Ratón: CRC Press; 1992. p. 69-94.

DE DIEGO C, AVEDAÑO C, ALCINA A, CARRASCO L, ELGUERO J. Effect of heterocyclic analogues of triphenylmethane dyes against *Trypanosoma cruzi*. Ann Trop Med Parasit 1988; 82: 235-241.

DE KOK A, VEEGER C. Studies on L- amino acid oxidase I. Effects and the competitive inhibitors. Biochim Biophys Acta 1968; 33:345.

DE KOK A, RAWITCH A. Studies on L- amino acid oxidase. II Dissociation and characterization of its subunits. *Biochemistry* 1969; 8 (4): 1405-1410.

DIFCO LABORATORIES. Difco Manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10ma ed. USA: Laboratories; 1984. p. 844-850.

DO CAMPO R, MORENO SNJ, GADELHA FR, DE SOUZA W, CRUZ FS. Prevention of Chaga's disease resulting from blood transfusión by treatment of blood: toxicity and mode of action of gentian violet. *Biomed Environm Sci* 1988; 1: 406-413.

DOS SANTOS M, FERREIRA L, DIAS DA SILVA W, FURTADO F. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos "amarillo" y "blanco" de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 1993; 31(11): 1459-1470.

DU XY, ZHONG XY, WU XF, RUAN KC, ZHON YC. Advances in the study of phospholipases A_2 from *Agkistrodon halys* Pallas. *J Toxicol Toxin Rev* 1998; 17: 15-22.

DU XY, CLEMETSON KJ. Snake venom L- amino acid oxidases. *Toxicon* 2002; 40(6): 659-665.

FENNEL JF, SHIPMAN WH, COLE LJ. Antibacterial action of mellitin a polypeptide from bee venom. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127: 707-710.

FERNANDEZ-GOMEZ R, ZERROUK H, SEBTI F, LOYENS M, BENSLIMANE A, OUAISSI A. Growth Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: Preliminary identification of proteins from

Cerastes cerastes venom which interact with the parasites. *Toxicon* 1994; 32 (8): 875-882.

FERSHT AR, SHINDLER JS, TSUI WC. *Biochemistry* 1980; 19: 5520-5524.

GLASER HSR. Bactericidal activity of *Crotalus* venom *in vitro*. *Copeia* 1948; 4: 245- 247.

GREEN DE, PAULI R. Xantine oxidase enzyme. *Proc Soc Exp Biol and Med* 1943; 54: 148.

GROVE D, RANDALL W. Assay of antibiotics. 1st ed. New York: Medical Encyclopedia Inc; 1955. p. 78-86.

GUEVARA P, RAMIREZ JL, ROJAS E, SCORZA JV, GONZALES N, ANEZ N. 1993. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure (resumen). *Lancet* 1993; 341: 1341.

GUTTERIDGE NE. New anti-protozoal agents. *Int J Parasit* 1987; 17: 121-129

HEREDIA V, CAMPOS S, YARLEQUE A. Actividad de una 5' Nucleotidasa en el veneno de *Bothrops atrox* (L) "Jergón". *Acta Científica Venezolana* 1982; 33:333-337.

IWANAGA S, SUZUKI T. Enzymes in snake venoms. In: Lee CY, editor. *Handbook of Experimental Pharmacology. (Snake venoms)*. Berlin: Springer-Verlag; 1979, 52: 75-84

JIMENEZ-PORRAS JM. *Biochemistry of Snake Venoms. Clinical Toxicology* 1970; 3: 389- 431.

JHONSON EK, KARDONG KV, OWNBY CL. Observations on white and yellow venoms from an individual Southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon* 1987; 25(11): 1169-1180.

KONDO H, KONDO S, IKESAWA M, MURATA R, OHSAKA A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *J Med Sci Biol* 1960; 13:43.

KORNALIK F, MASTER RWP. A comparative examination of yellow and white venoms of *Vipera ammodytes*. *Toxicon* 1964;. 2: 109-115.

KREBS HA. *The Enzymes*. 1st ed. New York : Delmar Publishers; 1933. 217: 191.

