

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, BIOLÓGICA
Y MOLECULAR DE LA L- AMINOÁCIDO
OXIDASA DEL VENENO DE LA SERPIENTE
PERUANA *Bothrops pictus* “JERGÓN DE COSTA”**

TESIS

Para optar al grado académico de Doctor en ciencias biológicas

AUTOR

Fanny Elizabeth Lazo Manrique

Lima – Perú

2014

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Biología Molecular, Microbiología y Biotecnología Microbiana, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos,

[Escriba aquí]

A Dios

Por la gran fuerza que nos guía

***A mis padres Alfonso y Gladys, por el ejemplo
de vida, dedicación y cariño que siempre
me fortalece.***

[Escriba aquí]

***A mi esposo por su compañerismo,
comprensión, paciencia, apoyo invaluable a lo
largo de todo este estudio y por todo el amor y cariño a mi dedicado***

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

[Escriba aquí]

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi asesor y amigo Dr. Armando Yarlequé por su orientación, interés, paciencia, dedicación, facilidades para la realización de esta tesis, por todas sus enseñanzas y experiencias compartidas y por la confianza depositada en mí y en todos sus tesisas.

Mi agradecimiento especial al Magíster Dan Vivas mi eterna gratitud por su cordialidad, apoyo invaluable y contribución en el desarrollo del presente trabajo.

Al Magíster Gustavo Sandoval por su constante apoyo, colaboración y contribuciones en las investigaciones desarrolladas en el laboratorio de Biología molecular.

A la Magíster Edith Rodríguez por su amistad y confianza durante todo el trabajo de investigación.

Al gran Maestro Orestes Málaga que Dios tenga en su gloria, expreso mi sincero reconocimiento por sus consejos, por su valioso apoyo y fuerza para seguir adelante durante mis estudios de doctorado.

A la Magíster Susana Gutiérrez del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana por su orientación y ayuda prestada en el análisis de las pruebas microbiológicas.

Al Dr. (c) Edgar Gonzalez Kozlova del Instituto de Ciencias Biológicas- Universidad Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte-Brasil, por su constante apoyo en el análisis molecular.

A los Biólogos: Julio Mendoza, Julio Delgadillo, César Ortiz, Frank Huari, por el constante apoyo y compañía durante la realización de este trabajo.

*A todos aquellos que en el Perú dedican su tiempo,
atención, trabajo e imaginación al noble animalito
ponzoñoso con el fin de ayudarse mutuamente*

[Escriba aquí]

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	8
Materiales y Métodos	16
Resultados	34
Discusión	70
Conclusiones	117
Referencias Bibliográficas	119
Anexos	146

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Deshidrogenación de L-aminoácidos catalizada por la L-aminoácido oxidasa.....	10
FIGURA 2. <i>Bothrops pictus</i> “Jergón de costa”.....	16
FIGURA 3. Purificación de BpicLAAO en Sephadex G-100.....	36
FIGURA 4. Purificación de BpicLAAO en CM Sephadex C-50.....	36
FIGURA 5. Análisis de pureza de BpicLAAO por RP-HPLC.....	37
FIGURA 6. Electroforesis en PAGE de los pasos realizados para purificar BpicLAAO	37
FIGURA 7. Electroforesis en PAGE-SDS.....	38
FIGURA 8. Determinación de peso molecular de BpicLAAO por PAGE-SDS.....	39
FIGURA 9. Determinación de peso molecular de BpicLAAO por cromatografía de filtración molecular.....	39
FIGURA 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad de BpicLAAO	41
FIGURA 11. Efecto del pH sobre la actividad de BpicLAAO.....	41
FIGURA 12. Deglicosilación de BpicLAAO.....	44
FIGURA 13. Actividad hemolítica de BpicLAAO.....	46
FIGURA 14. Formación de edema por acción de BpicLAAO.....	47
FIGURA 15. Efecto edemático de BpicLAAO.....	47
FIGURA 16. Actividad hemorrágica de BpicLAAO.....	48
FIGURA 17. Efecto hemorrágico de BpicLAAO.....	48

[Escriba aquí]

FIGURA 18. Efecto de BpicLAAO sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP.....	49
FIGURA 19. Cálculo delC50 de BpicLAAO sobre la agregación plaquetaria	50
FIGURA 20. Efecto de la catalasa sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP.....	50
FIGURA 21. Efecto antibactericida del veneno total y de BpicLAAO por el método de cilindro en placa.....	52
FIGURA 22. Efecto de BpicLAAO sobre <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> en presencia de catalasa.....	53.
FIGURA 23.. Inmunodifusión eInmunoelectroforesis.....	55
FIGURA 24. Capacidad neutralizante del suero antibotrópico polivalente sobra la actividad LAAO.....	56
FIGURA 25. Electroforesis en gel de agarosa del cDNA que Codifica a BpicLAAO.....	57
FIGURA 26. Secuencia de aminoácidos correspondientes a a BpicLAAO deducida del cDNA.....	59
FIGURA 27. Secuencia de la proteína madura de BpicLAAO.....	60
FIGURA 28. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de BpicLAAO y de LAAOs de otras especies de la familia Viperidae.....	64
FIGURA 29. Estructura secundaria de BpicLAAO.....	65
FIGURA 30. Relación evolutiva de las LAAOs.....	66
FIGURA 31 a. Modelo teórico de la estructura terciaria de BpicLAAO.....	67
FIGURA 31b. Modelo estructural en donde se muestran los dominios de BpicLAAO.....	68
FIGURA 31 c. Modelo estructural de superficie de BpicLAAO.....	68

FIGURA 32. Modelo teórico de la estructura cuaternaria de BpicLAAO.....	69
--	----

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Estabilidad de BpicLAAO a diferentes tiempos y pH.....	34
TABLA 2. Purificación de BpicLAAO.....	35
TABLA 3. Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad de BpicLAAO.....	42
TABLA 4. Acción de algunos inhibidores enzimáticos sobre la actividad de BpicLAAO.....	43
TABLA 5. Carbohidratos asociados al veneno total y a BpicLAAO.....	45
TABLA 6. Efecto antibacteriano del veneno total y de BpicLAAO por el método de cilindro en placa.....	51
TABLA 7. Efecto antibacteriano de la tetraciclina sobre <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	54.
TABLA 8. Secuencias homólogas a la secuencia nucleotídica de BpicLAAO.....	58
TABLA 9. Secuencias homólogas a la secuencia de aminoácidos de BpicLAAO.....	58
TABLA 10. Parámetros físicos y químicos obtenidos para la proteína deducida.....	61
TABLA 11. Comparación de las secuencias codificadoras de aminoácidos para las SVLAAOs.....	62
TABLA 12. Aminoácidos que componen los tres dominios de BpicLAAO.....	64
TABLA 13. Efecto antibacteriano de diferentes venenos de serpientes por el método de difusión en disco.....	103

[Escriba aquí]

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Pesos moleculares de algunas LAAOs purificadas de venenos de serpientes.....	147
ANEXO 2. Actividad biológica de algunas SVLAAOs	148

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
BpicLAAO	L-aminoácido oxidase de <i>Bothrops pictus</i>
BpicVT	Veneno total de <i>Bothrops pictus</i>
Cm-Sephadex C-50	Carboximetil Sephadex C-50
DEM	Dosis edemática mínima
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
kDa	Kilo Dalton
LAAO	L-aminoácido oxidasa
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NaCl	Cloruro de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SVLAAO	L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente
TEMED	N,N,N,N'tetrametiletildiamino
Tris	Tris hidroximetilaminometano
µg	Microgramo
µl	Microlitro

RESUMEN

Se ha purificado y caracterizado la L-Aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* "Jergón de costa" (BpicLAAO), mediante cromatografía de filtración molecular sobre Sephadex G-100, seguida de una cromatografía de intercambio catiónico sobre CM Sephadex C-50, ambas equilibradas con buffer acetato de amonio 0,05M pH 6. El grado de purificación fue de 22,02 veces con una actividad específica de 4,25 U/mg. La pureza de la proteína fue evaluada por HPLC en fase reversa y mediante PAGE-SDS. Es una proteína ácida conteniendo 18,7 % de carbohidratos asociados, con un peso molecular de 132,27 kDa, por cromatografía de filtración y de 65,2 y 58,6 kDa por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras y no reductoras respectivamente, evidenciando que se trata de una enzima homodimérica con al menos un puente disulfuro intracatenario, el cual es importante para su actividad. El peso de la enzima disminuyó a 47 kDa después del tratamiento con PNGasa F. La enzima mostró un pH óptimo de 8,5 usando L-leucina como sustrato, es inestable en el rango de pH alcalino a partir de 9,0; tolera hasta los 55 °C. La actividad enzimática disminuyó considerablemente en presencia de Zn²⁺, glutatión y 2-mercaptoetanol, lo que sugiere la presencia de por lo menos un puente disulfuro intracatenario para su actividad. BpicLAAO presenta actividad hemorrágica sobre piel de ratones albinos siendo la dosis hemorrágica mínima de 2,79 µg de proteína, produce edema, habiéndose calculado la dosis edemática mínima en 7,80 µg de proteína; también inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP de una manera dosis dependiente. El efecto antibacteriano tanto del veneno crudo como de la enzima purificada se evidenció sobre cultivos de bacterias Gram positivas y Gram negativas, observándose que las Gram positivas son más susceptibles que las Gram negativas. Se demostró la antigenicidad de la enzima por inmunodifusión e inmunolectroforesis, usando suero antibotrópico polivalente. Asimismo mediante el análisis molecular a partir de las secuencias de cDNA de LAAO de *B. pictus* se obtuvo una secuencia de 1494 pb que codifica un péptido señal y una proteína madura de 487 residuos aminoacídicos. BpicLAAO, muestra homología con otras enzimas similares de venenos de serpientes habiéndose identificado los aminoácidos correspondientes a los dominios de unión al FAD, de unión al sustrato y el dominio helicoidal. Encontrándose además dos motivos para N-glicosilación.

Palabras clave: enzima, flavoproteína, N-glicosilación, secuencia nucleotídica, serpiente, veneno.

ABSTRACT

A LAAO enzyme (BpicLAAO) was purified and characterized from the venom of *Bothrops pictus* snake, using two chromatographic steps, a gel filtration column on Sephadex G-100 followed by CM Sephadex C-50 cationic exchange column, both equilibrated with 0,05 M ammonium acetate buffer, pH 6. The enzyme was purified 22,02 times with a specific activity of 4,25 U/mg. The purity was analyzed either by reverse-phase HPLC column and SDS-PAGE. It is an acid glycoprotein containing 18,7% of associated carbohydrates, with a molecular weight of 132,27 kDa using Sephacryl S-200 gel filtration column, and 65,2 kDa and 58,6 kDa by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions respectively. It is a homodimeric enzyme with at least one S-S bond, which is implicated in its activity. Treatment with commercial PNGase F resulted in a reduction of original molecular weight until 47 kDa. The enzyme showed a optimum pH of 8,5 using L-Leucine as substrate. It was unstable over pH 9 and however it could resist until 55 °C. Incubation with Zn²⁺, glutathione and 2-mercaptoethanol caused a strong reduction of its activity. On the other hand, BpicLAAO is an haemorrhagic (DHM: 2,79 µg) and edemetic protein (DEM: 7,80 µg), but produced inhibition of platelet aggregation induced by ADP in a dose-dependent manner. In addition BpicLAAO showed antibacterial action on Gram-positive and Gram-negative cultures, being Gram-positive cultures more sensible than the other. BpicLAAO was recognized by polyvalent botropic antivenom using immunodiffusion and immunoelectrophoresis techniques. Furthermore, molecular analysis of coding sequence for this protein revealed a sequence of 1494 bp, which codified a signal peptide and a mature protein of 487 amino acids related to FAD, substrate and helicoidal domains and also two N- glycosilation sites.

Key words: enzyme, flavoprotein, N-glycosylation, nucleotidic sequence, snake, 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 biotecnológico y farmacológico, en donde algunos principios activos ya han demostrado su eficacia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso.

Se estima, que en el Perú existen más de 33 especies de serpientes venenosas (Campbell y Lamar, 1989), comúnmente conocidas como víboras y más de la tercera parte de estas especies pueden entrar en la categoría de endémicas y esto gracias a la diversidad de hábitats y nichos ecológicos en los cuales estos reptiles pueden albergarse, desarrollarse y evolucionar; es esta riqueza geográfica, lo que caracteriza al país como uno de los más megadiversos del planeta.

Al igual que todas las serpientes u ofidios, las víboras cumplen el rol fundamental de ser controladores biológicos, específicamente para el caso de las serpientes venenosas se les atribuye el control principal de roedores u otros mamíferos pequeños y en segunda instancia de aves dependiendo del hábitat seleccionado para vivir, sea este en tierra o en los árboles.

Para la bioquímica y la biología molecular, el centro de atención hacia las víboras son sus venenos, ya que son una fuente de innumerables componentes principalmente de naturaleza proteica que actúan de una manera sinérgica con el fin de alterar y colapsar la fisiología de su presa y también de los potenciales animales depredadores y agresores en donde el ser humano está incluido. Esto es

posible por la acción sinérgica de las enzimas y péptidos que bloquean, degradan o frenan los procesos fisiológicos a nivel sanguíneo, muscular y nervioso (Kini, 2011).

El veneno ofídico es considerado como el fluido animal más rico en cuanto a la cantidad y variedad de sus componentes. Esencialmente, es una mixtura de componentes orgánicos e inorgánicos, elaborado en glándulas salivales modificadas con el objetivo de inmovilizar, matar y digerir a la presa (Mebs, et al., 2003). Los componentes orgánicos mayoritarios son las proteínas, tanto en sus formas enzimáticas como no enzimáticas, cuya proporción varía de acuerdo al género de serpiente.

Desde algunas décadas atrás, el veneno de la serpiente ya no es tan solo considerado como una materia prima para la elaboración de antivenenos, también ha sido contemplado el uso de sus componentes y derivados como fármacos para determinadas patologías gracias a que estas moléculas cumplen en primer lugar con la especificidad de blanco, minimizando el riesgo de efectos secundarios, e identidad, que impide una generación de inmunidad rápida del paciente ante el fármaco por ser los componente ofídicos, en la mayoría de los casos, muy semejantes a la moléculas propias de la presa. El uso de los venenos de serpiente en la biomedicina ha venido abarcando el campo de la trombosis, cardiología, neurología, parasitología, enfermedades tropicales, virología etc. (Koh et al., 2006).

En el campo de la oncología, componentes tales como las desintegrinas y las L-aminoácido oxidasas (LAAO) han demostrado poseer propiedades anticancerígenas, muy distintas a las moléculas que actualmente se emplean en terapia (Jain y Kumar, 2012).

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 sustrato a un α -cetoácido con la producción de amoníaco y peróxido de hidrógeno. (Blanchard et al, 1944).

La asociación de esta enzima con el grupo prostético FAD le otorga un color amarillo de manera que se trata de una flavoproteína la cual marca el tipo de veneno que analizamos. Es así que los de color amarillo contienen LAAO y la tonalidad de esta coloración indica la concentración en que se encuentra la enzima (Du y Clemetson, 2002).

Antes de la década del 90, el aislamiento y caracterización de SVLAAO, 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 SVLAAO, 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).

Como ya se mencionó, el Perú cuenta con una variada fauna ofídica siendo la especie *Bothrops pictus* “Jergón de costa”, perteneciente a la familia Viperidae, sub familia Crotalinae la especie de mayor distribución en la región de costa del Perú, su distribución geográfica abarca principalmente los departamentos de La Libertad, Ancash, Lima e Ica; con una distribución altitudinal comprendida entre los 50 y 3256 msnm (Distrito de Chiquián, Ancash), en la vertiente occidental de los andes y por tanto la responsable de la mayoría de accidentes ofídicos en esta región (Campbell y Lamar, 1989). Se le ha encontrado también en la localidad de Pullo-Parinacochas en Ayacucho y en la sierra de Huancavelica (Ascencios y Cutti, 1995). En Lima se ha reportado con frecuencia en las Lomas de Lachay, Quebrada Verde, Lurín, Pachacamac, Vitarte, Canta y en los alrededores del observatorio de Jicamarca.

Bothrops pictus es una serpiente que se caracteriza por ser, terrestre, robusta, de color gris claro con manchas en el dorso de color violeta negruzco a manera de zigzag y vientre blanquecino, La cabeza en forma de punta de lanza, con canthus ligeramente pronunciados, manchas pardas en la cabeza y escamas pequeñas, presenta una banda parda oscura detrás del ojo hasta donde termina la boca. Los ojos presentan pupila elíptica vertical, dientes solenoglifos y foseta loreal. (Campbell y Lamar, 1989). Los especímenes adultos pueden alcanzar una longitud de 100 cm (Fig. 2). Su alimentación consiste en pequeños roedores y lagartijas (Carrillo, 1983).

Dentro de los numerosos componentes enzimáticos del veneno de la serpiente *B. pictus* destacan las enzimas proteolíticas, fosfolipasas y L- aminoácido oxidasa.

El desarrollo de un método de purificación para la L-aminoácido oxidasa del veneno de *B. pictus* (BpicLAAO), 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.

Por estas razones, el presente trabajo ha consistido en aislar y purificar la BpicLAAO, determinar las propiedades bioquímicas y moleculares, evaluar el efecto biológico y antimicrobiano *in vitro* de la enzima purificada del veneno sobre microorganismos patógenos, Así como observar su efecto sobre la agregación plaquetaria.

La potencial aplicación de LAAO en salud humana, estriba en que abre un camino alternativo para el empleo de productos naturales convertidos en herramientas biotecnológicas para diversos usos tales como el tratamiento antimicrobiano y antitrombótico ya que, se podrían preparar fármacos usando como modelo las regiones peptídicas con estas actividades e incluso se podrían

obtener proteínas recombinantes cuya eficiencia ya ha sido demostrada para otros componentes proteicos.

Consideramos que esta investigación es un aporte a la investigación sobre venenos de origen animal y que los datos encontrados tienen una alta relevancia para los fines antes señalados. Pero además es una contribución a la protección del valioso acervo faunístico, teniendo en cuenta el peligro de extinción en que se encuentra la serpiente *Bothrops pictus*.

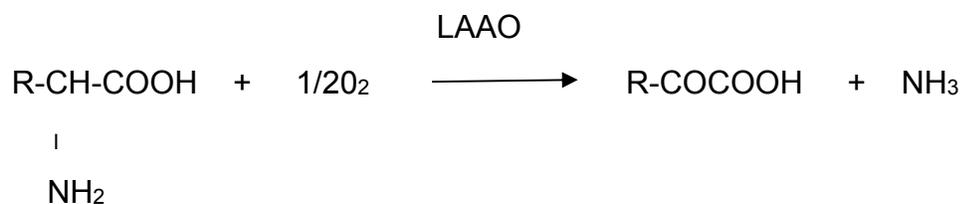
ANTECEDENTES

En el mundo existen aproximadamente 3,300 especies de serpientes, las cuales están distribuidas en 11 familias y solo cuatro son productoras de sustancias tóxicas. En el Perú existen 33 especies de serpientes venenosas clasificadas de acuerdo a sus características morfológicas en dos familias: Viperidae y Elapidae (Barraviera, 1994).

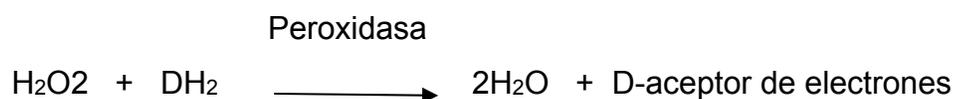
El veneno de las serpientes venenosas está compuesto de sustancias simples y complejas, cuya proporción y características específicas varían entre las diferentes especies conocidas (Tu, 1977), farmacológicamente son complejos proteicos activos de naturaleza heterogénea y altamente antigénicos. El veneno es una mezcla de proteínas (enzimas), polipéptidos, toxinas, los cuales inducen diversos efectos tóxicos en sus víctimas. A pesar de la función primaria del veneno de las serpientes para capturar a sus presas, puede ser usado secundariamente como defensa, causando accidentes en los seres humanos (Amaral, 1977)

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 biotecnológicas, tanto en la investigación bioquímica como farmacológica. LAAO está ampliamente presente en venenos de serpientes, es altamente específica para L-aminoácidos generalmente los aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos son los mejores substratos. 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.



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



En ausencia de catalasa:

Existe la formación de un producto intermedio que es el α -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:

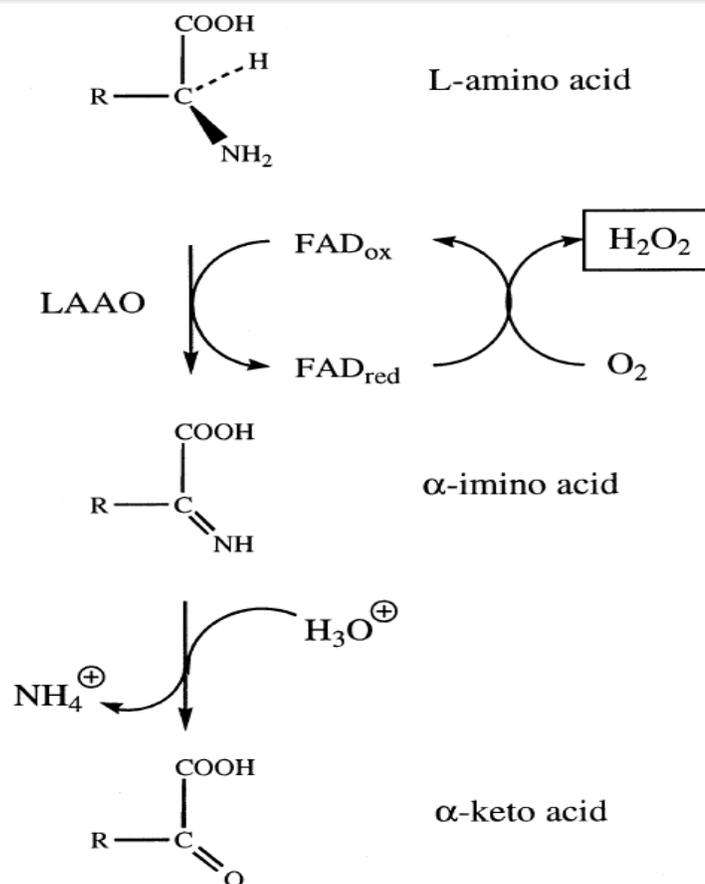


Figura 1. Deshidrogenación de L- aminoácidos catalizada por L-aminoácido oxidasa. Los productos de esta reacción, los iminoácidos hidrolizan espontáneamente a α-cetoácido y amonio. Los equivalentes reductores derivados de la deshidrogenación son transferidos al cofactor FAD, que es rápidamente oxidado por el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno.

Fuente: Macheroux et al., 2001.

Esta enzima exhibe una preferencia por aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos incluyendo, fenilalanina, triptófano, tirosina y leucina. Sin embargo, el mecanismo de toxicidad inducido por LAAOs de venenos de serpientes aún es desconocido. La actividad de LAAO fue observada por primera vez 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 SVLAAO fue descrita por

Zeller y Maritz (1944) en el veneno de *Vipera aspis*. La LAAO 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 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, como Elapidae en cantidades significativas y con alta actividad enzimática, como es el caso de LAAO de *Calloselasma rhodostoma* (30% del veneno total), Takatsuka et al. (2001) y es desde luego una buena fuente para el estudio de esta enzima. Tan y Ponnudurai (1991), también detectaron LAAO en el veneno de serpientes marinas (Hydrophiinae) aunque con baja actividad.

Se ha comprobado que la presencia del color amarillo en los venenos es resultado de la existencia del cofactor FAD en la enzima, encontrándose además diferencias en la toxicidad y actividades proteolíticas si los venenos carecen de LAAO, es decir son incoloros. Es interesante señalar que la presencia y la concentración de esta enzima puede variar entre individuos de especies relacionadas e incluso en la misma especie, más aún 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 primeras enzimas de veneno investigadas (Zeller y Maritz, 1944), su rol como constituyente de los venenos no ha sido esclarecido totalmente hasta la fecha 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 o inhibidor de la agregación plaquetaria (Li et al., 1994; Takatsuka et al., 2001; Suhr y Kim, 1996), participante en el proceso digestivo de la serpiente, generando desaminación oxidativa de los L-aminoácidos (Minton y Minton, 1980), agente antibacteriano (Yarlequé et al., 1997 y Stiles et al., 1991), inductor de apoptosis (Torii et al., 1997, Masuda et al., 1997, Suhr y Kim, 1996), factor citotóxico (Souza et al., 1999, Ahn et al., 1997), inductor de edema, hemólisis y hemorragia (Tan y Choy, 1994; Ali et al., 2000; Sakurai et al., 2003). En el 2001 Tempone et al., reportó que la enzima de *Bothrops moojeni* causa la muerte *in vitro* de los promastigotes de *Leishmania sp.* Muchos de los procesos biológicos de LAAOs son debido a los efectos secundarios del peróxido de hidrógeno, producido durante la reacción enzimática (Torii et al., 1997, Li et al., 1994, Tan y Choy, 1994, Suhr y Kim, 1996).

Trabajos recientes tratan de entender el mecanismo de acción tóxica y farmacológica de algunas LAAOs, Sakurai et al. (2003) presentaron resultados interesantes con una LAAO aislada del veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii*, donde la enzima se presenta como agente anticoagulante al actuar como inhibidor selectivo del factor IX de la cascada de coagulación. Zhang et al. (2003) trabajando en la caracterización molecular de LAAO aislada del veneno de *Trimeresurus stejnegeri* encontraron que tiene acción anti HIV, demostrando el potencial de esta enzima como fármaco promisorio. Una nueva LAAO fue aislada del veneno de la serpiente *Crotalus durissus cascavella* (Toyama et al., 2006), la cual presentó actividad leishmanicida altamente eficiente y también presentó inducción de la agregación plaquetaria y acción bactericida.

Por ello, LAAO 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 diiodo tirosina (Shiba y Cahnmann, 1962), obtención de FAD desprovisto de impurezas (Singer y Kearney, 1950), determinación cuantitativa de fenilalanina en pacientes con fenilcetonuria y determinación de tirosina libre en el suero de pacientes con hipertiroidismo e hipotiroidismo (Zeller, 1966).

Por otro lado Glaser (1948) y Skarnes (1970) describieron el efecto antibacteriano de los venenos de vipéridos; atribuyéndole este efecto a la LAAO. Más tarde Stiles (1991) observó el mismo efecto, tanto en los venenos de elápidos como vipéridos y en forma más específica por acción de la enzima del veneno del elápidio *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 2,8 kDa; 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 6,7 kDa. Esta proteína presenta significativa similaridad con la proteína inductora de interleucina-4 de ratones (Raibekas y Massey, 1998), con la monoamino oxidasa (MAO) pudiendo estar involucrada en la respuesta de la inflamación alérgica (Chu y Paul, 1997).

Investigaciones con la estructura de las LAAOs están siendo realizadas constantemente. Pawelek et al. (2000) presentaron la primera estructura tridimensional de la LAAO de *Calloselasma rhodostoma* obtenida por cristalografía de rayos X. Subsecuentemente varias estructuras de SVLAAOs son descritas partir de la secuencia N-terminal y de cDNA. (Takatsuka et al., 2001, Zhang et al., 2003, Macheroux et al., 2001, França et al., 2007). La mayoría de las LAAOs aisladas de venenos de serpientes presentan grandes similaridades como

masa molecular, punto isoeléctrico y secuencia N- terminal; por ejemplo la LAAO que fue aislada de *Agkistrodon halys blomhoffii* presenta 90% de similaridad con la secuencia N-terminal de *Crotalus atrox* (Torii et al., 1997) y 88% con *C. adamanteus* (Raibekas y Massey, 1998). Otro factor estructural es la presencia del ligante a FAD. El grupo prostético FAD hace grandes interacciones con los átomos de la proteína. Este ligante es inclusive considerado un dominio de la proteína LAAO.

En el Perú se encuentran escasos reportes para esta enzima. Cárdenas et al. (1995) detectaron su presencia en los venenos de las especies peruanas *Lachesis muta*, *Bothrops atrox* y *Crotalus durissus terrificus*. Cisneros et al. (2006) 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. En el 2007 Lazo et al., aislaron la enzima del veneno de *Bothrops atrox* demostrando su efecto antiprotozoario sobre cepas de *Leishmania sp* y *Trypanosoma cruzi*.

Desde el punto de vista de la salud pública, el veneno de esta serpiente requiere ser profundamente estudiado, ya que es la especie de mayor distribución y la responsable de la mayoría de accidentes ofídicos en la costa central y parte de la sierra del Perú y que a pesar de disponer de un antiveneno polivalente contra varias especies del género *Bothrops* (*atrox*, *pictus*, *brazili*, *barnetti* y *hyoprora*) 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 venenos ofídicos.

Respecto a la investigación del veneno de *Bothrops pictus* en el Perú, se puede resumir de la siguiente manera: se ha estudiado en forma preliminar la bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos del veneno total (Olascoaga, 1987). Así mismo se ha purificado y caracterizado parcialmente una enzima similar a trombina (Mesía et al., 2011), una fosfolipasa A (Escobar et al., 1994), una enzima fibrinogenolítica (Cortez, 1997) y una proteasa con actividad hemorrágica (Bellido et al., 2014); hasta la fecha ninguna enzima presente en el veneno de esta serpiente ha sido estudiada a nivel molecular. Sin embargo, en un reciente trabajo hecho por Kohlhoff et al. (2012) en base a estudios proteómicos no detectaron la presencia de BpicLAAO.

Teniendo en cuenta estas premisas y al hecho de que Yarlequé et al. (1997) detectaran una acción antibacteriana en venenos de serpientes peruanas: *Lachesis muta*, *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops atrox*, así como Sakurai et al. (2001), demostró que LAAO de la serpiente *Naja naja kaouthia* tiene acción inhibitoria sobre la agregación plaquetaria nos propusimos realizar la caracterización bioquímica, biológica y molecular de esta proteína presente en el veneno de *B. pictus*, la cual será muy importante, tanto a nivel de la comprensión de su mecanismo de acción aún no del todo esclarecido, así como su potencial biotecnológico en el campo farmacológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico:

1.1 Veneno: Se utilizó veneno crudo de especímenes adultos de la serpiente *Bothrops pictus*, procedentes de la Zona de Canta, Dpto. de Lima, mantenidos en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la UNMSM (Figura 2). El veneno extraído por presión manual de las glándulas, fue liofilizado y conservado a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.



Figura 2. *Bothrops pictus* “Jergón de costa”

1.2 Antiveneno: El antiveneno utilizado fue el suero antibotrópico polivalente al estado líquido, producido en base a los venenos de *B. pictus*, *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. hyoprora* y *B. brazili*, elaborado por el Instituto Nacional de Salud-Lima (INS). Cada vial contiene 10 ml de antiveneno (inmunoglobulinas específicas de origen equino), que neutralizan no menos de 25 mg del veneno de *Bothrops atrox* (1 dosis). Para los ensayos de comparación se utilizaron ampollas de

antiveneno vigentes (Lote: 01000376 Fecha de expiración: Octubre 2009). Todos los experimentos realizados con el antiveneno fueron entre junio de 2008 y marzo de 2009.

1.3 Cepas microbianas: Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 95923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio cholerae* Serotipo Inaba INS.

1.4 Animales de experimentación: Se usaron ratones albinos cepa Balb C machos (18-22 g de peso) procedentes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM.

1.5 Células sanguíneas: Se utilizó glóbulos rojos humanos lavados con buffer isotónico para los ensayos de hemólisis y plaquetas humanas para los ensayos de agregación plaquetaria procedentes de donantes voluntarios y saludables.

2. Material de Laboratorio

- Substrato: L-leucina
- Agentes inhibidores y Activadores: Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), Iodoacetato, Etilen diamino tetraacético (EDTA), 2-mercaptoetanol, Ácido glutámico, cisteína glutatión, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} bajo la forma de cloruros.
- Estándares de peso molecular: Albúmina sérica bovina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Lisozima (14,3 kDa).
- Resinas Cromatográficas: Sephadex G-100 y CM Sephadex C-50.
- Electroforesis: Acrilamida, Bis acrilamida, Dodecil sulfato de sodio (SDS), Tetra etil metilen diamino (TEMED), Persulfato de amonio, Azul brillante de Coomassie, Azul de bromofenol,

Agarosa, Gel red, Solución decolorante(metanol, ácido acético, agua).

- Buffers y otros: Acetato de amonio 0,05 y 1M a pH 5,0 y 6,0, Tris HCl 0,1M pH 8,0 y 9,0, Solución salina 0,9%, Citrato de sodio 3,8%, Reactivo de Folin Ciocalteus 1:6. Acido Trifluoroacético, Metanol y Acetonitrilo grado HPLC.
Todos los reactivos son de Sigma Chemical Co.
- Kits para la obtención y amplificación de ácidos nucleicos: Kit total RNA purification(AMRESCO®), Kit Transcriptor First Strand, cDNA synthesis (Roche®) y Platinum[®], Taq DNA Polymerase /Invitrogen™).
- Kit para electroforesis de ácidos nucleicos: Agarosa tipo I (Calbiochem®), Buffer TBE X (tris 892 mM, ácido bórico 889 mM y EDTA 20 mM pH 0,5) buffer muestra (Novagen®) gel red (3µl).

3. MÉTODOS

3.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA

3.1.1 Método de Lowry.- En todos los ensayos el contenido proteico del veneno crudo y de la enzima 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 a diferentes concentraciones 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 en un espectrofotómetro Shimadzu UV/VIS 120-02 y se determinó la

concentración de proteína con respecto a un estándar de albúmina sérica bovina.

3.1.2 Método de absorción de luz ultravioleta.- Este método se basa en la propiedad que tienen los anillos aromáticos de los aminoácidos de absorber luz UV con un valor máximo a 280 nm. El contenido proteico fue estimado midiendo la absorbancia espectrofotométricamente a 280 nm (Warburg y Christian, 1941). Este procedimiento se usó principalmente en el proceso de purificación de la enzima.

4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de LAAO se determinó por el método descrito en el Worthington Enzyme Manual (1993), adaptado a nuestras condiciones de laboratorio. 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 µl de peroxidasa al 0,001%. La mezcla se preincubó durante 5 minutos a 37 °C y luego se agregaron 25 µl de la solución de enzima o veneno crudo, determinándose el incremento de absorbancia a 436 nm, en un rango de 0 a 10 minutos. La actividad enzimática fue expresada en µmoles 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 µmol de L-leucina por minuto.

5. ESTABILIDAD AL pH

Con el propósito de establecer la máxima estabilidad de la enzima al pH previa a la purificación, se preparó una batería de tubos que contenían buffer acetato de amonio 0,1M (pH 5,0 y 6,0); buffer Tris HCl 0,1M (pH 7,0, 8,0 y 9,0). De cada buffer se tomaron 2,8 ml y se agregó 0,2 ml del veneno de *B. pictus* 2 mg/ml. Las muestras fueron colocadas a 20 °C, midiéndose la actividad enzimática desde 0 a 96 horas.

6. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA

6.1 Preparación de la muestra: Muestras de 50 mg del veneno liofilizado de *Bothrops pictus* se resuspendieron en 1 ml de buffer acetato de amonio 0,05M pH 6,0 y los restos insolubles se eliminaron por centrifugación a 4000 rpm por 20 minutos.

6.2 Cromatografía en Sephadex G-100: El sobrenadante obtenido, para cada corrida, fue aplicado a una columna de filtración de Sephadex G-100 (40 x 1,2 cm), utilizándose como buffer de elución acetato de amonio 0,05M pH 6,0. La corrida se realizó a 20 °C a un flujo de 7,81 ml/h; colectándose fracciones de 1 ml con ayuda de un colector automático Pharmacia-LKB y determinándose en ellas la concentración de proteína, así como la actividad enzimática de LAAO. Las fracciones con mayor actividad específica fueron reunidas en un pool.

6.3 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 (28 x 1,1 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 LAAO fueron reunidas para evaluar su pureza y su posterior caracterización.

7. EVALUACIÓN DE LA PUREZA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO PERFORMANCE (HPLC)

50 µl de la proteína (0,520 mg/ml), fueron inyectados a una columna de fase reversa Vydac C18 (4,6 X 250 mm), previamente activada con metanol. La cromatografía fue llevada a cabo en un equipo HPLC Marca HITACHI (Lab. Especializado de la Fac. de Ciencias Biológicas-UNMSM), con un detector variable de longitud de onda a 280 nm a temperatura ambiente. El rango de flujo fue constante a 1ml/min. El protocolo de elución fue: una gradiente lineal 28-60% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético por un período de 20 minutos, la

corrida fue completada por elución isocrática con 58% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético grado HPLC por 5 minutos.

8. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

8.1 Por cromatografía de filtración:

Se utilizó 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 de peso molecular conocido, 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).

8.2 Por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

Se realizó mediante el protocolo de Laemmli, 1970, en geles de poliacrilamida con SDS al 10% en el cual se aplicaron por separado 20 μ l de la proteína purificada con 10 μ l de buffer muestra en condiciones reductoras (2- mercaptoetanol) y no reductoras. Así mismo se emplearon los siguientes patrones de peso molecular (5 μ l): albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14,3 kDa). Cada una a una concentración de 2 mg/mL. La corrida fue realizada a un voltaje constante de 100 V durante una hora, en una cámara vertical marca Sigma. 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).

9. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA:

9.1 Termoestabilidad

El efecto de la temperatura sobre la enzima purificada fue evaluado preincubando alícuotas de 30 µl 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 LAAO con 30 µl de la muestra.

9.2 pH óptimo

Se determinó la actividad LAAO 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 9 y 10. La actividad enzimática fue dosada con 30 µl de la enzima y el sustrato se preparó al doble de la concentración.

9.3 Efecto de iones metálicos

Se probó el efecto sobre la actividad LAAO de los iones divalentes: 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 30 µl de la enzima (0,520 mg/m), previamente incubada 5 minutos con el ion respectivo.

9.4 Efecto de algunos inhibidores enzimáticos

Se evaluó el efecto de algunos inhibidores enzimáticos sobre la actividad L-aminoácido oxidasa, tales como el ácido iodoacético, 2-mercaptoetanol, ácido glutámico, etilen diamino tetra acético (EDTA), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) y glutatión a las concentraciones finales de 2,5, 5,0 y 10 mM. En cada caso, 30 µl del agente se preincubaron con 30 µl de la enzima (0,520 mg/ml) a 37 °C durante 10 minutos y luego se midió la actividad enzimática con 30 µl de la mezcla.

9.5 N-Deglicosilación de la L-aminoácido oxidasa

La deglicosilación de la enzima purificada se realizó utilizando 20 µl de la enzima purificada, la cual fue diluida en buffer de reacción (50 mM Tris HCl, pH 8.0) en un volumen final de 50µl, posteriormente se agregaron 2,5 µl de solución denaturante (SDS 2% y 2- mercaptoetanol 1M). La muestra se sometió a calentamiento por 5 minutos a 100 °C e inmediatamente se detuvo en frío. Se agregó 2.5 µl de solución detergente (IGEPAL® 15%) y por ultimo se añadió 2 µl de la enzima PNGasa F (N- glicosidasa F) de *Elizabethkingia meningsepticum* recombinante expresada en *Escherichia coli* de Sigma Chemical Co. La muestra se incubó a 37°C por 24 horas y la reacción fue detenida por calentamiento con buffer muestra para PAGE –SDS y posteriormente fue analizada por medio de electroforesis (Silva-Junior et al., 2007).

9.6 Determinación de carbohidratos asociados a la enzima

a) **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), modificado por Hurtado et al.(2007). La mezcla de reacción contenía 0,1 ó 0,2 ml del veneno de *Bothrops pictus* (10 mg/ml) o de la enzima purificada (0,520 mg/ml), alcalinizada con hidróxido de sodio 3N y 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

b) 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-dimetilaminobenzaldehido (reactivo de Ehrlich) para formar un compuesto coloreado que espectrofotométricamente se determina a 530 nm (Winzler, 1955), modificado por Hurtado et al. (2007).

La mezcla utilizada contenía 0,2 ó 0,4 ml del veneno crudo de *B. pictus* (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 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 en el espectrofotómetro 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.

c) 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), modificado por Hurtado et al. (2007).

La mezcla de reacción contenía: 0,1 ml del veneno crudo de *B. pictus* (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 y después 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 centrifugo a 3 000 rpm por 10 minutos, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 549 nm en un espectrofotómetro.

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

10. ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

10.1 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 para posteriores ensayos de agregación plaquetaria; 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 BpicLAAO (0,97 mg/ml) o del veneno crudo de *B. pictus* (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. Inmediatamente se centrifugó 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 espectrofotométricamente 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. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

10.2 Actividad edemática

Diferentes cantidades de LAAO (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). Cada ensayo fue realizado por triplicado.

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).

10.3 Actividad hemorrágica

Se ensayó según el método de Kondo et al. (1960), modificado por Lomonte et al. (1996). Para lo cual se inyectó veneno crudo de *B. pictus* 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. Cada ensayo fue realizado por triplicado. 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.

10.4 Ensayos de agregación plaquetaria

El plasma colectado en el ítem 10.1 fue separado para la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 200 g por 10 minutos y el plasma pobre en plaquetas (PPP) fue obtenido cogiendo 2 ml del PRP y centrifugado a 1500 g por 20 minutos para ser usado como blanco. El conteo final de plaquetas fue de $300 \times 10^6/\text{ml}$ en una cámara de Neubauer. El ensayo fue llevado a cabo por el método de Sakurai et al. (2001) en un agregómetro digital Qualitem con un software AgrePic, usando como control positivo de agregación 50 μl de adenosina difosfato (ADP) a una concentración final de 20 mM el cual produce 100% de agregación.

Para determinar la inducción de la agregación plaquetaria se utilizó el método de Sakurai et al. (2001), para lo cual se adicionó 50 μl de la proteína purificada a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tubos siliconados de 5 x 50 mm conteniendo entre 300-350 μl de PRP, preincubando 1 min a 37°C. Se corrió la reacción durante 5 min en el agregómetro y la agregación plaquetaria se obtuvo

tomando como estándar de agregación la inducida por ADP. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

10.5 Inhibición de la agregación de plaquetas

Se evaluó la capacidad inhibitoria de LAAO de *B. pictus* a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 40 µg/ml sobre una reacción inducida por ADP (20 mM). Tomando como base la agregación inducida por ADP (100%).

Así mismo se evaluó el efecto de la catalasa a concentraciones de 0,01, 0,05, y 0,1 mg/ml en presencia de LAAO (20 µg/ml). Cada ensayo fue realizado por triplicado.

Adicionalmente se calculo la IC₅₀ (Concentración a la cual se inhibe la agregación al 50%) obtenida al graficar la concentración (escala logarítmica) versus la agregación (escala en porcentaje) La IC₅₀ se determinó mediante un análisis de regresión lineal con los datos obtenidos.

10.6 Efecto antibacteriano

El efecto antibacteriano del veneno crudo de *B. pictus* y de la enzima purificada, fue probado sobre las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 95923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 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. pictus* 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 Müller Hinton.

El control positivo se hizo colocando 10 µl de tetraciclina (25 µg). Así mismo se hicieron pruebas con 10 y 20 µl de catalasa al 0,01% incubadas con 10 µl de LAAO (3, 6 y 12 µg), con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que demuestran mayor sensibilidad. Cada ensayo se realizó por triplicado.

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

11. ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO Y NEUTRALIZACIÓN CON SUERO ANTIBOTRÓPICO POLIVALENTE

11.1 Inmunodifusión e Inmunoelectroforesis

El veneno crudo y la enzima LAAO se analizaron por ambos ensayos. 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 (0,955 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 inmunoelectroforesis 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 (0,955 mg/ml) y 5 µl de veneno crudo de *B. pictus* (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).

11.2 Ensayo de neutralización

La capacidad del suero antibotrópico polivalente del INS para neutralizar *in vitro* la actividad de la L-aminoácido oxidasa, fue determinada preincubando a 37 °C por 30 minutos, alícuotas de 0,4 ml de veneno (1 mg/ml) ó 0,1 ml de la enzima purificada (0,955 mg/ml), más suero a media, una y dos dosis neutralizantes. Posteriormente se evaluó la actividad L-aminoácido oxidasa con 0,1 ml de la mezcla conteniendo veneno y para la enzima purificada con 50 µl (0,955 mg/ml). El control no contenía suero.

12. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

12.1 Extracción y purificación de RNA

Se realizó según la metodología de Jimenez et al., 2010 y Vivas et al., 2013. A partir de veneno fresco (500 µl) obtenido por presión manual de las glándulas venenosas de un ejemplar de *Bothrops pictus* mantenido en cautiverio en el serpentario Oswaldo Meneses (Museo de Historia Natural), esto con el objetivo de no sacrificar al animal. El RNA fue purificado empleando el kit comercial “High Pure RNA Isolation” (ROCHE®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

12.2 Síntesis de cDNA

El RNA resultante en el paso anterior, fue usado para su conversión a cDNA por medio de transcripción reversa empleando el kit comercial “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” (ROCHE®), colocando en un tubo de PCR en frío, 7 µl de RNA purificado, 1 µl de primer “anchored-oligo (dT)18”, 1 µl de primer “random

hexamero” y 4 µl de agua grado molecular. Se denaturó la mezcla calentando por 10 min a 65 °C, se detuvo la reacción por enfriamiento brusco; se continuó agregando 4 µl de buffer de reacción, 0,5 µl de inhibidores de RNAsa, 2 µl de deoxinucleótidos y 0,5 µl de transcriptasa reversa. Se incubó la mezcla por 10 min a 25 °C seguido de 60 min a 50 °C, se inactivó la transcriptasa reversa por calentamiento a 85 °C por 5 min y se colocó el tubo en frío para guardarlo a -25 °C para la posterior amplificación del gen de interés.