KURTH J, AURICH H. Purification and some properties of L-amino acid oxidase from the venom of sand viper (*Vipera ammodytes*). *Acta Biol Med Ger* 1973; 31: 641-653.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Li ZY, YU TF, LIAN E. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 1994; 32(11): 1349 – 1358.

LOAYZA S, MORANTE Y, CAMPOS S. YARLEQUE, A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quim del Perú* 1985; LII (3): 151-163.

LOMONTE B, LEON G, HANSON L. Similar effectiveness of Fab and F(ab')₂ antivenom in the neutralization of hemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. *Toxicon* 1996; 34(10): 1197-1202.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

MACHEROUX P, SETH O, BOLLSCHWEILER C, SCHWARZ M, KURFURST M, AU LC GHISLA S. L- Amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. *Eur J Biochem* 2001; 268: 1679-1686.

MANNERVICK B, BOGGARAM V, CARLBERG I, LARSON K. The catalytic mechanism of mechanism of glutathione reductasa- flavin and flavoproteins 1st ed. Tokio: Japón Scientific Societies Press; 1980. p. 173-187.

MASSEY V, CURTI B. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. *J Biol Chem* 1967; 242 (6): 1259-1264.

MASTROMEI G, BARBERIO C, PISTOLESI S, DELFINO G. A bactericidal protein in *Bombina variegata pachypus* skin venom. *Toxicon* 1991; 29(3): 321-328.

MEBS D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms International. *J Biochem* 1970; 1: 335-342.

MEISTER A. The Use of snake venom L-amino acid oxidase for the preparation of α -keto acid. In: Buckley E, Porges N, editors. *Venoms comp.* 1st ed. Washington: American Association of the Advancement of Science; 1956. p. 295 – 302.

MINTON S A, MINTON M R. *Venomous Reptiles.* 1st ed. New York: Scribners; 1980 p. 195-199.

MONCAYO S. Chagas's disease. In: Ninth programme report of the UNDP/World Bank/WHO. Tropical disease research. Geneva: World Health Organization; 1993. p. 23-35.

MORELLO C. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanism in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol 1988; 90C: 1-12.

NAHAS L, KAMIGUTI S, SOUZA E, SILVA M, RIBERO DE BARROS M, MORENA P. The inactivating effect of *Bothrops jararaca* and *Waglerophis merremi* snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. Toxicon 1991; 29(2): 239-246.

NAKANO K, INAMASU Y, HAGIHARA S, OBO F. Isolation and properties of L-amino acid oxidase in Habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. Acta Med Univ Kagoshima 1972; 14: 229-239.

OSHIMA G, IWANAGA S. Occurrence of glycoproteins in various snake venoms. Toxicon 1969; 7: 235.

OUCHTERLONY O, NILSSON LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir D, editor. Handbook of experimental immunology, Vol 1 Immunochimistry. 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific publications; 1978. p. 32.1-32.50.

OULETTE M, PAPADOPOULOU B. Mechanism of drug resistance in *Leishmania*. Parasit Today 1993; 9: 150-153.

PAGE D, VAN ETTEN R. L- amino acid oxidase. II. Deuterium isotope effects and the actino mechanism for the reduction of L- amino acid oxidase by L- leucine. Biochim Biophys Acta 1971; 227: 16-31.

PAIK WK, KIM SD. pH substrate relation of L- amino acid oxidase from snake venom and rat kidney. *Biochim Biophys Acta* 1965; 96: 66

PANTIGOSO C, ESCOBAR E, MALAGA O, YARLEQUÉ A. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteinasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "Jergón". *Acta Científica venezolana* 1996; 47:67-73.

PESSATTI ML, FONTANA JD, FURTADO MDF, GUIMARAES MF, ZANETTE LRS, COSTA WT, BARON M. Screening of *Bothrops* snake venoms for L- amino acid oxidase activity. *Appl Biochem Biotechnol* 1995; 51-52, 197-210.

PINTO JC, BRENER Z. Chagas's disease and blood transfusion. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 139-143.

PONNUDURAI G, CHUNG MC, TAN NH. Purification and properties of the L- amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch Biochem Biophys* 1994; 313(2): 373-378.