12.3 Diseño de cebadores

Se realizó de forma manual en base al alineamiento de las siguientes secuencias nucleotídicas de LAAO correspondientes a serpientes del género *Bothrops* y de la Familia Viperidae obtenidas del Gen Bank del NCBI: *Bothrops moojeni* (AY398692.1), *Bothrops neuwiedi pauloensis* (EU870608.1), *Bothrops jararacussu* (AY398691.1), *Lachesis muta* (JX171244.1) y *Agkistrodon blomhoffi* (AB072392.1). Las secuencias escogidas fueron descargadas en formato fasta (FAS) y el alineamiento de estas secuencias fue realizada con el uso del algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1997) del programa BIOEDITH v 7.0.4 (Hall, 1999) la edición final del alineamiento se realizó con el programa BOX SHADE v 3.21 (Hofmann et al. (1997) http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). La síntesis de cebadores fue encargada a la Casa Comercial Invitrogen Custom Primers.

12.4 Amplificación y secuenciamiento del gen BpicLAAO

La amplificación del gen correspondiente a BpicLAAO, se realizó mediante el uso del kit Master Mix P_Latinum[®], Taq DNA Polymerase (Invitrogen[™]). La mezcla de reacción contenía 22 µl del mix comercial, 1 µl de cebador forward, 1 µl de cebador reverse y 1 µl de cDNA.

Con el empleo de los primers previamente diseñados en el paso anterior, se realizaron los procesos de estandarización para determinar el programa de amplificación del gen de la proteína LAAO de *B. pictus*. El programa óptimo en un equipo Eppendorf Mastercycler, fue de una desnaturalización inicial a 95 °C por 5

minutos, seguido de una secuencia de 32 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 minutos, una hibridación a 54 °C por 30 segundos, una polimerización a 72 °C por 70 segundos y una incubación final de 72 °C por 7 minutos. En todos los casos se consideró controles negativos de la reacción de PCR sin añadir cDNA molde. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en una cámara horizontal Marca Cleaver, en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, previamente teñidos con 3 µl del colorante Gel Red Nucleic Acid y corridos a voltaje constante de 80 V por una hora. Posteriormente las bandas fueron visualizadas con luz UV, en un transiluminador Marca UVstar 312 nm-Biometra. La cuantificación del ADN obtenido se realizó por fluorimetría empleando el equipo Qubit fluorometer (Invitrogen™).

12.5 Secuenciación

La secuenciación de los productos amplificados fueron preparados para su envío a la casa comercial MACROGEN INC (Seúl - Corea del Sur) para su secuenciamiento respectivo empleado un equipo ABI 3730 XL con capacidad máxima de 12 Mb/día. Los cromatogramas resultantes fueron enviados por vía electrónica. Las secuencias fueron analizadas y editadas para su posterior análisis.

12.6 Análisis bioinformático de la proteína deducida

La secuencia nucleotídica obtenida fue analizada y editada mediante el redactor biológico BIOEDITH v 7.0.4. La identificación de la secuencia así como el análisis de semejanza con otras secuencias depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se realizó empleando el programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El análisis de los marcos de lectura abierta y la traducción de la secuencia nucleotídica fueron obtenidos mediante los programas ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y Translate Tool (<http://ca.expasy.org>). La preferencia de codón (Codon Usage) fue realizado mediante el programa on line SMS (http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html).

Al igual que la secuencia nucleotídica, la proteína deducida fue analizada tanto en identidad como en semejanza con otras secuencias de LAAO mediante el empleo del programa BLASTp. Todos los alineamientos tanto como la edición de estos fueron hechos con los programas Clustal X 1.8 y Box Shade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Asimismo la predicción de las propiedades bioquímicas de la proteína deducida fue realizada mediante el programa ProtParam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) y la determinación del péptido señal por el programa Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La presencia de dominios en la proteína fue realizada con los programas BLASTp y PIR (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pattern.shtml>). Los sitios potenciales de glicosilación fueron predichos con el software NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

12.7 Análisis filogenético

La secuencia de LAAO de *B. pictus* fue alineada con otras secuencias semejantes mediante Clustal W, el alineamiento fue editado con el programa BioEdit para luego inferir la filogenia usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), mediante el uso del programa MEGA 5. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de la matriz basada en JTT con la opción de delección completa y con un valor de test de Bootstrap de 2000 réplicas (Rodríguez et al., 2012).

12.8 Modelamiento de la proteína deducida

La secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA de BpicLAAO, fue modelada usando como molde la estructura cristalizada de la enzima LAAO de *Bothrops jararacussu* (BjussuLAAO PDB: 4E0V_B) empleando los programas, Modeller v 9.2 y Swiss Model. La visualización de la estructura tridimensional se hizo con los programas Pymol y Cn3D.

RESULTADOS

1. ENSAYO DE ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL pH.- La estabilidad de la enzima en el veneno total, 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 LAAO en el veneno de *Bothrops pictus* mantenida a diferentes valores de pH se muestra en la Tabla 1. Se observa que la enzima tuvo mayor estabilidad a pH 6,0. En tanto que a pH 8,0 y 9,0 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 a los pHs indicados. Asimismo 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 anulada. Nótese que la enzima fue estable a pH 5 y 6 por lo menos hasta las 96 horas.

Tabla 1. Estabilidad de BpicLAAO en el veneno total a diferentes tiempos y pH.

pH	% de la Actividad de L-Aminoácido Oxidasa		
	0 horas *	48 horas	96 horas
5	99,16	100,81	99,18
6	100,00	110,40	100,00
7	93,90	100,16	89,19
8	49,40	0,00	0,00
9	16,00	0,00	0,00

* Actividad inicial

2. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA.- Al pasar el veneno crudo de *B. pictus* por una columna de Sephadex G-100 (40 x 1,2 cm), se obtuvo un perfil cromatográfico en el que se pueden observar tres picos de proteína,

encontrándose la actividad de LAAO en el primer pico (Figura 3), lo que representa un 6,41% del total de proteína, siendo la enzima purificada 10,19 veces con un rendimiento del 63,39 %. Las fracciones que presentaron actividad enzimática fueron juntas y concentradas para el siguiente paso de purificación.

Cuando la fracción que contiene la actividad de LAAO se aplicó a una columna de CM-Sephadex C-50 (28 x 1,1 cm), se observaron dos picos de proteína eluidos directamente con el buffer de elución a pH 6,0 y luego se eluyó un pico al utilizar el buffer de elución conteniendo NaCl 0,6 M (Figura 4). La actividad LAAO estuvo concentrada en el primer pico de proteína eluido sin cloruro de sodio; representando el 0,834% del total de proteína, con un factor de purificación de 22,02 y un rendimiento del 18,37 % (Tabla 2).

Tabla 2. Purificación de la BpicLAAO “Jergón de costa”

	Proteína		AE (Unid/mg)	UTA	Rendimiento (%)	Purificación
	mg	%				
Veneno total	45,66	100,00	0,193	8,813	100,0	1,00
Sephadex G-100	2,93	6,41	1,967	5,760	63,39	10,19
CM-Sephadex C-50	0,381	0,834	4,25	1,619	18,37	22,02

AE : Actividad específica

UTA : Unidades totales de actividad.

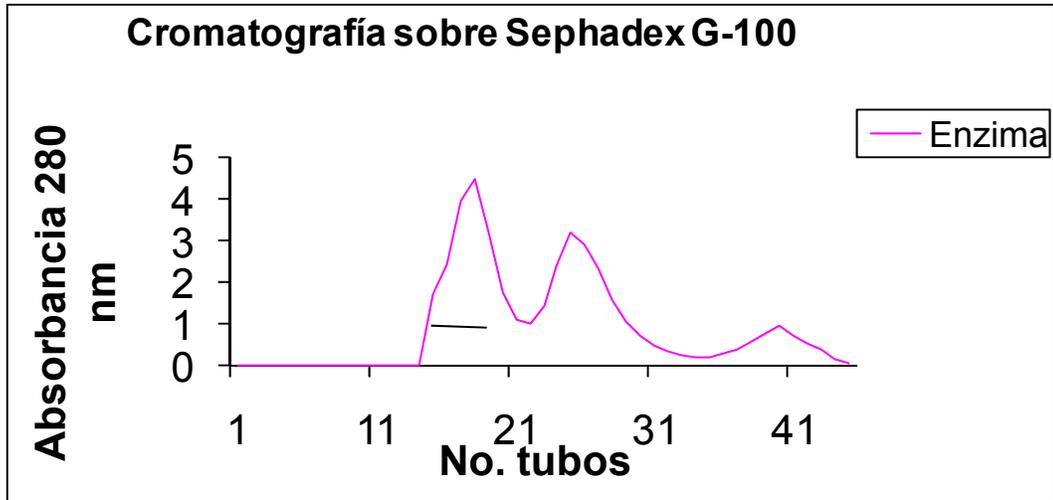


Figura 3. Purificación de BpicLAAO sobre Sephadex G-100. Las condiciones cromatográficas fueron: tamaño de la columna (40 x 1,2 cm), flujo de 7,81 ml/h, eluente buffer acetato de amonio 0,05M pH 6. Se colectaron fracciones de 1 ml.

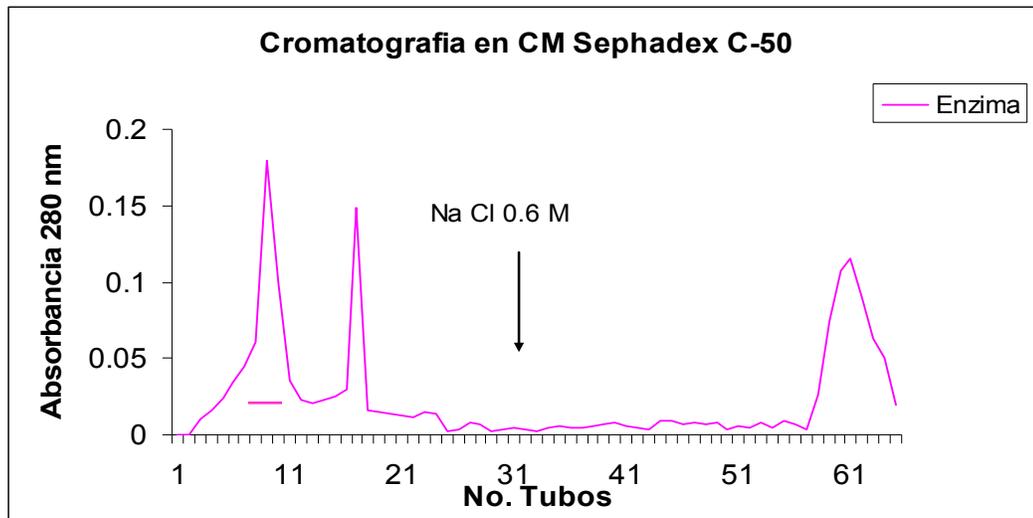


Figura 4. Purificación de la BpicLAAO sobre CM Sephadex C-50. Las condiciones cromatográficas fueron: tamaño de la columna (28 X 1,1 cm), flujo de 17 ml/h, eluente buffer acetato de amonio 0,05M pH 6. Se colectaron fracciones de 1 ml .

3. EVALUACIÓN DE LA PUREZA .- La fracción que contiene actividad de

LAAO, resultante de los dos pasos de purificación fueron evaluados por HPLC mostrándose un solo pico proteico (Figura 5) Asimismo se evaluó mediante PAGE SDS en condiciones no reductoras la enzima purificada correspondiendo a una única banda homogénea (Figura 6).

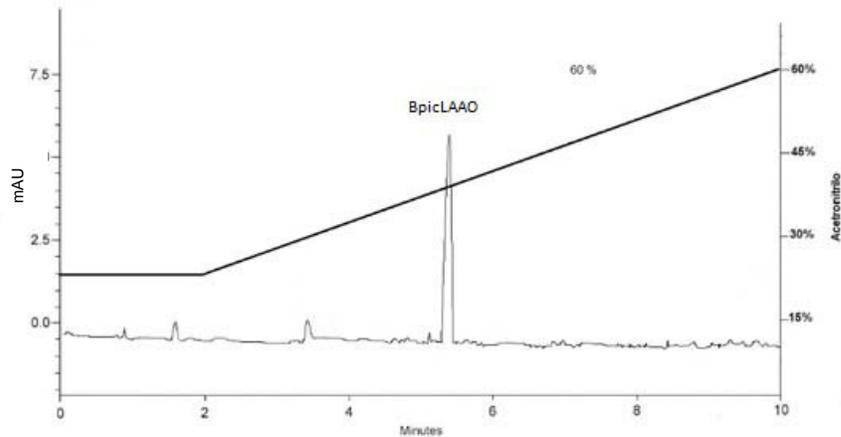


Figura 5. Análisis de pureza por RP-HPLC de BpicLAAO sobre una columna C18

1 2 3

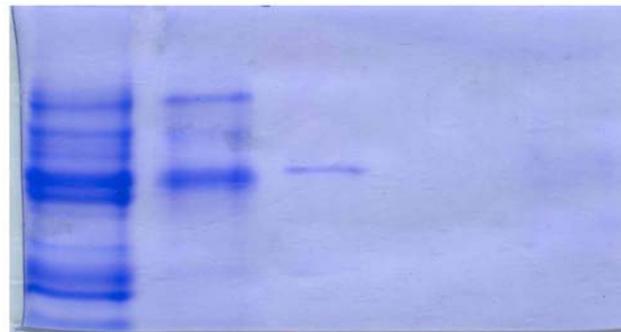


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los pasos para purificar la BpicLAAO:
1. Veneno total 2. Primer paso en Sephadex G-100 3. Segundo paso en
CM Sephadex C- 50 (enzima purificada).

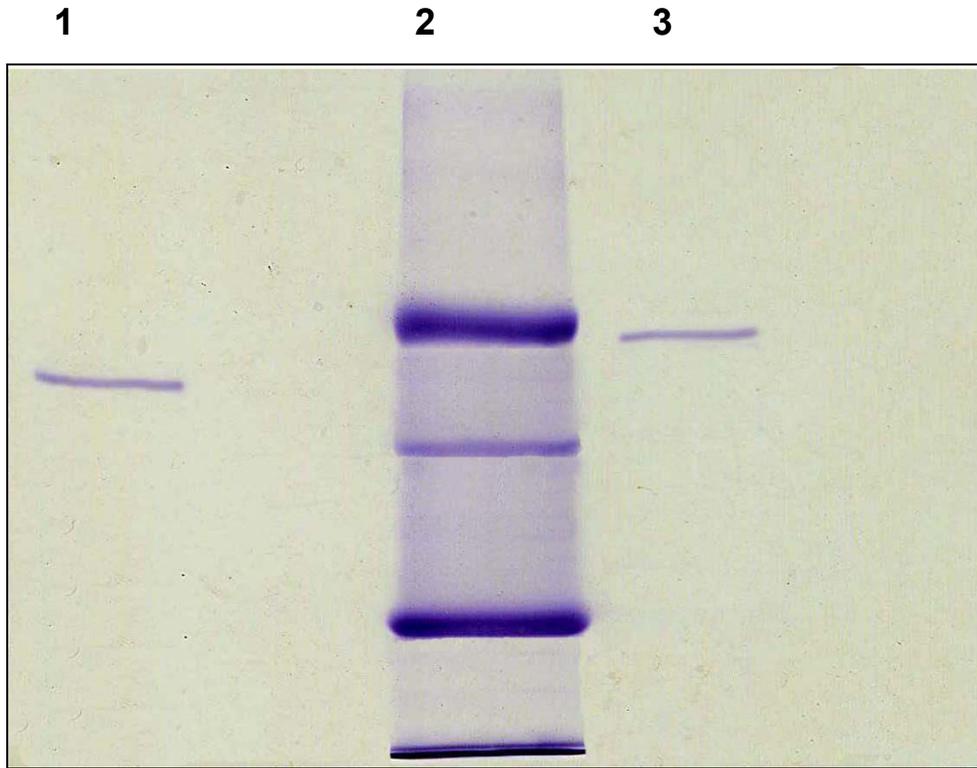


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de BpicLAAO: 1. Enzima no reducida (58.60 kDa) 2. Estándar de pesos moleculares: Albúmina sérica bovina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y Lisozima (14,3kDa) 3. Enzima reducida (65,25 kDa).

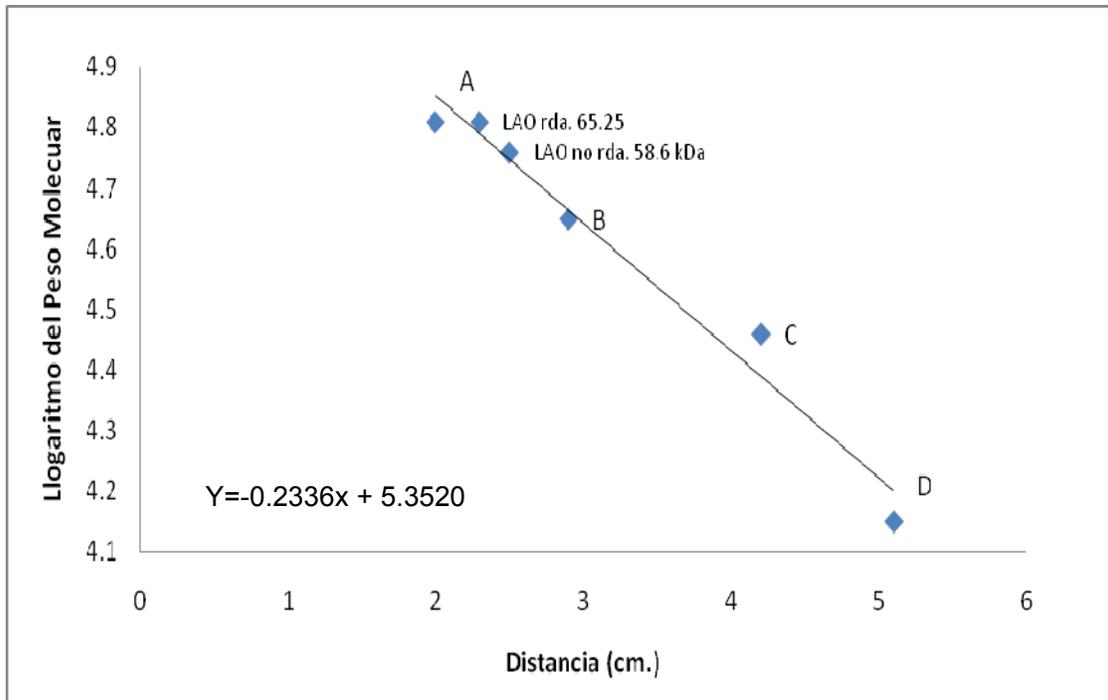


Figura 8. Determinación del peso molecular de BpicLAAO por electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-SDS , usando proteínas de peso molecular conocidos: Albúmina sérica bovina 66 kDa (A), ovoalbúmina 45 kDa (B), anhidrasa carbónica 29 kDa (C) y lisozima 14,3 kDa (D).

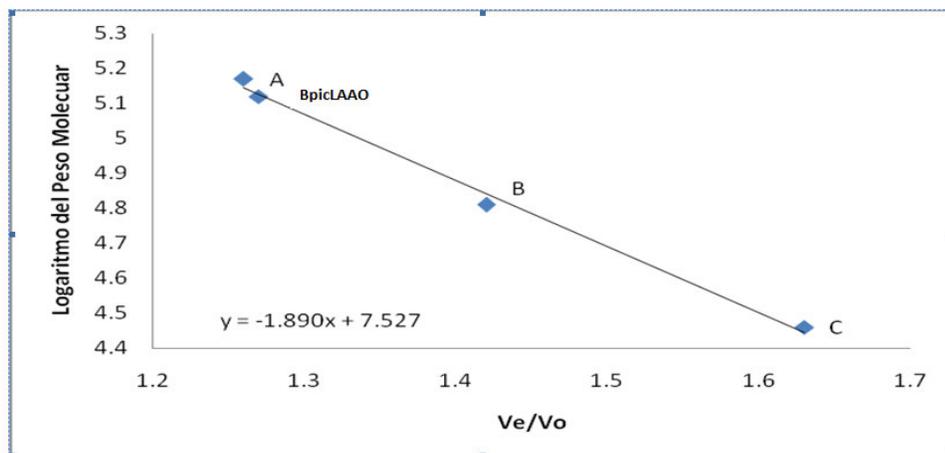


Figura 9. Determinación del peso molecular de BpicLAAO por cromatografía en Sephacryl S-200. El peso de LAAO fue de 132,27 kDa calculado por comparación con una curva estándar de alcohol deshidrogenasa de 150 kDa (A), albúmina bovina 66 kDa (B) y anhidrasa carbónica 29 kDa (C)

4. 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 BpicLAAO es una proteína de alto peso molecular y dimérica y que esta formada por dos cadenas polipeptídicas iguales con un peso de 65,25 kDa cada una, en condiciones reductoras y de 58,60 kDa sin el agente reductor (Figuras 7 y 8). Adicionalmente al calcular el peso molecular por cromatografía de filtración se obtuvo un valor de 132,27 kDa (Figura 9).

5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

5.1 TERMOESTABILIDAD.- Se observa en la figura 10, que la enzima es termoestable hasta los 55 °C, reduciendo su actividad a 54,76% cuando es tratada a temperatura de 65 °C. Cuando el tratamiento térmico es de 75 °C la actividad se anuló totalmente.

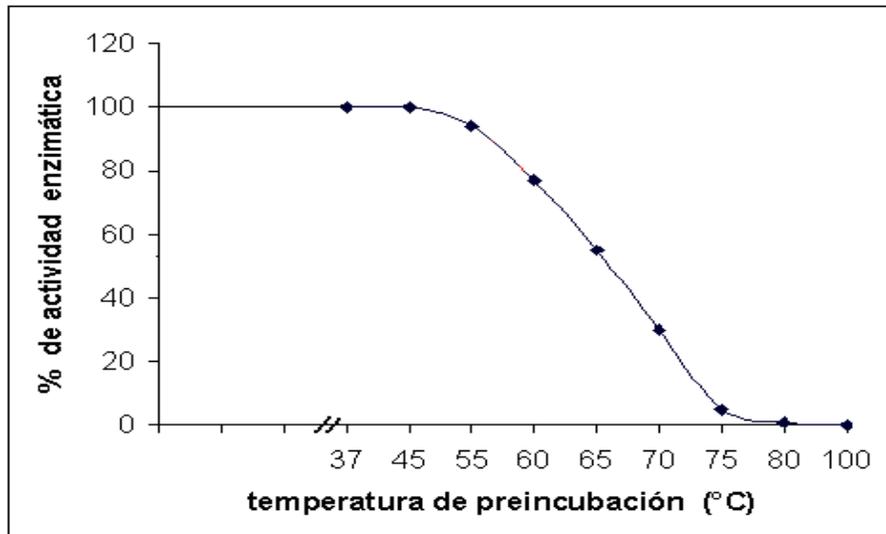


Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad de BpicLAAO.

5.2 pH ÓPTIMO.- Por el método descrito en el Worthington Enzyme Manual (1993), se demostró que el pH óptimo para la actividad LAAO fue de 8,5, usando L- leucina como sustrato; obteniéndose un pH óptimo de 8,5 (Figura 11).

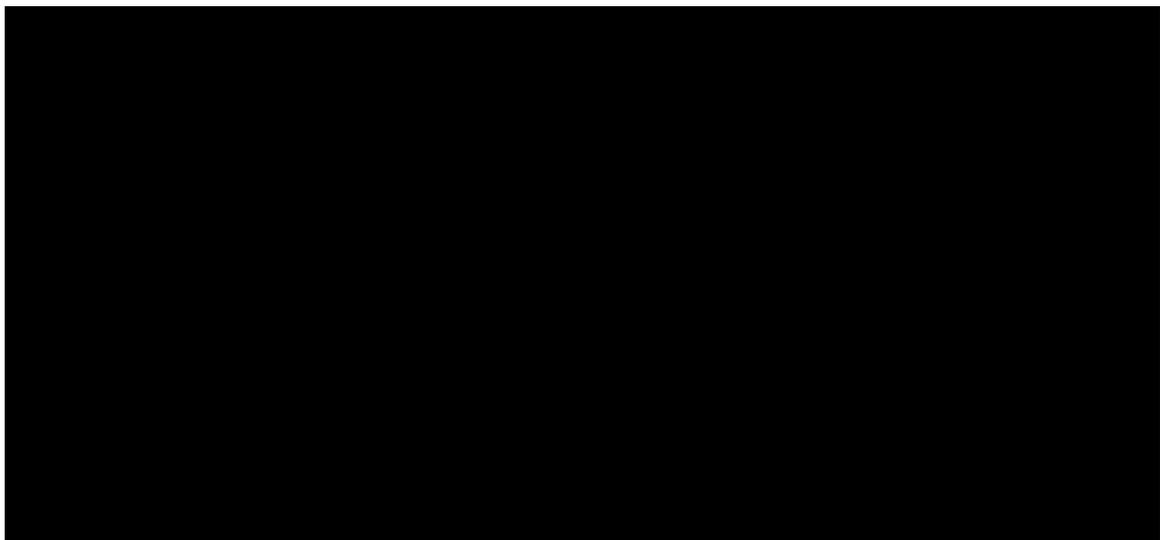


Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad de BpicLAAO, usando L-leucina como sustrato.

5.3 EFECTO DE IONES METÁLICOS.- Los ensayos efectuados mostraron que la adición de Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} no modificaron significativamente la actividad de la enzima, sin embargo el ion Zn^{2+} inhibió a la enzima de una manera dependiente de la concentración, ocasionando una anulación total de la actividad enzimática al usarse en solución 6 mM de Zn^{2+} (Tabla 3)

Tabla 3. Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad de BpicLAAO.

Agente	Concentración (mM)	Actividad enzimática (%)
Control	0,00	100,0
Ca^{2+}	0,75	102,9
	1,50	99,6
	3,00	87,8
	6,00	85,8
Mg^{2+}	0,75	100,0
	1,50	99,5
	3,00	86,8
	6,00	82,6
Mn^{2+}	0,75	103,8
	1,50	95,6
	3,00	92,6
	6,00	90,0
Zn^{2+}	0,75	63,8
	1,50	60,4
	3,00	44,7
	6,00	0,0

5.4 EFECTO DE ALGUNOS INHIBIDORES ENZIMATICOS.- De los inhibidores enzimáticos ensayados, el glutatión y el β -mercaptoetanol mostraron un marcado efecto inhibitorio, mientras que iodoacetato y PMSF 5mM tuvieron un ligero efecto en la actividad enzimática (Tabla 4).

Tabla 4. Acción de algunos inhibidores enzimáticos sobre la actividad de BpicLAAO

Agente	Concentración (mM)	Actividad enzimática (%)
Control	0,0	100,0
Glutation	2,5	44,5
	5,0	24,9
	10,0	18,0
PMSF	2,5	90,3
	5,0	85,4
	10,0	60,0
2-Mercaptoetanol	2,5	35,0
	5,0	17,5
	10,0	0,0
EDTA	2,5	104,2
	5,0	102,3
	10,0	100,1
Ácido glutámico	2,5	100,5
	5,0	90,7
	10,0	87,5
Iodo Acetato	2,5	82,8
	5,0	76,2
	10,0	50,9

5.5 DETERMINACION DE GLICOSILACION La enzima demostró ser una glicoproteína, que presentó mayor movilidad electroforética luego de haber sido tratada con la PNGasa F, el peso molecular de la proteína deglicosilada fue de 47 KDa a diferencia de la proteína nativa cuyo peso original fue de 58,6 KDa dando un porcentaje en masa de carbohidratos de 18,73 %. (Figura 12); de mostrándose un patrón de glicosilación del tipo N-linked.

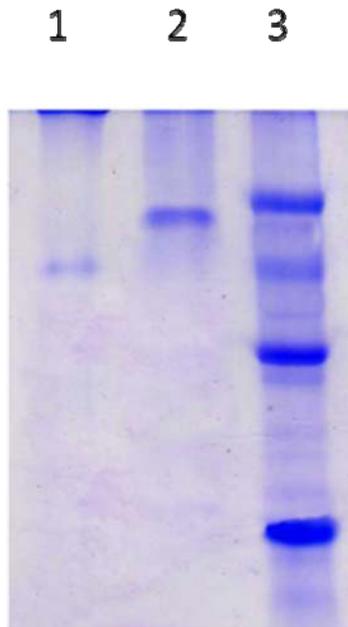


Figura 12. Determinación de carbohidratos totales por electroforesis en PAGE.SDS por deglicosilación con PNGasa F.

(1) Proteína deglicosilada (2) Proteína nativa (3) Marcadores de peso molecular: 66, 45, 29 y 14,3 kDa

5.6 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS ASOCIADOS

Inicialmente por el método de Lowry se determinó que el veneno total de *B. pictus* contiene un 73 % de proteína y la enzima BpicLAAO de 77,6%. La presencia de carbohidratos para el veneno crudo se encontró 1,81 % de hexosas, 0,64 % de hexosaminas y 0,28 % de ácidos siálicos; es decir un total de 2,73 % de carbohidratos asociados. En cambio la enzima purificada registró 15,6% de hexosas, 2,42 % de hexosaminas y 0,73 % de ácidos siálicos, con un total de 18,75 % de carbohidratos asociados, confirmando que se trata de una glicoproteína (Tabla 5).

Tabla 5. Carbohidratos asociados al veneno y a BpicLAAO.

Componente	%	
	Veneno crudo	L-Aminoácido Oxidasa
Proteína	73	77,6
Hexosa	1,81	15,6
Hexosamina	0,64	2,42
Ácidos siálicos	0,28	0,73
Total de carbohidratos asociados	2,73	18,75

6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

6.1 Actividad hemolítica: El veneno crudo mostró poca actividad hemolítica, obteniéndose el valor de 37,2% de hemoglobina liberada en 0,1 ml de glóbulos rojos . BpicLAAO no presentó esta actividad (Figura 13).

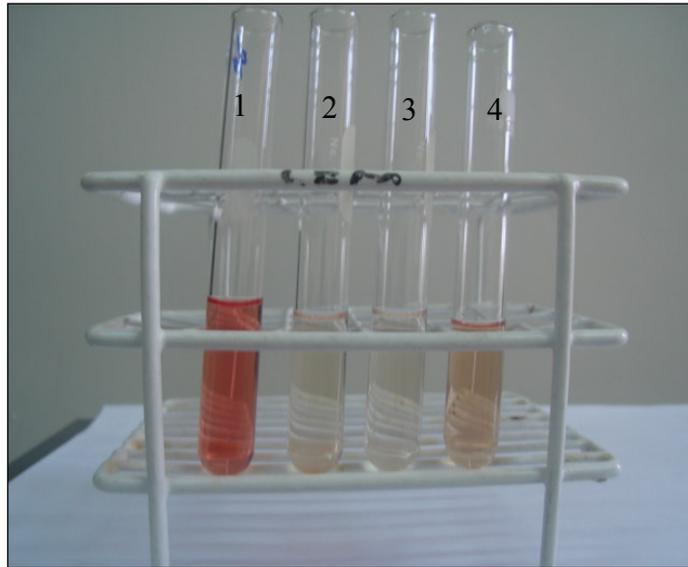


Figura 13. Actividad hemolítica del veneno crudo y BpicLAAO : 1) Hemólisis de glóbulos rojos con agua destilada (100%) 2) Hemólisis de BpicLAAO (100 μ g) 3) Hemólisis de BpicLAAO (200 μ g) 4) Hemólisis del veneno crudo (100 μ g).

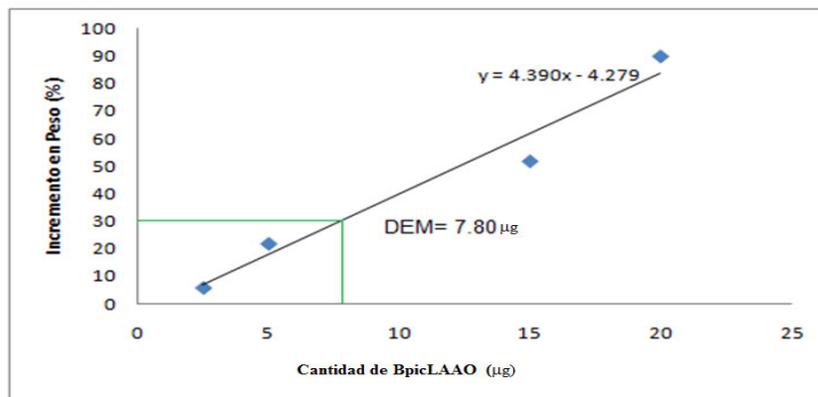
6.2 Actividad edemática: La enzima purificada del veneno de *B. pictus* fue capaz de inducir edema en el cojinete plantar de ratones albinos. Los incrementos en peso obtenidos con 2,5, 5, 10, 15 y 20 μ g fueron 5,8, 21,8, 31,7, 51,8 y 89,9% respectivamente, determinándose una DEM de 7,80 μ g de proteína (Figuras 14 y 15).



1 Control

2 Actividad de LAO (20 µg)

Figura 14. Formación de edema por acción de BpicLAAO.



DEM : Dosis edemática mínima .

Figura 15. Efecto edemático de BpicLAAO

6.3 Actividad hemorrágica: La enzima purificada presentó severa actividad hemorrágica a concentraciones de 2,5, 5 , 10 y 20 µg. El veneno crudo también presentó esta actividad la cual no fue cuantificada. El control

se hizo aplicando solución salina (100 μ l de una concentración 1 mg/ml) (Figuras 16 y 17). La DMH fue de 2,79 μ g de proteína purificada



1. Actividad de LAAO (15 μ g). 2. Solución salina (control)

Figura 16 Actividad hemorrágica de BpicLAAO.

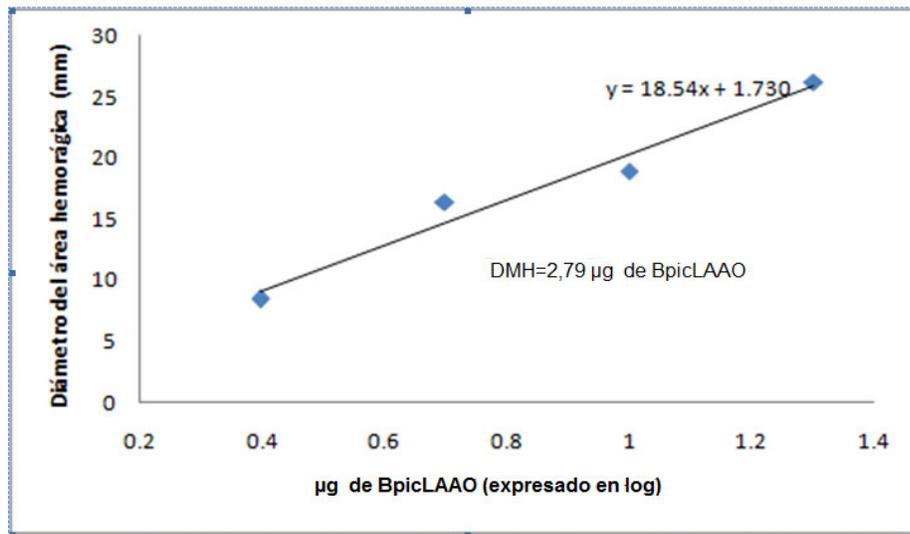


Figura 17. Efecto hemorrágico de BpicLAAO.

6.4 Agregación plaquetaria: BpicLAAO no induce la agregación plaquetaria a concentraciones de 1 a 40 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo inhibe la agregación plaquetaria del plasma rico en plaquetas inducida por ADP de una manera dosis dependiente (Figura 18). La figura 20 muestra la disminución de la agregación plaquetaria por BpicLAAO, la cual fue restaurada por adición de catalasa 0,01 a 0,1 mg/ml .

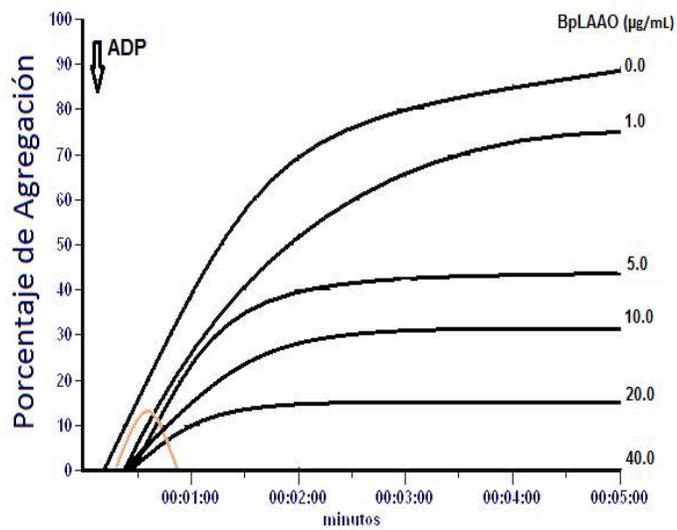


Figura 18. Efecto de BpicLAAO sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP. La mezcla de reacción contenía 450 μl de PRP y 50 μl de ADP (200 $\mu\text{g/ml}$), la cual fue medida en un agregómetro a 37 $^{\circ}\text{C}$

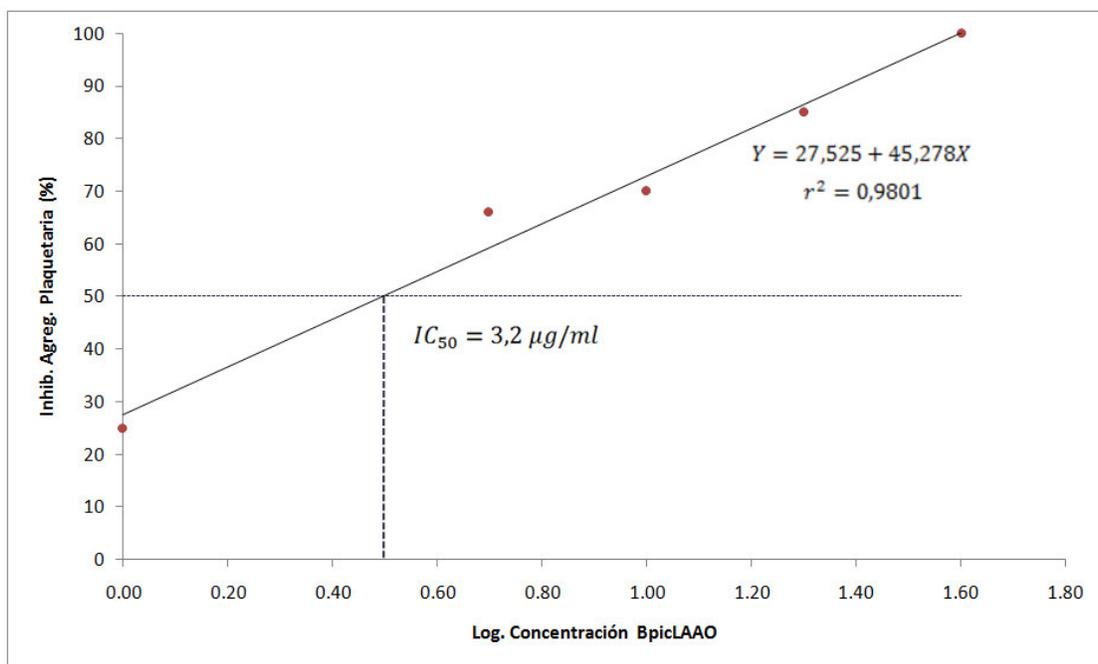


Figura 19. Porcentaje de inhibición de BpicLAAO sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP, obteniendo una IC_{50} de 3,2 $\mu\text{g/ml}$.

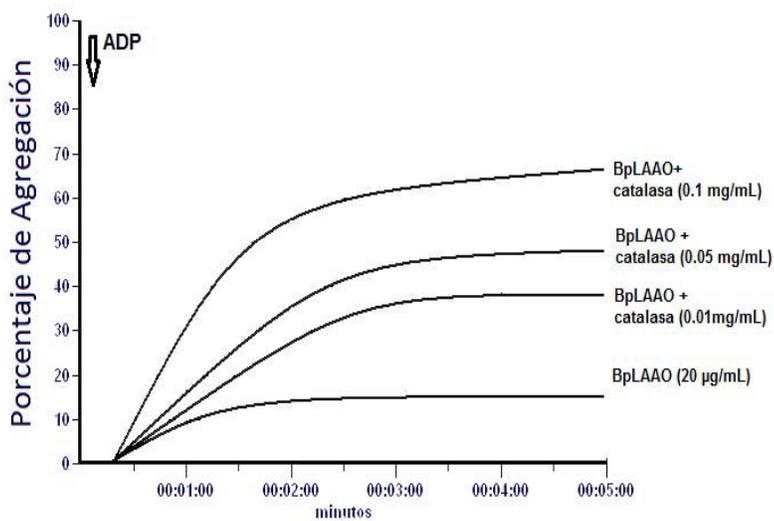


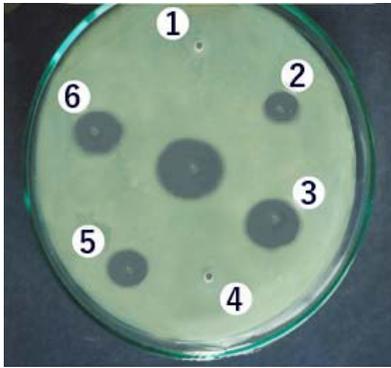
Figura 20. Efecto de la catalasa sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP en presencia de BpicLAAO. El efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria por BpicLAAO (20 $\mu\text{g/ml}$) fue suprimido por adición de catalasa (0,01 a 0,1 mg/ml).

10.5 Actividad antibacteriana: El efecto antibacteriano del veneno crudo de *B. pictus*, así como de la enzima purificada se visualizó claramente por el método de cilindro en placa, en donde se evidencia la formación de halos de inhibición alrededor de la zona de crecimiento bacteriano (Tabla 6) Figura 21; observándose halos de inhibición aunque con variaciones en la susceptibilidad de las diferentes especies. Las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 95923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 fueron más sensibles a la acción del veneno y de la enzima LAAO, siendo el diámetro de la zona de inhibición de 19, 16 y 16 mm respectivamente con 50 µg de veneno y de 19, 20 y 19 mm respectivamente con 12 µg de enzima purificada. En cambio *Escherichia coli* ATCC 25922, bacteria Gram negativa mostró halos de inhibición que indicaban poca sensibilidad al veneno y a la proteína en estudio.

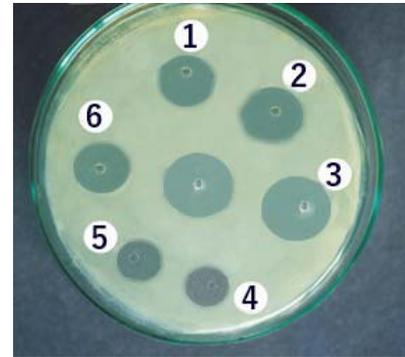
No se observó halos de inhibición de crecimiento bacteriano cuando se incubó 10 µl de LAAO (3, 6 y 12 µg) con 10 y 20 µl de peroxidasa 0,01% con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 22). También se observó el efecto de la tetraciclina a concentraciones de 0,75, 1,5, 3, 6,12 y 25 µg sobre las cepas *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Tabla 7).

Tabla N° 6. Efecto antibacteriano del veneno crudo y de BpicLAAO, por el método de cilindro en placa.