PORTER DJ, BRIGHT HJ. Interpretation of the pH dependance of flavin reduction in the L- amino acid oxidase reaction. *J Biol Chem* 1980; 255: 2969-2975.

SAKURAI Y, TAKATSUKA H, YOSHIOKA A, MATSUI T, SUZUKI M, TITÁN K, FUJIMURA Y. Inhibition of human platelet aggregation by L- amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon* 2001; 39(12): 1827-1833.

SANCHEZ EF. Purificao e caracterizao parcial da L-amino ácido oxidase do veneno de *Lachesis muta muta*. Tese para obtencao do Grau de Mestre em Bioquímica. Belo Horizonte: Universidad Federal de Minas Gerais; 1982.

SANCHEZ E, MAGALHAES A. Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (Surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta* venom. Brazilian J Med Biol Res 1991; 24: 249-260.

SHAHAM N, BDOLAH A. L- amino acid oxidase from *Vipera palestinae* venom: Purification and assay. Comp Biochem Physiol 1973; 46B: 691-698.

SHIBA T, CAHNMANN HJ Conversion of 3,5 diiodotyrosine to thyroxine by rattlesnake venom. Biochim Biophys Acta 1962; 58: 609-610.

SINGER TP, KEARNEY EB. The L- amino acid oxidases of snake venoms. II Isolation and Characterization of homogeneous L- amino acid oxidase. Arch Biochem Biophys 1950; 29: 190-209.

SKARNES R. L-Aminoacid oxidase a Bactericidal System. Nature 1970; 225: 1072-1073.

SOLIS C, ESCOBAR E, YARLEQUE A, GUTIERREZ S. Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "Jergón shushupe" Rev peru biol 1999; 6(1): 75-84.

SOUZA DH, EUGENIO LM, FLETCHER JE, JIANG MS, GARRATT RC, OLIVA G, SELISTRE de ARAUJO HS. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L- amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. Arch Biochem Biophys 1999; 368: 285-290.

STILES BG, SEXTON FW, WEINSTEIN SA. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. Toxicon 1991; 29: 1129-1141.

SUGIURA M, SASAKI M, ITO Y, AKATSUKA M, OIKAWA T, MAKINO M. Purification and properties of L- amino acid oxidase from the venom of Kanko-Ku-Mamushi (*Agkistrodon caliginosus*) The snake 1975; 7:83-90.

SUHR SM, KIM DS. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1996; 224 (1): 134-139.

SUZUKI T, IWANAGA S. Studies on snake venom. VIII. Substrate specificity of L- amino acid oxidase in Mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffii* Boie) and Habu (*Trimeresurus okinavensis* Baulenger) venoms. Yakugaku Zasshi 1960; 80: 1002.

TAKATSUKA H, SAKURAI Y, YOSHIOKA A, KOKUBO T, USAMI Y, SUZUKI M, MATSUI T, TITANI K, YAGI H, MATSUMOTO M, FUJIMURA Y. Molecular characterization of L- amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. Biochim Biophys Acta 2001; 1544: 267-277.

TAN NH, KANTHIMATHI M, TAN CS. Enzymatic activities of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. Toxicon 1986; 24(6): 626-630.

TAN NH, TAN CS. Enzymatic activities of Malayan cobra (*Naja naja sputatrix*) venoms. Toxicon 1987; 25(11):1249.

TAN NH, SAIFUDDIN MN. Isolation and characterization of an unusual form of L- amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. Biochem Int 1989; 19: 937-944.

TAN NH, TAN CS. The enzymatic activities and letal toxins of *Trimeresurus wagleri* (Speckled pit-viper) venom. Toxicon 1989; 27(3): 349-357.

TAN NH, PONNUDURAI G. A comparative study of the biological properties of some sea snake venoms. *Comp Biochem Physiol* 1991; B99: 351-354.

TAN NH, SWAMINATHAN S. Purification and properties of the L- amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. *Internat J Biochem* 1992; 24: 967-973.

TAN NH, LIM KK, NIK JAAFAR M. An investigation into the antigenic cross-reactivity of *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom neurotoxin, phospholipase A, hemorrhagin and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon* 1993; 31(7): 865-872.