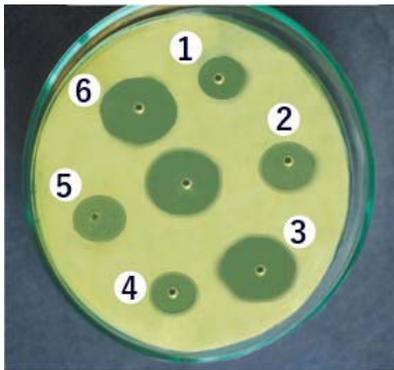
Muestra (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>E. coli</i>
LAAO					
3	12	16	12	10	0
6	15	17	17	12	9
12	19	20	19	18	15
V. crudo					
10	12	10	12	9	0
25	14	13	14	11	10
50	19	16	16	15	13



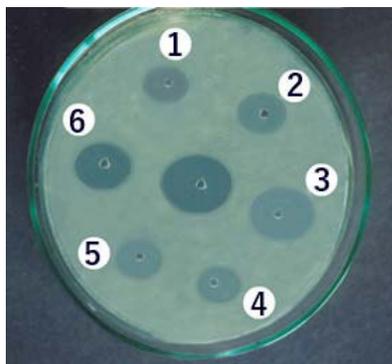
Escherichia coli



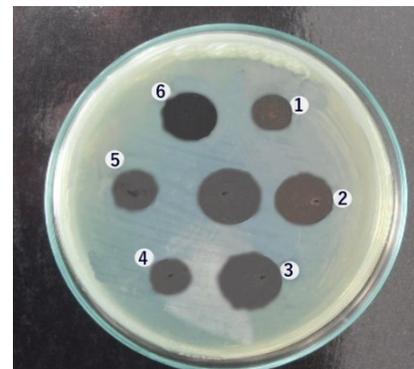
Enterococcus faecalis



Staphylococcus aureus



Vibrio cholerae



Pseudomona aeruginosa

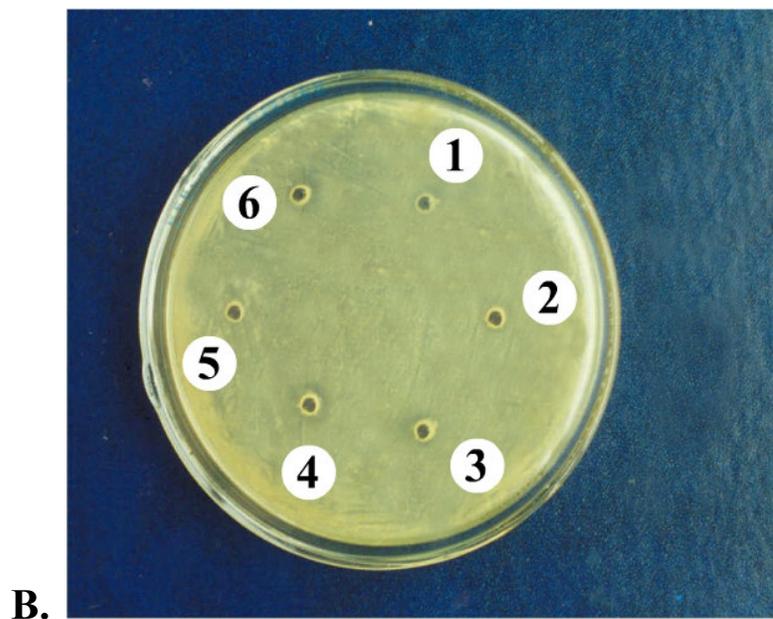
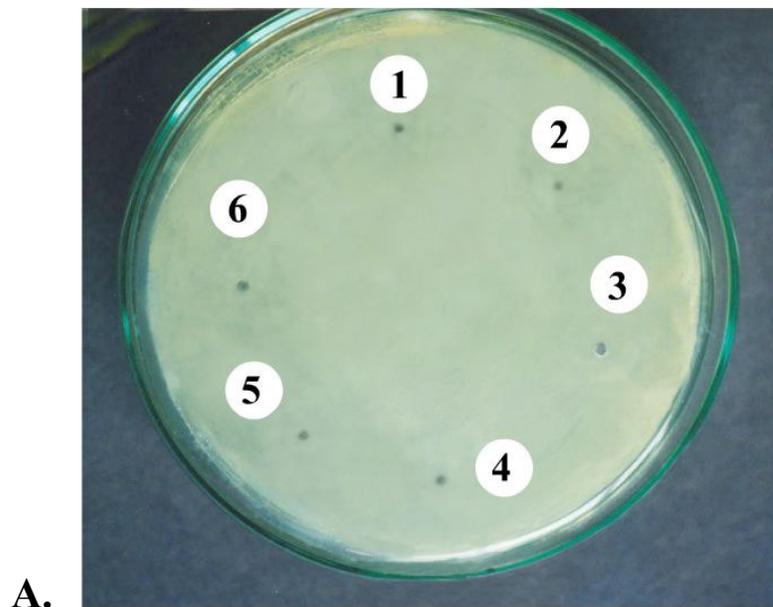
L-aminoácido oxidase (µg)

- 1) 3
- 2) 6
- 3) 12

Veneno Crudo (µg)

- 4) 10
- 5) 25
- 6) 50

Figura 21. Efecto inhibitor del veneno crudo y de BpicLAAO 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%

Figura No. 22. Efecto de BpicLAO sobre *Staphylococcus aureus* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B) en presencia de peroxidasa de rabanito.

Tabla 7. Efecto de la tetraciclina sobre las cepas *S. aureus* y *V. cholerae*

Tetraciclina (μg)	Halo de Inhibición (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>V. cholerae</i>
0,75	7	7
1,5	12	9
3	14	11
6	15	20
12	24	22
25	25	24

10.6 RECONOCIMIENTO Y NEUTRALIZACIÓN DE LA PROTEINA POR EL SUERO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE

Los ensayos de reconocimiento (antigenicidad) fueron realizadas mediante las pruebas de inmunodifusión e inmunolectroforesis, las cuales mostraron una sola línea o arco de precipitación al enfrentar BpicLAAO con el antiveneno botrópico, demostrándose la antigenicidad de la enzima. (Figura 23). Asimismo, el veneno total en ambos ensayos reveló la presencia de varios componentes antigénicos correspondientes a los arcos de precipitación observados. Esta prueba se presenta también, como un criterio más de pureza de la enzima.

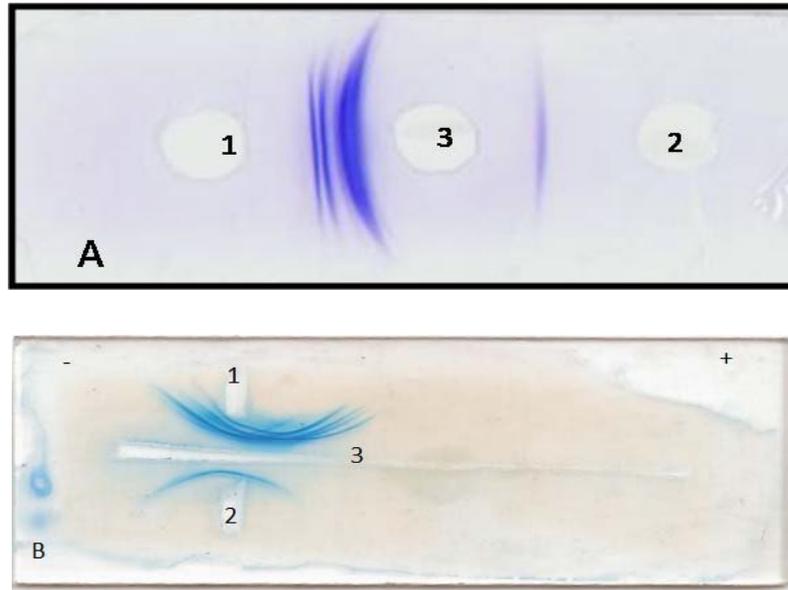


Figura 23. Inmunodifusión (A) e Inmunonelectroforesis (B). (1) Veneno crudo (2) Enzima BpicLAAO. En ambos casos el veneno crudo formó varias bandas de proteína con el suero antibotrópico (3) mientras que BpicLAAO originó una sola banda de proteína.

Por otro lado la capacidad del suero antibotrópico polivalente para neutralizar in vitro la actividad de LAAO en el veneno total , se evidenció usando en los preincubados veneno- antiveneno a $\frac{1}{2}$, 1 y 2 dosis neutralizantes siendo inhibida 0, 90 y 100 % respectivamente (Figura 24 A). Por otro lado el suero neutralizó la actividad de BpicLAAO en un 27, 96 y 98 % con $\frac{1}{2}$, 1 y 2 dosis neutralizantes respectivamente (Figura 24 B).

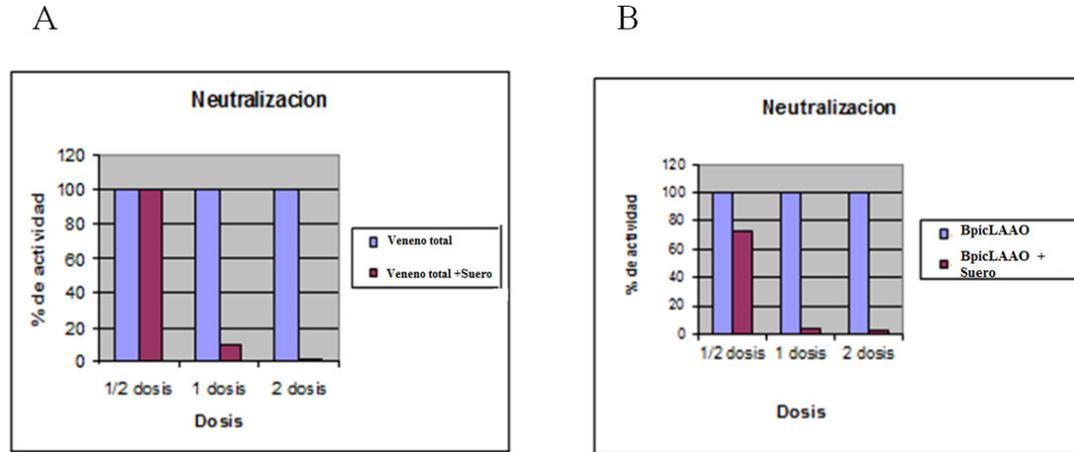


Figura 24. Capacidad neutralizante de la actividad L-aminoácido oxidasa en el veneno total (A) y de la enzima purificada (B) por el suero antitoxico polivalente –INS.

11. ANÁLISIS MOLECULAR

11.1 Síntesis de cDNA y amplificación del gen BpicLAO del veneno de *Bothrops pictus*

A partir de 500 µl de veneno fresco obtenido de un ejemplar de la serpiente *Bothrops pictus* se procedió a aislar RNA total. Del cual se sintetizó el cDNA mediante RT-PCR, a una concentración de 25 ng/ml de cDNA, el cual fue utilizado para amplificar el gen de la L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops pictus* (BpicLAO).

Utilizando los primers específicos previamente diseñados:

F: 5'-GCAGATGACCGAAACCCCTTAGAGGT-3' y

R: 5'-GCCCTGACTTAATTGTGCTTGTCATCCAAC-3', se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 1494 pb como se muestra en la Figura 25.

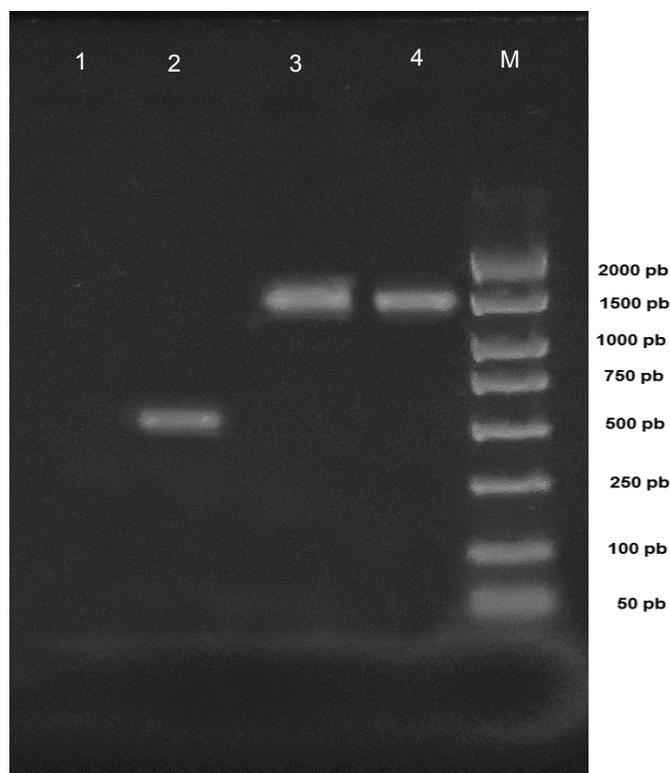


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del cDNA que codifica BpicLAAO. Carril 1: control negativo; carril 2: control positivo Citocromo B; carril 3 y 4: amplificación de BpicLAAO; carril M: marcadores de tamaño.

11.2 Secuencia nucleotídica de BpicLAAO

El secuenciamiento realizado al producto de PCR obtenido dio una secuencia nucleotídica de 1494 pb, la cual fue analizada para su edición y posterior depósito en la base de datos del GenBank del NCBI (Accesión: KJ094993). La secuencia fue evaluada por el algoritmo BLASTn (NCBI) para determinar su homología con otras secuencias almacenadas en la base de datos. La BpicLAAO, mostró una alta homología con secuencias codificantes para SVLAAOs (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencias homólogas a la secuencia nucleotídica de BpicLAAO con E value = 0.0.

Especie	Código de Acceso GenBank	Descripción según GenBank	Cobertura de secuencia	Homología
<i>Bothrops moojeni</i>	AY398692.1	mRNA de L-amino oxidasa	94%	98%
<i>Bothrops pauloensis</i>	EU870608.1	mRNA del precursor de L-amino ácido oxidasa.	99%	97%
<i>Bothrops jararacussu</i>	AY398691.1	mRNA de la L-amino ácido oxidasa	97%	97%
<i>Lachesis muta</i>	JX171244.1	mRNA de la L-amino ácido oxidasa (LAAO)	99%	93%
<i>Agkistrodon blomhoffii</i>	AB072392.1	mRNA para M-LAO	99%	93%

11.3 Deducción de la Secuencia aminoacídica de BpicLAAO.

Al ser evaluada por el algoritmo BLASTp, la secuencia de aminoácidos mostró una alta homología con las enzimas del grupo de amino oxidasas, específicamente con L-aminoácidos oxidasas de venenos ofídicos, siendo la LAAO de *B. pauloensis* la que posee mayor semejanza (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencias homólogas a la secuencia de aminoácidos de BpicLAAO

Especie	Código de Acceso GenBank	E Value	Cobertura de secuencia	Homología
<i>Bothrops pauloensis</i>	B5AR80.1	0.0	99%	94%
<i>Bothrops jararacussu</i>	Q6TGQ9.1	0.0	97%	95%
<i>Bothrops moojenii</i>	Q6TGQ8.1	0.0	94%	97%
<i>Bothrops flavoviridis</i>	BAN82013.1	0.0	99%	87%
<i>Lachesis muta</i>	AFP89360.1	0.0	99%	87%

El alineamiento múltiple de las estructuras primarias de las LAAOs, mostró que LAAO de *B. pictus* posee 95% de identidad con *B. jararacussu*, 94% con *B.*

pauloensis, 97 % con *B. moojeni* y 87% con *L. muta*, obtenido mediante el Programa MEGA.

La secuencia de aminoácidos correspondiente a la enzima de interés fue deducida por el análisis de Expressed Sequence Tags, ESTs, traducidos tanto con el programa ORF Finder como por Translate tool, resultando en ambos casos una secuencia de 498 aminoácidos.

```

tctctctgttttcttggtgcggtgggaagctgtgcagatgacagaaacccctagaggaa
S L C F L G C V G S C A D D R N P L E E
tgcttccgagaaactgactatgaggaatttctagagatcgccaaaatggctgagcacg
C F R E T D Y E E F L E I A K N G L S T
acatcaaacccgaaacgtgttgatcgtaggtgcaggaatgtctgggcttagtgacgca
T S N P K R V V I V G A G M S G L S A A
tatgttcttgc aaatgctggacatcaggtgacagttcttgaagccagtgaacctgcagga
Y V L A N A G H Q V T V L E A S E R A G
ggacgagtgaagacttatcgaaatgagaaagaaggctggtatgccaatctcgggcccatg
G R V K T Y R N E K E G W Y A N L G P M
cgtttacctgaaaaacacaggattgtccgggaat atacaaaagtgttgatctcggttg
R L P E K H R I V R E Y I K K F D L R L
aatgaattttctcaggaatgagaatgcctggatattttctccaaaacatcaagaagaa
N E F S Q E N E N A W Y F L Q N I K K R
gtacgggaagtcaataaagaccctggcgttttggaatcccggtgaagcctcagaagta
V R E V N K D P G V L E Y P V K P S E V
ggcaaaagtgtggacagttatgaagagtcctccgaaaggctgagaagaattaaga
G K S A G Q L Y E E S L R K A V E E L R
aggactaacctgcagctacatgctaaataaatatgacacctattcaactaaggagtatcta
R T N C S Y M L N K Y D T Y S T K E Y L
cttaaaagggaatttgagtcgggagctgtagatgattggagacttaactgaatgaa
L K E G N L S P G A V D M I G D L L N E
gattctggctattatgtgtctttattgaaagcctgaaacatgatgatattcttgcttat
D S G Y Y V S F I E S L K H D D I F A Y
gaaaaaagatttgatgaaattgttggtggaatggataagttgccacatccatgatcaa
E K R F D E I V G G M D K L P T S M Y Q
gccattcaagaaaagggtgcatttgaatgcccgagtaatcgagatacagcaggatgccaag
A I Q E K V H L N A R V I E I Q Q D V K
gaagtacagtgacatataaacctcaaaaaggagacgtttatctgtgacagctgattat
E V T V T Y Q T S Q K E T L S V T A D Y
gtcattgtatgactacgtcgagggccgcccgtcgcatcacgtttgaaccacccctccg
V I V C T T S R A A R R I T F E P P L P
cccaagaaaagccatgctttgctgtctgtccactacagaagtgccaccaagatcttctc
P K K A H A L L S V H Y R S G T K I F L
acttgactaagaattttggaggatgatggcattcatgggtgggaagtccacaactgat
T C T K K F W E D D G I H G G K S T T D
cttccatcccgaattcatctactaccctaaccataactttcctaatggagttggggttatt
L P S R F I Y Y P N H N F P N G V G V I
atagcctatggcattggtgatgatgccaattactttcaagctcttgatttcgaggactgt
I A Y G I G D D A N Y F Q A L D F E D C
ggtgatattgtcattaatgacctttcattgatccatcagctgcccaaggaagatccaa
G D I V I N D L S L I H Q L P K E E I Q
gccatctgtcctcaatgattcaagatggagcctggataattatgctatgggtggt
A I C R P S M I Q R W S L D N Y A M G G
ataaccaccttcaactaccactttcaacattttagtgaaagcgtcactgcacctgta
I T T F T P Y H F Q H F S E A L T A P V
gacagaatctactttgaggggagtatacagccaagctcatggttgattgacagcaca
D R I Y F A G E Y T A Q A H G W I D S T
attaagtcaaggctgagagcagcaacagatgtgaaccgggcttcagaaaataaa
I K S G L R A A T D V N R A S E N K

```

Figura 26. Secuencia de amino ácidos correspondiente a la enzima L-amino ácido oxidasa deducida del cDNA a partir del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus*. El péptido señal deducido se encuentra subrayado y lo resaltado en amarillo muestran los motivos de N-glicosilación, sólo la secuencia NCS alcanzó el potencial para ser glicosilada (0,6158 vs 0,1856, mediante el programa NetGlyc). La secuencia nucleotídica para la proteína madura: Accesoión GenBank KJO94993 y secuencia de aminoácidos: Accesoión GenBank AHN91985.

Los primeros once aminoácidos son residuos del péptido señal dando una proteína madura de 487 aminoácidos (Figura 26 y 27), valor cercano a la proteína madura de *Bothrops jararacussu* con 473 aminoácidos y a la de *Agkistrodon halys blomhoffii* con 486 aminoácidos (Takatsuka et al., 2001).

```

      10      20      30      40      50      60      70
ADDRNPLEEC FRETDYEEFL EIAKNGLSST SNPKRVVIVG AGMSGLSAAY VLANAGHQVT VLEASERAGG
      80      90     100     110     120     130     140
RVKTYRNEKE GWYANLGPMP LPEKHRIVRE YIKKFDLRLN EFSQENENAW YFLQNIKKRV REVNKDPGVL
      150     160     170     180     190     200     210
EYPVKPSEVG KSAGQLYEES LRKAVEELRR TNCSYMLNKY DTYSTKEYLL KEGNLSPGAV DMIGDLLNED
      220     230     240     250     260     270     280
SGYYVSFIES LKHDDIFAYE KRFDEIVGGM DKLPTSMYQA IQEKVHLNAR VIEIQQDVKE VTVTYQTSQK
      290     300     310     320     330     340     350
ETLSVTADYV IVCTTSRAAR RITFEPPLPP KKAHALLSVH YRSGTKIFLT CTKKFWEDDG IHGKSTTDL
      360     370     380     390     400     410     420
PSRFIYYPNH NFPNGVGVII AYGIGDDANY FQALDFEDCG DIVINDLSLI HQLPKEEIQV ICRPSMIQRW
      430     440     450     460     470     480     487
SLDNYAMGGI TTFPTYHFQH FSEALTAPVD RIYFAGEYTA QAHGWIDSTI KSGLRAATDV NRASENK

```

Figura 27. Secuencia de la proteína madura de LAAO del veneno de *B. pictus* deducida por el programa Translate Tool y depositada en la base de datos del GenBank (Accesión: AHN91985).

El análisis bioinformático mediante el programa Protparam(<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>), muestra que la secuencia compone una proteína de peso molecular teórico de 55,28 kDa con un punto isoeléctrico de 5,75 que determina el carácter ácido. Los parámetros fisicoquímicos más resaltantes se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros físicos y químicos obtenidos para la proteína deducida BpicLAAO mediante el programa ProtParam.

Peso molecular	55286.3 Daltons	Fórmula	C ₂₄₆₇ H ₃₈₂₀ N ₆₆₈ O ₇₅₀ S ₁₄	
pl teórico	5.75			
Composición de aa	Ala (A) 35 Arg (R) 27 Asn (N) 24 Asp (D) 28 Cys (C) 6 Gln (Q) 16 Glu (E) 40 Gly (G) 32 His (H) 12 Ile (I) 30	7.2% 5.5% 4.9% 5.7% 1.2% 3.3% 8.2% 6.6% 2.5% 6.2%	Leu (L) 37 Lys (K) 31 Met (M) 8 Phe (F) 19 Pro (P) 20 Ser (S) 30 Thr (T) 29 Trp (W) 5 Tyr (Y) 27 Val (V) 31	7.6% 6.4% 1.6% 3.9% 4.1% 6.2% 6.0% 1.0% 5.5% 6.4%
Número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu)	68	Índice alifático	79.30	
Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys)	58	GRAVY	-0.483	
Tiempo de vida media	4.4 horas en reticulocitos de mamíferos (in vitro) >20 horas en levadura (in vivo) >10 horas en E. coli (in vivo)			

En la Tabla 11, se muestran los posibles tripletes codificadores de aminoácidos (“Codon Usage”) de Bpic-LAAO en comparación con las secuencias nucleotídicas de *B. pauloensis* y *C. rhodostoma* en lo que se evidencia preferencia por el uso de codones para aminoácidos particulares.

Evidenciándose preferencia de LAAO de *B. pictus* en el uso de codón para alanina, prolina y ácido glutámico.

Tabla 11. Comparación de las secuencias codificadoras de aminoácidos para las LAAOs de serpientes.

		<i>Bothrops pictus</i>			<i>Bothrops pauloensis</i>			<i>Calloselasma rhodostoma</i>		
		numero	/100	Fracción	numero	/100	Fracción	numero	/100	Fracción
Ala	GCG	1.00	2.07	0.03	3.00	5.96	0.08	3.00	6.20	0.08
Ala	GCA	10.00	20.66	0.29	11.00	21.87	0.29	10.00	20.66	0.28
Ala	GCT	11.00	22.73	0.31	12.00	23.86	0.32	12.00	24.79	0.33
Ala	GCC	13.00	26.86	0.37	12.00	23.86	0.32	11.00	22.73	0.31
Cys	TGT	2.00	4.13	0.33	3.00	5.96	0.43	2.00	4.13	0.33
Cys	TGC	4.00	8.26	0.67	4.00	7.95	0.57	4.00	8.26	0.67
Asp	GAT	19.00	39.26	0.68	18.00	35.79	0.64	22.00	45.45	0.65
Asp	GAC	9.00	18.60	0.32	10.00	19.88	0.36	12.00	24.79	0.35
Glu	GAG	14.00	28.93	0.36	12.00	23.86	0.33	9.00	18.60	0.31
Glu	GAA	25.00	51.65	0.64	24.00	47.71	0.67	20.00	41.32	0.69
Phe	TTT	14.00	28.93	0.74	15.00	29.82	0.60	14.00	28.93	0.61
Phe	TTC	5.00	10.33	0.26	10.00	19.88	0.40	9.00	18.60	0.39
Gly	GGG	6.00	12.40	0.19	7.00	13.92	0.19	8.00	16.53	0.24
Gly	GGA	10.00	20.66	0.31	12.00	23.86	0.33	11.00	22.73	0.32
Gly	GGT	9.00	18.60	0.28	11.00	21.87	0.31	7.00	14.46	0.21
Gly	GGC	7.00	14.46	0.22	6.00	11.93	0.17	8.00	16.53	0.24
His	CAT	9.00	18.60	0.75	9.00	17.89	0.82	10.00	20.66	0.83
His	CAC	3.00	6.20	0.25	2.00	3.98	0.18	2.00	4.13	0.17
Ile	ATA	3.00	6.20	0.10	3.00	5.96	0.10	4.00	8.26	0.13
Ile	ATT	14.00	28.93	0.47	15.00	29.82	0.50	15.00	30.99	0.48
Ile	ATC	13.00	26.86	0.43	12.00	23.86	0.40	12.00	24.79	0.39
Lys	AAG	17.00	35.12	0.57	19.00	37.77	0.58	17.00	35.12	0.47
Lys	AAA	13.00	26.86	0.43	14.00	27.83	0.42	19.00	39.26	0.53
Leu	TTG	7.00	14.46	0.19	9.00	17.89	0.23	6.00	12.40	0.16
Leu	TTA	5.00	10.33	0.14	4.00	7.95	0.10	3.00	6.20	0.08
Leu	CTG	8.00	16.53	0.22	9.00	17.89	0.23	7.00	14.46	0.19
Leu	CTA	4.00	8.26	0.11	5.00	9.94	0.13	6.00	12.40	0.16
Leu	CTT	8.00	16.53	0.22	8.00	15.90	0.21	8.00	16.53	0.22
Leu	CTC	5.00	10.33	0.14	4.00	7.95	0.10	7.00	14.46	0.19
Met	ATG	8.00	16.53	1.00	10.00	19.88	1.00	6.00	12.40	1.00
Asn	ATT	16.00	33.06	0.70	16.00	31.81	0.73	16.00	33.06	0.73
Asn	AAC	7.00	14.46	0.30	6.00	11.93	0.27	6.00	12.40	0.27
Pro	CCG	4.00	8.26	0.20	2.00	3.98	0.10	2.00	4.13	0.10
Pro	CCA	2.00	4.13	0.10	3.00	5.96	0.15	6.00	12.40	0.30
Pro	CCT	6.00	12.40	0.30	8.00	15.90	0.40	7.00	14.46	0.35
Pro	CCC	8.00	16.53	0.40	7.00	13.92	0.35	5.00	10.33	0.25
Gln	CAG	6.00	12.40	0.38	10.00	19.88	0.59	9.00	18.60	0.53
Gln	CAA	10.00	20.66	0.63	7.00	13.92	0.41	8.00	16.53	0.47
Arg	AGG	3.00	6.20	0.11	5.00	9.94	0.19	4.00	8.26	0.17

Arg	AGA	8.00	16.53	0.30	8.00	15.90	0.30	9.00	18.60	0.39
Arg	CGG	4.00	8.26	0.15	2.00	3.98	0.07	3.00	6.20	0.13
Arg	CGA	6.00	12.40	0.22	5.00	9.94	0.19	4.00	8.26	0.17
Arg	CGT	5.00	10.33	0.19	6.00	11.93	0.22	3.00	6.20	0.13
Arg	CGC	1.00	2.07	0.04	1.00	1.99	0.04	0.00	0.00	0.00
Ser	ATG	6.00	12.40	0.20	7.00	13.92	0.21	6.00	12.40	0.21
Ser	AGC	5.00	10.33	0.17	6.00	11.93	0.18	4.00	8.26	0.14
Ser	TCG	1.00	2.07	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser	TCA	8.00	16.53	0.27	9.00	17.89	0.27	8.00	16.53	0.28
Ser	TCT	6.00	12.40	0.20	7.00	13.92	0.21	7.00	14.46	0.24
Ser	TCC	4.00	8.26	0.13	4.00	7.95	0.12	4.00	8.26	0.14
Thr	ACG	4.00	8.26	0.14	3.00	5.96	0.11	5.00	10.33	0.19
Thr	ACA	10.00	20.66	0.34	10.00	19.88	0.37	7.00	14.46	0.27
Thr	ACT	10.00	20.66	0.34	9.00	17.89	0.33	9.00	18.60	0.35
Thr	ACC	5.00	10.33	0.17	5.00	9.94	0.19	5.00	10.33	0.19
Val	GTG	9.00	18.60	0.29	9.00	17.89	0.27	11.00	22.73	0.35
Val	GTS	8.00	16.53	0.26	8.00	15.90	0.24	5.00	10.33	0.16
Val	GTT	7.00	14.46	0.23	7.00	13.92	0.21	8.00	16.53	0.26
Val	GTC	7.00	14.46	0.23	9.00	17.89	0.27	7.00	14.46	0.23
Trp	TGG	5.00	10.33	1.00	5.00	9.94	1.00	5.00	10.33	1.00
Tyr	TAT	20.00	41.32	0.74	19.00	37.77	0.73	21.00	43.39	0.78
Tyr	TAC	7.00	14.46	0.26	7.00	13.92	0.27	6.00	12.40	0.22

Adicionalmente fueron identificados dos motivos de N-glicosilación ubicados en Asn172, Asn192, pero solo el primero fue considerado como potencial (Figuras 26 y 28). La proteína madura fue depositada en la base de datos del GenBank (Accesión: AHN91985).

Así mismo, se pudo determinar la presencia de los tres dominios principales de las enzimas LAOs (Figura 28): El dominio de unión a sustrato, el dominio de unión a FAD y el dominio helicoidal. En la Tabla 12 se muestra a los aminoácidos que conforman estos dominios y en la Figura 29 aquellos que conforman las estructuras secundarias.

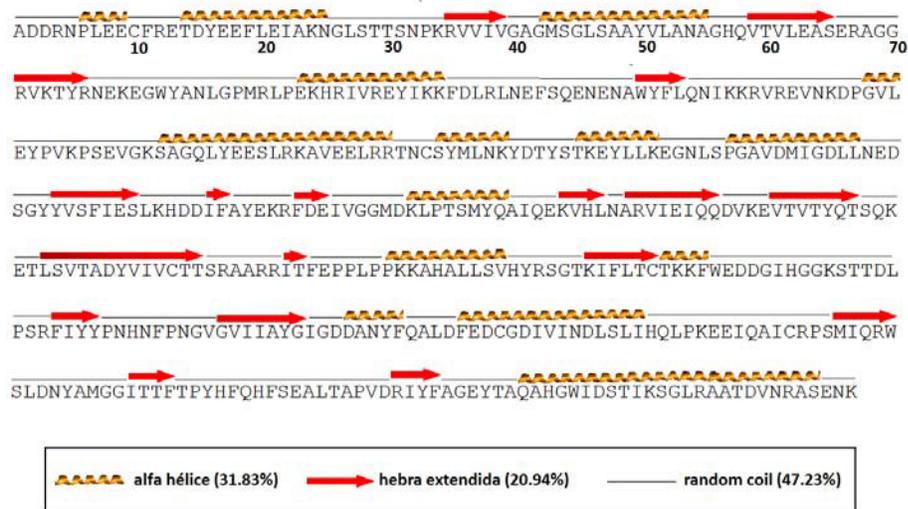


Figura 29. Estructura secundaria de LAO del veneno de *B. pictus* obtenida por el programa Protparam

El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos mostró claramente dos ramas evolutivas distintas dentro de las enzimas LAO ofídicas, un primer grupo perteneciente a la familia Viperidae y otra a la familia Elapidae, dentro de la primera familia, *B. pictus* forma una sub agrupación consistente, compuesta por las LAOs del género *Bothrops* (Figura 30).

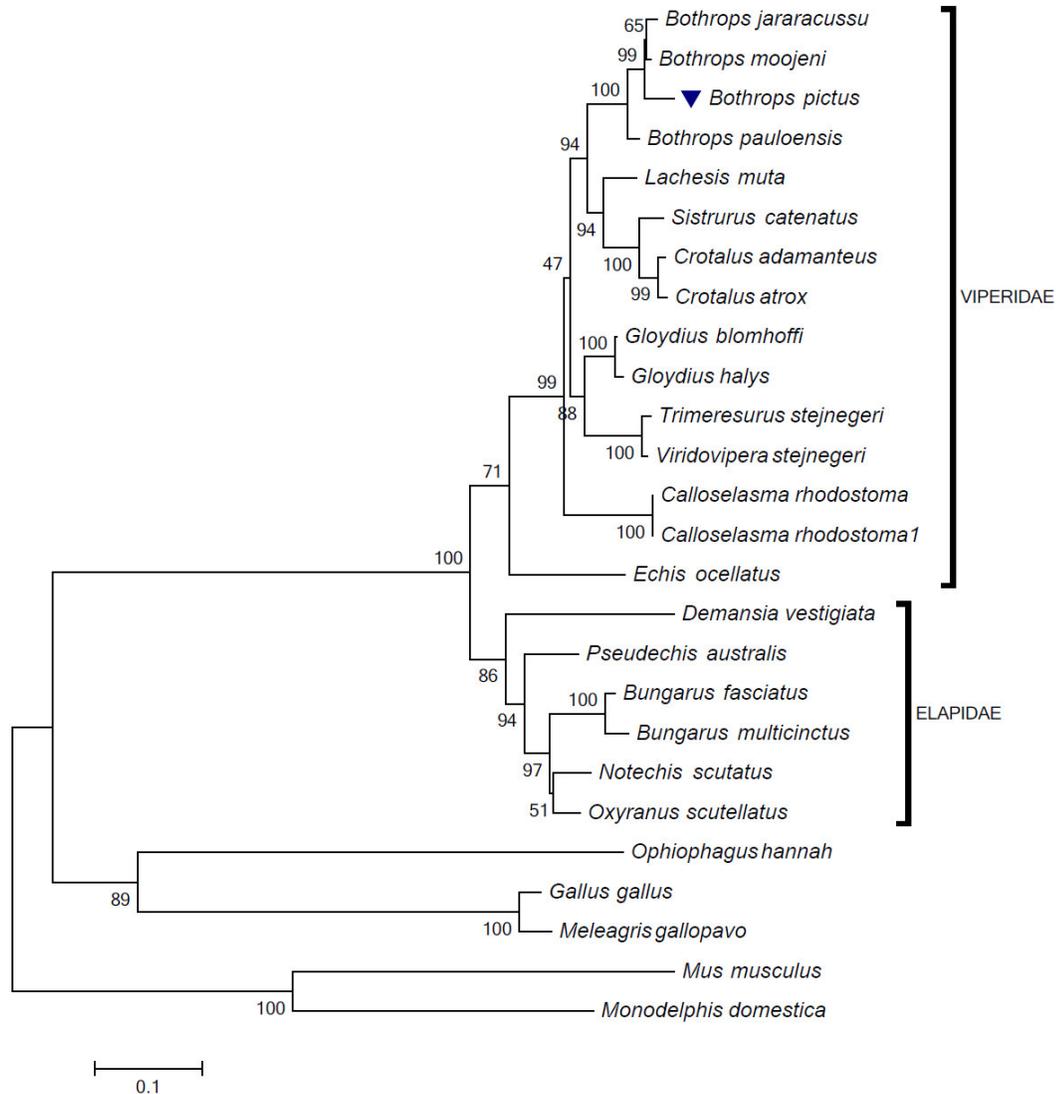


Figura 30. Relación evolutiva de las enzimas LAOs. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining. Los análisis filogenéticos fueron hechos con el programa MEGA 5. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de la matriz basada en JTT con un valor de test de bootstrap de 2000 réplicas. Las LAOs ofídicas fueron agrupadas en dos ramas monofiléticas (Viperidae y Elapidae). Los códigos Gen Bank son: *Bothrops jararacussu* (gi:82127391), *Bothrops pauloensis* (gi:195927838), *Bothrops moojeni* (gi:82127389), *Calloselasma rhodostoma* (gi:20141785), *Calloselasma rhodostoma* (gi:157883889), *Crotalus adamanteus* Viperidae (gi:6093636), *Crotalus atrox* (gi:124106294), *Echis ocellatus* (gi:205275159), *Gloydus blomhoffi* (gi:75570145), *Gloydus halys* (gi:82088273), *Sistrurus catenatus edwardsi* (gi:109254996), *Trimeresurus stejnegeri* Viperidae (gi:33355627), *Viridovipera stejnegeri* (gi:82090465), *Bungarus fasciatus* (gi:126035653), *Bungarus multicinctus* (gi:126035649), *Demansia vestigiata* (gi:166216291) *Notechis scutatus scutatus* (gi:123913796), *Ophiophagus hannah* (gi:126035644), *Oxyranus scutellatus* (gi:123916680), *Pseudechis australis* (gi:123916679) *Gallus gallus* (gi:150247106) *Meleagris gallopavo* (gi:169730353), *Monodelphis domestica* (gi:126330514) y *Mus musculus* (gi:31981608)

En el modelamiento por homología se usó como secuencia molde a la secuencia de la L-amino ácido oxidasa de la serpiente brasileña *Bothrops jararacussu*, recientemente cristalizada y denominada como BjussuLAAO (PDB: 4E0V_B) con la que se obtuvo la estructura cuaternaria de LAAO de *B. pictus* (figura 30), la homología estructural, fue del 95% por lo que el DOPE score en el programa MODELLER v9.13 fue de -53848.664063 y el QMEAN Z-Score del programa Swiss Model fue de -1.847. Los parámetros comparativos mostraron 18 discrepancias en posición de aminoácidos: 9 en el dominio de unión a sustrato, 6 en el dominio de unión al FAD y 3 en el dominio alfa hélice.

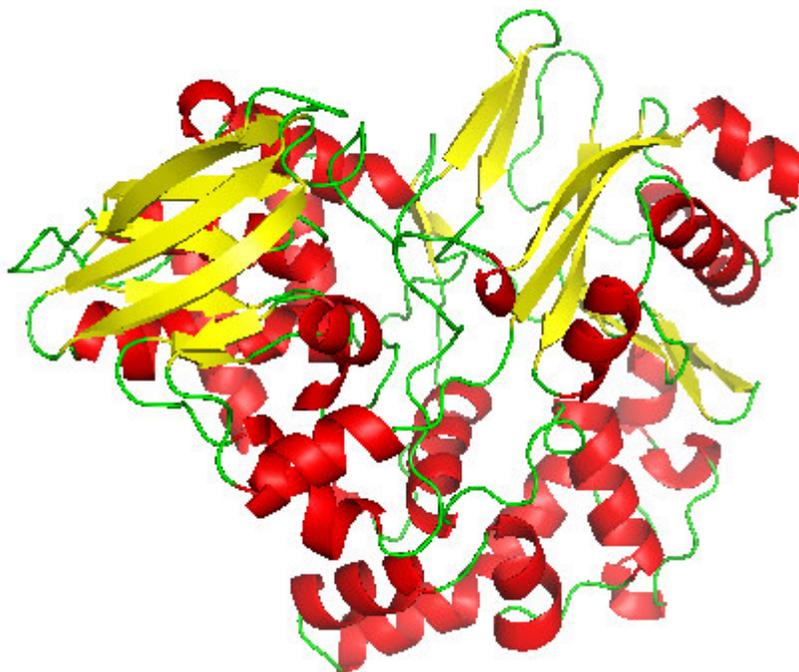


Figura 31a. Modelo teórico de la estructura terciaria de la enzima LAAO de *B. pictus* basada en la homología de la enzima BjussuLAAO (PDB: 4e0V_B) usando el programa CPH model 32, se observa la disposición de las alfa hélice (rojo), hoja beta (amarillo) y random coil (verde). Modelo generado en el programa Pymol.

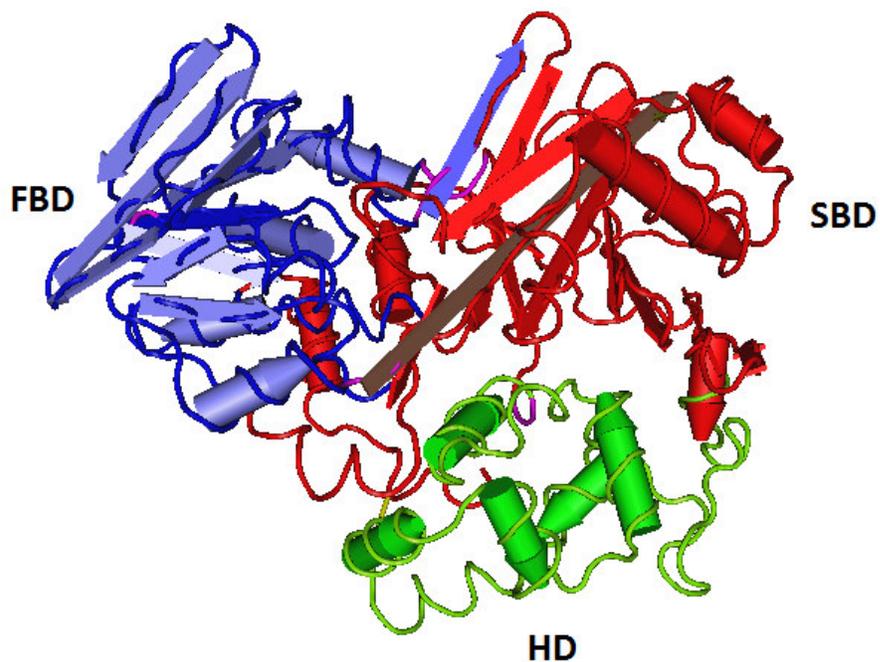


Figura 31b. Modelo estructural en donde se definen los dominios de unión a sustrato (rojo) de unión a FAD (azul) y dominio helicoidal (verde) de la enzima LAAO de *B. pictus* de acuerdo a la figura 26, diagrama generado con el programa Cn3D tomando como molde a la enzima BjussuLAAO.

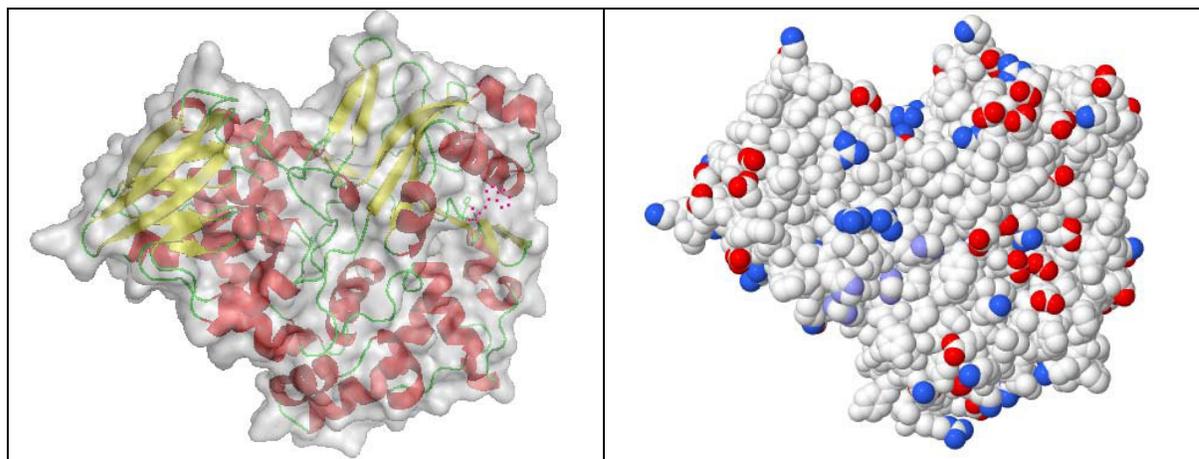


Figura 31c. Modelo estructural de superficie de la enzima LAAO de *B. pictus*, Izquierda: Relación de distribución de área generado en Pymol. Derecha, distribución de carga en superficie generado en Jmol.

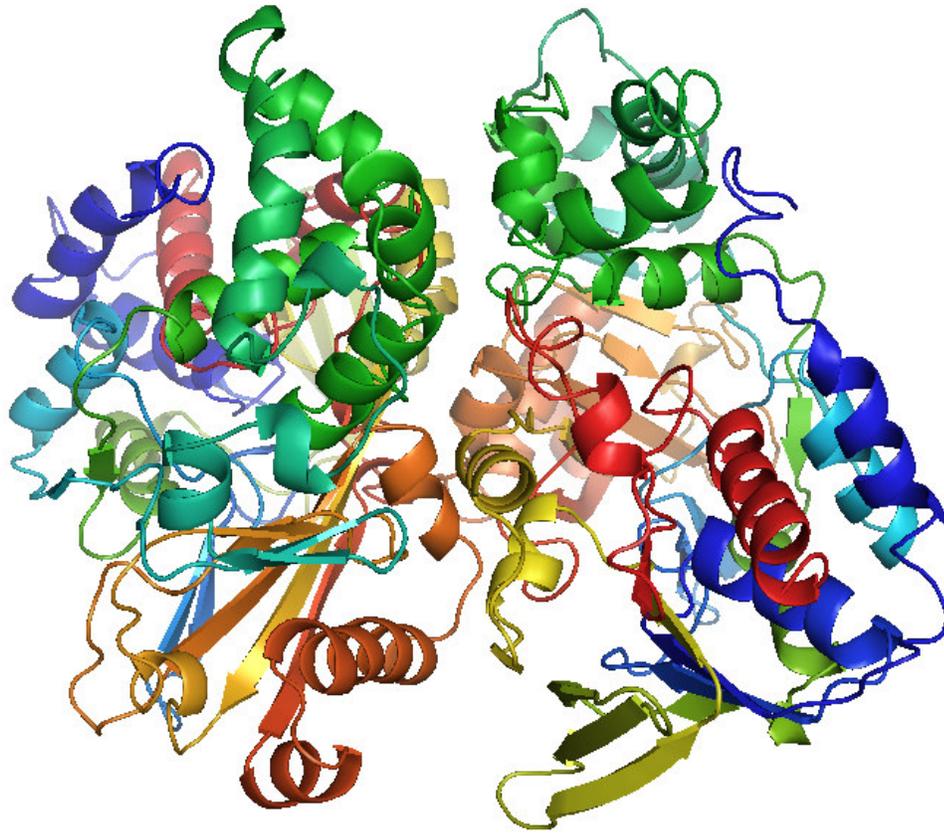


Figura 32. Modelo teórico de la estructura cuaternaria de la enzima LAAO del veneno de *B. pictus*. Modelado por el servidor SWISS MODEL y visualizado en el programa Pymol.