TAN NH, CHOY SK. The edema inducing activity of *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom L- amino acid oxidase. *Toxicon* 1994; 32(5): 539 .

TAN NH, PONNUDURAI G. An investigation on the antigenic cross-reactivity of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom hemorrhagin, thrombin-like enzyme and L- amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon* 1994; 32 (10): 1265-1269.

TEMPONE AG, ANDRADE HF Jr, SPENCER PJ, LOURENCO CO, ROGERO JR, NASCIMENTO N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 280 (3): 620-624.

THOMAS G, POUGH FH. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. *Toxicon* 1979; 17 (2): 221-228.

TORII S, NAITO M, TSURUO T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L- amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. *J Biol Chem* 1997; 272 (14): 9539-9542.

TORII S, YAMANE K, MASHIMA T, HAGA N, YAMAMOTO K, FOX J, NAITO M, TSURUO T. Molecular cloning and functional analysis of apotoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry* 2000; 39: 3197-3205.

UEDA M, CHANG CC, OHNO M. Purification and characterization of L- amino acid oxidase from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu snake). *Toxicon* 1988; 26(8): 695- 706.

WARBURG O, CHRISTIAN W. Isolierung and cristallisation del Gärungs ferments enolase. *Biochemische Zertschrift* 1941; 31: 384-421.

WARREN L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 1959; 234(8): 1971-1975.

WEI JF, LU QM, TAI H, JIN Y, WANG WY, XIONG YL. Purification, characterization and biological activity of an L- amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2002; 35(3): 219-224.

WELLNER D, MEISTER A. Crystalline L- amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. *J Biol Chem* 1960; 235: 2013-2018.

WELLNER D. Evidence for conformational changes in L- amino acid oxidase associated with reversible inactivation. *Biochemistry* 1966; 5(5):1585-1591.

WINZLER R. Determinations of serum glycoproteins. In: Lundbard R, Fenton J, Mann K, editors. *Methods of Biochemical Analysis*. 1st ed. New York: Interscience Publisher Inc.; 1955. 2: 279-311.

WODD W, WILSON J, BENBOW R, HOOD L. Biochemistry: A problems approach. 2nd ed. California: Benjamin Inc; 1974 .

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. L-Amino Acid Oxidase. New Jersey: The Worthington Enzymes Manual. Enzymes Related Biochemicals; 1993 p. 34-35.

YAMAKAWA M, NOSAKI M, HOKAMA Z. Fractionation of sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom, and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: Ohsaka A, Hayashi K, Sawai Y, editors. Animal, Plant and Microbial Toxins. Vol 1, Biochemistry, New York: Plenum Press; 1976.

YARLEQUÉ A, ESCOBAR E, CAMPOS S. Exonucleasas y otras actividades nucleolíticas en los venenos de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. Acta Científica Venezolana 1983; 34: 336-340.

YARLEQUÉ A, CARDENAS J, ESCOBAR E, GUTIERREZ S. Some biochemical properties and antibacterial action of a L- amino acid oxidase from Peruvian snake venoms. Toxicon 1997; 35(4) : 489

ZAVALETA A, VAISBERG A, GOÑI M. Citotoxicidad inducida por venenos de serpientes peruanas sobre fibroblastos de ratón. Revista de Biología Tropical 1992; 40: 143-145.

ZELLER A, MARITZ A. Uber eine neue L-aminosaure Oxidase. Helv Chim Acta 1944; 27: 1888-1902.

ZELLER A. Enzymes of snake venoms and their biological significance. Adv Enzymol 1948; 3: 459.

ZELLER A. Enzymes as essential component of toxins. In: Sumner JB, Myrback K, editors. The enzymes Vol 1. New York: Academic Press;1951. p. 286-986.

ZELLER A. Enzymes of snake venoms as tools in biochemical research. In: Memorias del Instituto Butantan. International Symposium on Animal Venoms; Sao Paulo: Mem Inst Butantan; 1966. 33(2): 349-358.

ZELLER A Snake venom action: are enzymes involved in it? *Experientia* 1977; 33: 143-150.