DISCUSIÓN

1. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL PH

La mayoría de SVLAAOs, son enzimas termo lábiles cuya actividad enzimática y su inactivación dependen del pH y la composición del buffer de almacenamiento.

Generalmente las SVLAAOs deben mantenerse cerca al pH neutro y a 4 °C para evitar su inactivación. Asimismo los aniones monovalentes tales como el Cl⁻ pueden prevenir la inactivación de las SVLAAOs, en tanto que aquellas que resulten inactivadas pueden recuperar su actividad por tratamiento térmico a 37°C a pH 5 (Alves et al., 2008; Huang y Xu 2009 ; Samel et al., 2006). Sin embargo LAAO del veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* después de su almacenamiento a -80°C por 6 meses aún retiene su actividad (Sakurai et al., 2003); Así también LAAO de *Ophiophagus hannah* mantiene su actividad aún después de someterla a congelamiento y descongelamiento repetido. LAAO de *Naja naja oxiana* también tolera congelamiento y descongelamiento, pero su capacidad para inducir agregación plaquetaria se redujo drásticamente con este tratamiento; esto se debería a probables cambios en la arquitectura de la proteína (Samel et al., 2006).

Por otro lado si se calienta la Apoxina I (una LAAO del veneno de *Crotalus atrox*) a 70°C por 10 minutos o si se le congela y descongela repetidas veces, se observó la pérdida tanto de la actividad enzimática como de su capacidad inductora de apoptosis (Torii et al., 1997).

Por estas razones se tuvo la necesidad de elegir el buffer y el pH adecuados para el aislamiento de la enzima, preservando al máximo su estabilidad. Ello motivó la realización de una serie de ensayos que permitieron demostrar que la actividad de LAAO se mantiene en el rango de pH 5 a 6, mientras que a pH alcalinos, la actividad se pierde rápidamente (Tabla 1).

Trabajos previos han reportado que la máxima estabilidad de LAAO se encuentra a pH 6 con los venenos de *B. atrox* y *L. muta* (Lazo et al., 2007; Yarlequé et al., 1997) y al mismo valor con el veneno de *B. brazili* (Solís et al., 1999). Así mismo se registró una rápida pérdida de actividad cuando dichos venenos fueron expuestos a pH alcalinos en el rango de 8 a 9.

Los resultados presentados en la Tabla 1 indican claramente que LAAO de *B. pictus* 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.

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.

En la Figura 3, se observa que BpicLAAO fue purificada utilizando una filtración molecular en Sephadex G-100 seguida de un intercambio catiónico en CM-Sephadex C-50 (Figura 4); esta metodología, ha permitido obtener BpicLAAO con un grado de purificación equivalente a 22,02 veces con respecto al veneno crudo, un rendimiento de 18,37% y una recuperación de proteína activa de 0,834%.

De otros venenos de vipéridos y elápidos se ha obtenido LAAO parcial o totalmente purificada, así Singer y Kearney (1950) la purificaron de *Agkistrodon piscivorus*, luego Suzuki e Iwanaga (1960) de *A. 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*, Sugiura et al. (1975) del veneno de *A. caliginosus*, Wei et al. (2002) de *Trimeresurus mucrosquamatus*, Zhang et al. (2003) de *T. stejnegeri*,

Tonismagi et al. (2006) de *V. lebetina*, Lazo et al. (2007) de *Bothrops atrox*, Stabeli et al. (2007) de *B. moojeni*, Rodrigues et al., (2009) de *B. pauloensis*, Zhong et al. (2009) de *Daboia russelli*, Wei et al. (2009) de *Bungarus fasciatus*, Georgeiva et al. (2011) de *Vipera ammodytes*, Vargas et al. (2013) de *Crotalus durissus cumanensis* (Anexo 1).

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 *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 pictus* al igual que en varios venenos vipéridos, la fracción donde se encuentra LAAO aparece en el primer pico de proteína tanto en la columna de filtración molecular como de intercambio catiónico. Empero se han reportado venenos ofídicos que contienen más de un tipo de LAAO. Stiles et al. (1991) y Tan y Tan (1989) estudiaron el veneno de *Trimeresurus sumatranus sumatranus*, serpiente del sudeste asiático, encontrando dos fracciones de LAAO 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. Se han encontrado Isoformas de LAAOs en los venenos de las serpientes *Bothrops alternatus* (Stabeli, et al., 2004), *Pseudechis australis*, *Vipera berus berus* (Samel et al., 2006), *Bothrops jararaca* (Ciscotto et al., 2009), *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* (Sun et al., 2010).

Adicionalmente se ha demostrado en algunos venenos de serpientes que la enzima esta presente en numerosas isoformas. Hayes y Wellner (1969) reportaron que hubo por lo menos 18 isoformas de la LAAO del veneno de *C. adamanteus*

contribuyendo la glicosilación a la microheterogeneidad de la enzima. Sin embargo esta microheterogeneidad no fue observada para las L-aminoácido oxidasas aisladas de la mayoría de otros venenos (Tan y Fung, 2010). Asimismo se ha reportado también LAAOS de naturaleza ácida, neutra y básica, coexistiendo en el mismo tipo de veneno, 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). La presencia de isoformas pueden ser atribuidas a diferentes causas: a diferente composición o diferente glicosilación de la proteína revelado para otras flavoenzimas homólogas, o la síntesis proteica por genes diferentes como fue sugerido para dos LAAOs diferentes de *Pseudechis australis* (Stiles et al., 1991). Por tanto siendo BpicLAAO, 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 LAAO 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, al igual que Vargas et al. (2013) purificaron LAAO de *C. durissus cumanensis* en dos pasos: uno de filtración y otro de intercambio iónico, el análisis de pureza fue realizado por HPLC en fase reversa. Este método inicialmente fue empleado por Yarlequé et al. (1997) para purificar la enzima de algunas serpientes peruanas como *Lachesis muta*, y *Crotalus durissus* y el hecho que por la misma metodología se logre purificar la enzima de los distintos venenos, sugeriría una semejanza estructural entre las LAAOs de las especies de la Familia Viperidae que habitan en el país. Ello está en concordancia con la purificación de la LAAO de *C. rhodostoma* en la que también se emplearon dos pasos: una filtración molecular sobre Sephadex G-200 seguida de un intercambio iónico sobre Mono-Q HR (Ponnudurai et al., 1994). Además, Vargas et al. (2013) reportaron que LAAO del veneno de la serpiente de Colombia *Crotalus durissus cumanensis*, también fue separada en dos pasos: uno

de filtración molecular en Sephacryl S-200 y otrade intercambio iónico. El análisis de pureza fue realizado por HPLC en fase reversa.

Como se observa en la Figura 3, en el paso a través de la columna de exclusión molecular en Sephadex G-100, la mayor actividad enzimática de BpicLAAO 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 y Magalhaes, 1991); *Bothrops moojeni* (Tempone et al., 2001), 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).

Sakurai et al.(2001) y Takatsuka et al.(2001), describen la purificación de LAAOs de las serpientes *Naja naja kaouthia* y *Agkistrodon halys blomhoffii*, respectivamente. En ambos venenos de serpientes LAAO fue purificada sin usar Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), la cual precisa de cuidado para no degradar la enzima, siendo el costo de la purificación y el tiempo mayor, pero se presentaron más pasos cromatográficos que también generan gasto y pérdidas en la purificación de la proteína. Takatsuka et al. (2001), describió cinco pasos para obtener LAAO: una de intercambio iónico (DEAE- Sepharosa), afinidad (Heparina- Sepharosa), exclusión molecular (Sephacryl S-300), hidrofóbica (Fenil-Sepharosa) y otra de intercambio iónico (Hidroxiapatita). Sakurai et al.(2001), describió cuatro pasos: exclusión molecular (Sephadex G-200), una de intercambio iónico (Bio- Rex 70), afinidad (Heparina-Sepharosa) y una hidrofóbica (Fenil-Sepharosa).

Puede observarse en la comparación de estas dos últimas metodologías con la adoptada en este trabajo para la obtención de BpicLAAO, que ya existe un camino rápido y sencillo, para obtener LAAOs del veneno de varias serpientes peruanas en sólo dos pasos.

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 LAAO; pero además, se demuestra al observar una sola banda proteica por PAGE-SDS y un solo pico de proteína por HPLC (Figura 5).

3- PUREZA Y PESO MOLECULAR

La electroforesis por PAGE-SDS en condiciones no reductoras mostró una sola banda de proteína, lo que nos señala que la enzima después de los dos pasos de purificación se encuentra al estado homogéneo (Figura 7). Similar resultado, es decir la aparición de un único pico proteico se encontró cuando se colocó la muestra después de los dos pasos de purificación sobre una columna Vydac C10 para cromatografía por HPLC (Figura 5).

El peso molecular de la enzima fue de 132,27 kDa, calculado en una columna de filtración en Sephacryl S-200 (Figura 9). Asimismo en condiciones reductoras, en presencia de 2-mercaptoetanol, la corrida electroforética por PAGE-SDS, mostró una banda de 65,25 kDa. Esto evidencia que se trata de un dímero no covalente constituido por dos sub-unidades de 65,25 kDa cada una (Figura 7 y 8).

El análisis de superficie electrostática de los monómeros de La LAAO de *Bothrops jararacussu* (BjuLAAO) y LAAO de *Vipera ammodytes ammodytes* indican que la dimerización es mediada por fuerzas coulombicas entre el dominio de unión al substrato (altamente cargado en forma negativa) y el dominio de unión al FAD (altamente cargado en forma positiva), Los residuos involucrados en la estabilización del dímero son: K191, R317, H314, R317, S318, R300, R301, Y436,

D376, D349, D210, D201, H320, T182, D205, D388, K186, R297, y H440 observados en el dímero cristalizado de BjuLAAO. Ullah et al., 2012.

El valor obtenido por filtración molecular (132,27 kDa), 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), Anexo 1.

En cuanto al análisis de peso molecular por PAGE-SDS, tanto bajo condiciones reductoras y no reductoras, BpicLAAO, mostró una sola banda de proteína pero con diferentes movilidades electroforéticas, observándose mayor movilidad bajo condiciones no reductoras con un valor de 58,60 kDa en lugar de 65,25 kDa bajo condiciones reductoras (Figuras 7 y 8) . 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 *Eristocophis macmahoni* (Ali et al., 2000), en la que por espectrometría de masa se tuvo un valor de 58,7 kDa en condiciones no reductoras, la de *Trimeresurus flavoviridis* (Abe et al., 1998) y de *Agkistrodon halys blomhoffii* (Takatsuka et al., 2001), que registraron pesos moleculares de 55 y 60 kDa respectivamente. Adicionalmente LAAO de *Crotalus durissus cumanensis* registró un peso molecular de 55 kDa (Vargas et al., 2013), Anexo 1. También existen LAAOs

tetraméricas como la presente en el veneno de *Vipera ammodytes ammodytes* Georgieva et al., 2011.

Por todo lo anterior, se puede colegir que BpicLAAO se encuentra entre las proteínas de mayor masa molecular en este veneno, tal como ocurre con las enzimas LAAOs de la mayoría de estos fluidos biológicos.

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 10. Por otro lado BpicLAAO 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 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 BpicLAAO 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 la arquitectura del sitio activo de la enzima, así como la unión de las subunidades y la interacción de la proteína con su grupo prostético FAD (Wellner, 1966).

Si bien es cierto, la mayoría de las enzimas de origen animal tienen una baja tolerancia térmica y se inactivan fácilmente por encima de los 42 °C, se ha encontrado que algunas de estas proteínas de origen ofídico, pueden ser altamente termoestables e incluso resistir incrementos sumamente extremos como 100 °C. Así tenemos el caso de las enzimas similares a trombina (Yarlequé et al., 1989; Vivas et al., 2013); las fosfolipasas A₂ (Inga et al. 2011) y algunas proteasas tales como proteinasa I (Rodríguez y Yarleque, 1991), Atroxina (Pantigoso et al., 1996).

Alta termoestabilidad, también se puede apreciar al tratar por calentamiento a diversas neurotoxinas (Nair et al., 1976). Estudios más minuciosos sobre el tema señalan que la presencia de dos o más puentes S-S intracatenarios, dan lugar a este grado de estabilidad (Barker, 1975). Así también, el hecho de que los venenos ofídicos contengan enzimas termoestables, explicaría la razón por la que estos reptiles puedan habitar en ambientes de altas temperaturas, como los bosques tropicales y los desiertos sin que su pool enzimático en el cual están contenidas estas enzimas, pierdan su capacidad para inmovilizar, matar y digerir sus presas. Aún cuando en el caso de BpicLAAO no se dispone de una evidencia clara sobre la razón de su termoestabilidad hasta 55 °C, propiedades biológicas descritas en esta y otras investigaciones señalan que la capacidad antimicrobiana así como la de interferir la agregación plaquetaria entre otras, no se vería afectada por temperaturas ambientales entre 40 y 50 °C, que a su vez son temperaturas extremas en algunas regiones del mundo (Guo et al., 2012).

5. pH ÓPTIMO

Los ensayos para establecer el pH óptimo de BpicLAAO, permitieron demostrar que la máxima actividad se registraba a pH de 8,5 usando L- leucina como sustrato: Se encontró una elevada actividad mayor al 80% en el rango de pH 7,5 a 8,7 (figura 11). Estos valores tienen semejanza a los reportados para las LAAOs obtenidas de otros venenos de serpientes, así tenemos: *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 et al., 2006); *Calloselasma rhodostoma* 9 (Ponnudurai et al., 1994); *Daboia russelli* 8,8 (Zhong et al., 2009); *Bothrops brazili* 8,5 (Solís et al., 1999).

Naumann et al. (2011), reportó para la LAAO del veneno de *Bothrops leucurus* que presentaba dos PI diferentes de 5,8 y 6,1 lo cual reflejaba la presencia de dos isoformas similar a otras SV-LAAO como *Naja naja kaouthia* (Sakurai et al., 2001) y *Eristocophis macmahoni* (Ali et al., 2000).

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 LAAO de *Crotalus 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-isoleucina 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 11), 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 sulfihidrilo 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 et al., 2006).

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 3, se observa que los iones divalentes calcio, manganeso y magnesio no alteran la actividad enzimática de LAAO, lo que indicaría que la enzima no los requiere salvo el caso del ion zinc que ejerce efecto inhibitorio. A diferencia de la LAAO de *C. adamanteus* que requiere de Mg^{2+} (Paik y Kim 1965), BpicLAAO 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*, *B. brazili* y *B. atrox* (Cisneros et al., 2006; Solís et al., 1999; Lazo et al., 2007), 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 sulfihidrilo 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). Las SVLAAOs son proteínas que contienen iones metálicos, Sun et al. (2010) reportaron por primera vez que LAAO aislada del veneno de *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* es una proteína unida al Zn^{2+} , no cambia la actividad hidrolítica sobre L-Leu de esta enzima, pero disminuye en un 61% en la máxima emisión de intensidad de la fluorescencia de la LAAO que involucra al Zn^{2+} pudiendo causar un cambio conformacional o resulta en un cambio del microambiente del Trp por incremento del rendimiento de la emisión (Liu et al., 2002; Sun et al., 2010). El Zn^{2+} no es crítico para la actividad enzimática de *A. blomhoffii ussurensis* pero probablemente ayuda a mantener la estructura íntegra de la enzima.

En la estructura cristalizada del componente principal de *V. ammodytes ammodytes*, la LAAO es una unidad asimétrica que consta de cuatro moléculas, cada una ligada al FAD oxidado, lo que representa un dímero de dímeros. La unión de cuatro iones Zn^{2+} , estabiliza la estructura cuaternaria enzimáticamente activa y se considera importante para la actividad biológica de LAAO y otras flavoproteínas. Este ion Zn está presente en la interfase tetramérica siendo coordinado por los residuos H75 y G279. Cada monómero consta de tres dominios con un cofactor unido entre los dominios de unión al FAD y al sustrato y un sitio de glicosilación expuesto al agua, que se considera crucial para la toxicidad. La comparación de la estructura de LAAO en presencia y ausencia de un sustrato indica cambios conformacionales en el dinámico sitio activo y la red de unión al hidrógeno entre la triada Lys 326 -agua- N5 del FAD la cual es formada solo después de la unión al sustrato resultando en la disminución de la flexibilidad del anillo isoaloxasina (Georgieva et al., 2011).

La unión al sustrato es concomitante con el movimiento del cofactor a una posición donde el N5 del FAD forma un enlace de H con la conservada molécula de agua, la cual está simultáneamente unida al grupo amina de la lisina o al grupo carboxílico del aminoácido sustrato. De esta manera se crea una estructura rígida, ajustable para la transformación química en el sitio catalítico. En las estructuras de LAAOs diméricas de *B. jararacussu* y *C. rhodostoma* el ión Zn^{2+} no fue observado en la correspondiente interfase. Sin embargo H75 no está conservada en LAAO de *B jaracussu* siendo sustituida por una tirosina. Datos bioquímicos mostraron que la presencia o ausencia del ion Zn^{2+} no interfirieron con la actividad catalítica. Estos resultados sugieren que los iones Zn^{2+} juegan un rol en la estabilización del tetrámero pero no en la actividad LAAO (Ullah et al., 2012).

7. 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 BpicLAAO, 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 4.

Del mismo modo, BpicLAAO, no fue afectada por EDTA, agente quelante que liga cationes divalentes, por lo que se asume que LAAO 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 LAAO de *Trimeresurus mucrosquamatus*.

En contraste el 2-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 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 et al., 2006), *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 BpicLAAO 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.

8. CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A BpicLAAO Y LA DEGLICOSILACIÓN DE LA PROTEÍNA

Uno de los detalles más interesantes de esta investigación fue la asociación de carbohidratos a la estructura proteica de LAAO. En primer lugar usando el método de Lowry et al. (1951), se determinó que el veneno de *B. pictus* contiene 73% de proteína y 2,73% de carbohidratos asociados. La enzima purificada del veneno de *B. pictus*, mostró ser una glicoproteína con un 77,6% de proteína, conteniendo 15,6% de hexosas, 2,42% de hexosamina y 0,73% de ácidos siálicos (Tabla 5) Otros valores en contenido proteico del veneno total encontrados, para las especies del género *Bothrops* fueron muy similares al veneno de *B. pictus*: *B. brazili* 83%, *B. barnetti* 74% y *B. atrox* 78%. (Solís, 1999; Oshima e Iwanaga, 1969 y Lazo et al., 2007 respectivamente). Así mismo, respecto al contenido de carbohidratos el valor de 2,73% obtenido para el veneno de *B. pictus* es muy semejante al de *B. brazili* (2,64%), *B. jararaca* (3,6%), *B. atrox* (2,7%) y *Crotalus*

adamanteus (2-5%) (Solís, 1999; Oshima e Iwanaga, 1969; Lazo et al., 2007; De Kok y Veeger, 1968 respectivamente).

El contenido de carbohidratos asociados a BpicLAAO de 18,5% es cercano al 17,05% de *B. atrox*, 23,4% hallado para la LAAO de *O. hannah* y 18,84% para *B. brazili*, pero difiere del 5,4% encontrado para *C. adamanteus*.

Al tratar LAAO 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).

Es muy conocido que las LAAO son glicoproteínas, cuyo contenido de carbohidratos con asociación de tipo N encontrados en ellas y tratadas con PNGasa F, han permitido evaluar el diferente porcentaje de este tipo de glicosilación en los venenos; así tenemos que LAAO de *Bothrops atrox* contiene 17,05%, *Bothrops jararaca* 18,84%. *Ophiophagus hannah* 23,4%. La glicosilación contribuye a la microheterogeneidad para algunas LAAOs (Hayes y Wellner, 1969) y parece ser importante para la secreción y solubilidad de la proteína. La enzima PNGasa F, una glicosil asparraginasasa recombinante, que rompe los enlaces entre la asparragina no terminales y los azúcares asociados a esta, desaminando la asparragina a ácido aspártico pero dejando el oligosacárido intacto (Norris et al., 1994). Existe evidencia considerable que todos los carbohidratos presentes en una LAAO están ligados al aminoácido asparragina (Pawelek et al., 2000, Maley et al., 1989) y las SVLAAO contienen arriba de 3,7 kDa de glicosilación por protómero.

El resultado del tratamiento de BpicLAAO con PNGasa F dio como resultado la deglicosilación mostrando una sola banda de 47 kDa por PAGE.SDS en condiciones no reductoras, representando un 19,7% del contenido aproximado de carbohidratos siendo este el primer reporte del grado de glicosilación para este tipo de enzimas presentes en venenos de serpientes peruanas. (Figura 12).

Hayes y Wellner (1969), mostraron que la glicosilación contribuye a la microheterogeneidad para algunas LAAOs.

Stabeli et al. (2004), reportó que la cantidad de azúcar fue estimada en aproximadamente ~15% de su peso para la LAAO de *B. alternatus*, en donde la actividad enzimática no se perdió después de la deglicosilación, lo que sugiere que la porción de la molécula de azúcar no interfiere con la actividad enzimática y para LAAO de *B. atrox* la cantidad de azúcar se estimó en 12% (Alves et al., 2008).

Torii et al., 2000 encontró que la deglicosilación de la apoxina 1 disminuye la actividad antibacteriana y la citotoxicidad en un 75% y lo mismo fue reportado para la LAAO del veneno de *Agkistrodon halys pallas* (Liu et al., 2002), indicando que la glicosilación es importante para la actividad catalítica de las SV-LAAOs.

Los carbohidratos juegan un rol importante en las actividades enzimáticas y biológicas de las SV-LAAOs (Moustafa et al., 2006; Fitzpatrick, 2004; Geyer et al., 2001). Sin embargo la deglicosilación no tuvo ningún efecto sobre las actividades enzimáticas de las LAAOs de *B. pauloensis*, *B. jararaca*, *B. pirajai*, *B. alternatus* y *B. moojeni* (Rodrigues et al., 2009; Ciscotto et al., 2009; Izidoro et al., 2006 y Stabeli et al., 2004, 2007) Actualmente se investiga el preciso rol del mecanismo de la glicosilación, la naturaleza de las porciones glicano y sus implicancias funcionales.

Los carbohidratos parecen cumplir un rol importante en las acciones farmacológicas de la enzima. Suhr y Kim (1996) sugirieron que la descarga de LAAO a la superficie de la célula, permite la generación local de altas concentraciones de H₂O₂, el cual participa en muchas acciones biológicas de LAAO.

Un posible rol de los oligosacáridos en las proteínas es el modular sus propiedades físico-químicas tales como solubilidad, viscosidad, estabilidad de carga, así Geyer et al. (2001), evidenció que removiendo los oligosacáridos de la LAAO de *C. rhodostoma* deja insoluble a la proteína. Otro probable rol 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).

La inhibición de la N-glicosilación anula la actividad enzimática implicando que la glicosilación es importante para la actividad LAAO (Torii et al., 2000). La deglicosilación de la enzima, sin embargo no altera la actividad de la enzima (Stabeli et al., 2004; Izidoro et al., 2006).

11. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

11.1 HEMÓLISIS, EDEMA Y HEMORRAGIA

Las propiedades hemolíticas de SVLAAOs han sido poco exploradas; Ali et al. (2000) detectó actividad hemolítica en el veneno total y en la LAAO aislada del veneno de *E. macmahoni* sobre glóbulos rojos de oveja, evidenciando inducción de hemólisis a la dosis más baja (1 µg), incrementándose linealmente hasta los 7 µg y luego alcanzó una meseta por encima de 10 µg. Asimismo todas las fracciones bactericidas y el veneno total de *B. jararaca* produjeron lisis significativa de glóbulos rojos de caballo, mostrando un halo verduco alrededor de los pocillos hechos sobre agar TSA, después de 6 a 18 h de incubación a 37 °C. La adición de catalasa anuló esta actividad en ambos venenos, sugiriendo que el H₂O₂ un producto de la reacción mediada por LAAO está involucrado en tal efecto. (Ali et al., 2000; Ciscotto et al., 2009). Además de las enzimas purificadas de estos venenos solo se ha reportado esta actividad en la LAAO aislada del veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (Abe et al., 1998). La actividad hemolítica esta ausente en BpicLAAO (Figura 13).

En cuanto a la 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 LAAO, aunque en algunos casos se ha determinado la dosis edemática mínima (DEM); así por ejemplo para LAAO del veneno de *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 LAAO del veneno de

Trimeresurus mucrosquamatus (Wei et al., 2002), para LAAO de *Eristocophis macmahoni* 4,8 µg/pata de ratón (Ali et al., 2000). Estos datos son muy similares a los encontrados para otras SVLAAOs, en contraste a lo reportado por Ullah et al. (2012) para la enzima del veneno de *Bothrops jararacussu* donde la DEM fue de 100 µg/pata de ratón.

En nuestro caso para la enzima purificada de *Bothrops pictus*, hemos encontrado una DEM de 7,80 µg de proteína (Figura 15), lo que nos indica que LAAO de este veneno tiene una acción edemática equivalente a un 87,5% del máximo valor presente en una enzima de este tipo procedente de un veneno ofídico.

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, kininas, (Ali et al., 1999) y metabolitos de las ciclo oxigenasas (Zamuner Y Texeira, 2002).

En los accidentes por serpientes vipéridas, el edema es el resultado de la síntesis de potentes autocoides o eicosanoides, generados por componentes enzimáticos del veneno (Chaves et al., 1995). Los eicosanoides (prostaglandinas) (PGs), tienen un amplio rango de actividades biológicas, los cuales son importantes en procesos fisiológicos y patológicos, que incluyen inflamación (Smith et al., 1998). La prostaglandina E₂ (PGE₂) es el principal producto en los sitios inflamatorios donde contribuye al incremento local del flujo de sangre, formación de edema y sensibilidad al dolor (Giuliano y Warner 2002). Las ciclooxigenasas (COX), son las enzimas que catalizan la biosíntesis de PGs desde el substrato ácido araquidónico (Vane et al., 1998).

En el veneno de vipéridos, los inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico tales como inhibidores de la ciclooxigenasa y corticosteroides también tienen acciones inhibitorias sobre la formación de edema (Bressan et al., 2003). Las drogas que interfieren con el metabolismo del ácido araquidónico

incluyendo los corticosteroides: dexametasona, inhibidor no selectivo para COX, la indometacina y rofecoxib un inhibidor selectivo de COX-2, reducen significativamente la formación del edema. Los inhibidores de COX atenúan marcadamente el edema que involucra los metabolitos del ácido araquidónico como las PGs. La enzima involucrada en la síntesis de PG es la COX, la cual convierte al ácido araquidónico a PGH₂. Varias enzimas pueden convertir PGH₂ a otros prostanoides, por ejemplo PGE₂, PGI₂, TXA₂.

Se ha reportado que existen otros inductores de edema como ciertas proteasas y fosfolipasas ofídicas. Considerando que las fosfolipasas A₂ son las enzimas involucradas en la iniciación de la cascada completa de eicosanoides, es posible que estas enzimas puedan jugar un papel importante en la expresión de COX (Serhan, 1994). Por otro lado se tienen evidencias que la actividad de LAAO de *O. hannah* que induce la formación de edema no fue inhibida por difenhidramina o dexametasona (Izidoro et al., 2006), que son drogas antihistamínicas.

El edema es debido a la activación de la respuesta inflamatoria generada por el peróxido de hidrógeno. La administración de glutatión a la pata de los ratones inhibe la actividad de la enzima inductora de edema, 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 inhibidora del glutatión sobre LAAO 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. pictus*, 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 actividad hemorrágica; la observación de este efecto en el veneno crudo de *B. pictus*, la atribuimos a la actividad de LAAO y probablemente a alguna hemorragina específica que podría estar presente en el veneno. En cuanto a la hemorragia causada por nuestra enzima en estudio fue muy severa logrando una DHM de 2,79 µg de proteína (Figura 17), siendo el primer reporte de esta actividad asociada a LAAO para serpientes peruanas pues en general no se ha encontrado acción hemorrágica de LAAO en otros venenos ofídicos, salvo los casos de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, que induce hemorragia en ratones con una dosis mínima hemorrágica de 10 µg, en cuyo caso la actividad biológica podría atribuirse a la apoptosis de células endoteliales y otras células vasculares inducida por esta enzima lo que jugaría un rol importante en este proceso, según lo reportado por Souza et al. (1999) y la LAAO del veneno de *B. alternatus* que mostró ligera actividad con dosis de 100 µg /animal (Stabeli et al., 2004).

11.2 AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Las enfermedades cardiovasculares amenazan la salud humana seriamente. La terapia plaquetaria juega un rol importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares, sin embargo pocas drogas están disponibles para su uso clínico debido a ser muy tóxicas y serios efectos colaterales. Las SVLAAOs muestran un significativo efecto sobre la agregación plaquetaria, algunas pueden inhibir la agregación mientras que otras pueden inducirla. El primer reporte del efecto de las LAAOs sobre la agregación plaquetaria fue hecho por Nathan et al.(1982), quienes demostraron que la LAAO del veneno de *Echis colorata* inhibía esta actividad inducida por ristocetina y trombina, asumiendo que el peróxido de hidrógeno producido por LAAO jugaba un rol importante en

la inhibición de la agregación plaquetaria. La adición de catalasa, inhibía completamente este efecto. Más tarde Li et al.(1994), purificaron LAAO de la serpiente *Ophiophagus hannah* y descubrieron que esta proteína inducía completamente la agregación plaquetaria. El efecto de la enzima que inducía la agregación fue totalmente anulado por la adición de catalasa. Las funciones de activación o inhibición de las LAAOs de venenos de serpientes sobre las plaquetas están fuertemente asociadas a su habilidad de producir peróxido de hidrógeno, ya que la catalasa inhibe estos efectos.

A pesar de todo ello, hasta la fecha sigue reportándose el efecto ambiguo de SV-LAAO sobre la agregación plaquetaria. Así tenemos que LAAOs de los venenos de *Bothrops moojeni* (Stabeli et al., 2007), *Bothrops alternatus* (Stabeli et al., 2004), *Bothrops atrox* (Alves et al., 2008), *B. pauloensis* (Rodrigues et al., 2009), *Trimeresurus mucrosquamatus* (Wei et al., 2003), *Trimeresurus jerdonii* (Lu et al., 2002), *Eristocophis macmahoni* (Ali et al., 2000), *Crotalus durissus cascavella* (Toyama et al., 2006), *Bothrops pirajai* (Izidoro et al., 2006) y *Ophiophagus hannah* (Li et al., 1994) inducen la agregación plaquetaria de una manera dosis dependiente, la cual fue anulada por adición de catalasa e inhibida por indometacina y aspirina. LAAO de *O. hannah* induce agregación siguiente a la producción de H₂O₂ y subsecuente síntesis de tromboxano A₂ requiriendo calcio sin la dependencia de liberación de ADP (El ADP induce incremento de calcio libre en el citoplasma), Tan y Saifuddin, 1989. Estos resultados implican que el H₂O₂ generado estaría involucrado en la subsecuente acción de agregación plaquetaria; mientras que las LAAOs de los venenos de *Vipera berus berus* (Samel et al., 2006), *Vipera lebetina* (Tonismagi et al., 2006), *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* (Sun et al., 2010), *Agkistrodon halys blomhoffii* (Sakurai et al., 2003), *Agkistrodon halys pallas* (Liu et al., 2002), *Naja naja oxiana* (Samel et al., 2008) y *Naja naja kaouthia* (Sakurai et al., 2001), inhiben la agregación plaquetaria. Estas enzimas inhiben ADP, TMVA (agregoserpentina del veneno de *T. mucrosquamatus*) o la agregación plaquetaria inducida por colágeno de una

manera dosis dependiente. LAAO de *A. blomhoffii ussurensis* mostró el efecto inhibitorio sobre plaquetas humanas y de conejos; con 66,7 µg/ml inhibe la agregación en 30,3% y 73,6% respectivamente. La diferencia en eficacia inhibitoria usando plaquetas de origen animal como modelo experimental para estudios sobre plaquetas humanas debería ser cuidadosamente reconsiderado (Sun et al., 2010). La adición de catalasa anuló la inhibición de la agregación, indicando que el efecto es atribuido al H₂O₂ producido por la enzima durante la oxidación.

Con el propósito de analizar apropiadamente los mecanismos de todo lo antes mencionado, es necesario recordar que las plaquetas, son cuerpos pequeños que contienen dos tipos de gránulos: gránulos densos que contienen ADP, ATP, serotonina y Ca²⁺ y los gránulos α que contienen factores coagulantes y otras proteínas. Tienen una extensa membrana invaginada con un intrincado sistema de canalículos en contacto con el líquido extracelular. Pueden cambiar de forma, reunirse en el sitio de la lesión (agregación plaquetaria) y descargar el contenido de sus gránulos a través de los canalículos (liberación plaquetaria).

Cuando las paredes de los vasos sanguíneos se dañan, las plaquetas se adhieren al colágeno expuesto. La adhesión y agregación va seguida por la liberación. La serotonina probablemente contribuye a la vasoconstricción producida en el sitio de la lesión y el ADP promueve la liberación del contenido de los gránulos de otras plaquetas. El ADP hace pegajosas a las plaquetas y causa que otras se agreguen formando el tapón hemostático.

Un segundo mecanismo se explicaría en el hecho de que muchos agentes que provocan agregación activan la fosfolipasa A₂ en la membrana de la plaqueta. Esto provoca la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos de la membrana y el ácido araquidónico se convierte en tromboxana A₂ lo cual causa aglutinación y liberación.

Un tercer mecanismo que produce agregación y liberación independiente de los tromboxanos y del ADP es activado por la trombina (Ganong, 1982).

Toyama et al., 2006, reportaron que la actividad que induce agregación fue inhibida por los inhibidores de la ruta de la ciclo oxigenasa tales como: la aspirina, e indometacina que inhiben la agregación, al inhibir la formación de tromboxana ya que inhibe la ciclo oxigenasa y no se genera PGG₂, lo que sugiere que la liberación de H₂O₂ permite la activación de las enzimas inflamatorias (Du y Clemetson, 2002). Aunque el tromboxano A₂ es uno de los principales productos del metabolismo del ácido araquidónico en las plaquetas, las paredes de los vasos sanguíneos contienen abundante sintetasa de la prostaciclina que permite la formación de cantidades relativamente grandes de prostaciclina.

La prostaciclina inhibe la agregación de las plaquetas y consecuentemente inhibe la formación de trombos. La agregación predomina en las cercanías de la lesión pero parte de los endoperóxidos que se forman a partir de las plaquetas son convertidos en prostaciclina en la pared del vaso sanguíneo vecino, manteniendo circunscrito el tapón de plaquetas y evitando la agregación excesiva. Las prostaglandinas se sintetizan por medio de los endoperóxidos a partir de ácidos grasos insaturados que se encuentran en los fosfolípidos de las membranas celulares de todas las células. En los humanos el principal precursor de las prostaglandinas es el ácido araquidónico, este es convertido a endoperóxido PGG₂ por medio de la enzima ciclooxigenasa y de allí a prostaglandina. Otra ruta es a partir del endoperóxido PGG₂ por medio de la sintetasa de prostaciclina a prostaglandina. Y por último por medio de una sintetasa de tromboxano el endoperóxido PGG₂ es convertido a tromboxano A₂. La prostaciclina inhibe la agregación paquetaria y los tromboxano la aumentan.

El colágeno a través de las plaquetas, las cuales se adhieren y liberan serotonina y ADP, este último atrae rápidamente a otras plaquetas y se forma un tapón laxo de plaquetas agregadas.

En los venenos de vipéridos, usando creatina fosfato, un sistema liberador de ADP no inhibe la agregación plaquetaria inducida por LAAO. Esto muestra que LAAO que induce agregación es independiente de la liberación de ADP por las plaquetas.

Mepacrine, un inhibidor de la activación de la fosfolipasa A₂ endógena, inhibe completamente el efecto tóxico inducido por LAAO. Por lo tanto se muestra claramente que la activación de las fosfolipasas endógenas son necesarias para el proceso de agregación. EDTA un quelante de los iones calcio y verapamil un inhibidor de la afluencia de calcio, inhiben la LAAO que induce la agregación de plaquetas. La prostaglandina E₁ que es un activador de la adenilato ciclasa y el activador nitroprusido de sodio, activador de la guanilato ciclasa completamente soluble, inhiben LAAO que induce los efectos de agregación por incremento de concentraciones de AMP y GMP ciclico, debido a que inhiben la movilización de calcio, el cual se requiere para la agregación plaquetaria durante la síntesis de tromboxano A₂ (Li et al., 1994).

La integrina y el fibrinógeno no interactúan por continua generación de H₂O₂ (Du y Clemetson, 2002). Hay venenos que presentan desintegrinas que tienen una región Arg-Gli-Asp (RGD) que se unen a la integrina αIIbβ₃ de las plaquetas, causando inhibición de la agregación pues ya no se unen al factor de von Willebrand, fibrinógeno para tener adhesividad celular.

En general SV-LAAOs inducen la agregación plaquetaria por formación de peróxido de hidrógeno, el cual activa el tromboxano A₂ seguido de la activación de las ciclooxigenasas, las cuales son prerequisites para la agregación plaquetaria. Estos estudios implican que el peróxido de hidrógeno estaría involucrado en la acción inflamatoria con la subsecuente síntesis de tromboxano A₂, requiriendo Ca²⁺ sin la dependencia de liberación de ADP.

Por el contrario LAAOs de *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*, *A. halys blomhoffii*, *A. halys pallas*, *Vipera lebetina*, *V. berus berus*, *Naja naja oxiana* y *N. naja kaouthia* inhiben de una manera dosis dependiente la agregación plaquetaria inducida por el agonista y por el shear stress (Sun et al., 2010; Sakurai et al., 2003; Liu et al., 2002; Tonismagi et al., 2006; Samel et al., 2006; Samel et al., 2008; Sakurai et al., 2001). Un mecanismo para la inhibición de la agregación plaquetaria puede estar relacionado con una débil unión del ADP en las plaquetas expuestas a H₂O₂ o la interferencia del peróxido en la interacción entre la integrina plaquetaria activada (GPIIb/IIIa) y el fibrinógeno (Takatsuka et al., 2001; Samel et al., 2006).

LAAO de *A. halys blomhoffii* podía inhibir al agonista y al shear stress que indujo los efectos de la agregación plaquetaria de una manera dependiente de la concentración. La adición de catalasa anula este efecto. El shear stress y el agonista indujeron los efectos de la agregación plaquetaria y son debidos a la continua interacción de la integrina de plaquetas alphaIIb/beta3 y el fibrinógeno. La continua generación de peróxido de hidrógeno producido por LAAO inhiben la interacción entre la integrina de plaqueta alphaIIb/beta3 y fibrinógeno y de allí que generan la inhibición de la agregación plaquetaria.

Sakurai et al., 2001 examinó el efecto de LAAO del veneno de *Naja naja kaouthia* sobre la función plaquetaria. Ellos notaron que LAAO a concentraciones variadas no indujo agregación. También fue observado para LAAO de *Vipera berus berus* (Samel et al., 2006), para *Vipera lebetina* (Tonismagi et al., 2006), *Agkistrodon halys blomhoffii* (Sakurai et al., 2001) *A. halys pallas* (Liu et al., 2002) *Naja naja oxiana* (Samel et al., 2008) y *Naja naja kaouthia* (Sakurai et al., 2001). Todos ellos encontraron que LAAO inhibía la inducción generada por ADP, ristocetina, TMVA o colágeno de una manera dosis dependiente. *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* (Sun et al., 2010) también mostró este efecto sobre plaquetas humanas y de conejos a una concentración de 66,7 µg/ml en un 30,3 y 73,6% respectivamente. La adición de catalasa

anula completamente el evento de inhibición de la agregación plaquetaria. Estos resultados indican que el peróxido de hidrógeno producido por la enzima es el principal agente causal de los efectos plaquetarios.

Nuestros resultados mostraron que BpicLAAO no induce la agregación a una concentración final de 1 a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 18). BpicLAAO inhibe la agregación de PRP inducido por ADP de una manera dosis-dependiente. La máxima agregación de plaquetas tomada como 100% fue obtenida con ADP (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el efecto se comparó con los valores obtenidos para BpicLAAO. La IC_{50} para la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ADP fue estimada en 3,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 19), en comparación a la de *Protobothrops elegans* de 7,73 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Oyama et al., 2009), *Ophiophagus hannah* 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Li et al., 1994), *Bothrops leucurus* 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Naumann et al., 2011), *Daboia russelli siamensis* 32,53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Zhong et al., 2009), lo que evidenció ser dos veces más potente que *P. elegans*, seis veces más potente que *O. hannah*, ocho veces más que *B. leucurus* y 10 veces más que *D. russelli siamensis*.

La disminución de la agregación inducida por ADP puede ser restaurada por la adición de catalasa de 0,01 a 0,1 mg/ml (Figura 20). Esto está de acuerdo a lo encontrado por Sakurai et al.(2001), para LAAO de *A. halys blomhoffii* que tampoco inducía agregación a una concentración final de 0,8 a 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el efecto fue restaurado por adición de 0,1 mg/ml de catalasa.

Como no está totalmente esclarecida la función del H_2O_2 en SVLAAOs ya que, por un lado inducen y por otro inhiben la agregación plaquetaria, La producción de H_2O_2 podría no ser completamente responsable para las actividades biológicas de SVLAAOs.

SVLAAOs podrían afectar la agregación de plaquetas por uno o más mecanismos mencionados anteriormente, sin embargo, mecanismos de reacción desconocidos no pueden excluir las acciones de SVLAAOs sobre las plaquetas y los avances en su dilucidación darán luz y proveerán base

experimental para las aplicaciones clínicas de SVLAAOs en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Adicionalmente Pignatelli et al. (1998) reportaron que ADP y trombina no provocan formación de H_2O_2 mientras que el H_2O_2 está implicado en la activación plaquetaria inducida por colágeno, lo cual es inhibido por catalasa. Esto demuestra que el H_2O_2 producido por las plaquetas y estimuladas por el colágeno actúan como un segundo mensajero para activar el metabolismo del ácido araquidónico y la ruta de la fosfolipasa C. Por lo tanto, la investigación futura debe estar dirigida a los mecanismos de activación plaquetaria por SVLAAOs y especialmente la exploración de los sitios de unión.

11.3 EFECTO ANTIBACTERIANO

Tanto el veneno crudo como la enzima purificada del veneno de *B. pictus* mostraron efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Dicho efecto fue evidente con bacterias Gram positivas y Gram negativas (Tabla 6, Figura 21)

La incubación de LAAO con varias bacterias induce la inhibición del crecimiento y el diámetro del halo inhibitorio formado varía de una especie a otra. Esto puede ser atribuido a la sensibilidad de la bacteria. El halo de inhibición del crecimiento bacteriano formado por LAAO mostró ser dependiente de la concentración, así el diámetro del halo de inhibición se incrementa en paralelo con el incremento en la concentración de LAAO.

Como se muestra en la tabla 6, figura 21, diferentes tipos de bacteria mostraron diámetros variables de halos de inhibición. El H_2O_2 producido por LAAO fue el principal factor responsable para la actividad antibacteriana. Esto fue corroborado por el hecho que la adición de catalasa redujo completamente la

toxicidad de LAAO, lo que podría ser atribuído a que la catalasa actuaría sobre el H_2O_2 descomponiéndolo en agua y oxígeno (Figura 22).

Bajo esta perspectiva el efecto antibacteriano sobre *E. faecalis* se entiende por ser esta bacteria catalasa negativa, teniendo en cuenta que el peróxido de hidrógeno es necesario para la acción antibacteriana y que Toyama et al., 2006; Wei et al., 2002; Stiles et al., 1991, Lu et al., 2002 observaron que la acción antimicrobiana de las SVLAAOs es significativamente reducida por la adición de catalasa, esto indica la importancia del H_2O_2 como subproducto de la acción enzimática.

Se sabe que el H_2O_2 induce la ruptura de la membrana bacteriana y consecuentemente el extravasamiento del contenido citoplasmático. Ehara et al. (2002), reportaron que esta acción puede ocurrir debido a la capacidad de unión de la LAAO a la membrana bacteriana. Asimismo el efecto de LAAO sobre *Staphylococcus aureus*, bacteria que es catalasa positiva, puede deberse a que esta bacteria no produce suficiente cantidad de catalasa durante su crecimiento lo que no le permitiría contrarrestar la producción de H_2O_2 formado por la enzima y por lo tanto la enzima actuaría como un agente bactericida puesto que sería fuertemente oxidante, ya que en altas concentraciones causaría inestabilidad a nivel de la membrana celular. Las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa* a pesar de ser catalasas positivas son bacterias Gram negativas, presentando por tanto diferencias estructurales en sus paredes celulares. Las células pueden impedir el pasaje de H_2O_2 a través de la misma.

Costa et al., 2010, trabajando con LAAO de *B. leucurus* reportaron que no presentó capacidad inhibitoria sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Salmonella choleraesuis*, por lo que en este caso se considera que LAAO no formaría H_2O_2 en cantidades suficientes a las concentraciones de 6,25 -100 $\mu\text{g/ml}$, usadas por los autores.

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*.

Ciscotto et al. (2009), evidenciaron que los venenos de *Bothrops jararaca* y *Bothrops jararacussu* son potentes sobre *S. aureus*, presentando un espectro de acción amplio sobre bacterias Gram positivas y gram negativas. Sin embargo las bacterias *E. coli* y *E. faecalis* presentaron resistencia. LAAO de *B. pirajai* inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli* (Izidoro et al., 2006). La acción antibactericida también ha sido descrita para la LAAO de *B. alternatus* (Stabeli et al., 2004).

Las SVLAAO obtenidas de los venenos del género *Bothrops* tienen relevante efecto antibacteriano. Samy et al. (2007) demostraron el efecto antibacteriano de LAAO aislada del veneno de *C. adamanteus* y *B. asper* sobre *S. aureus* y *Proteus mirabilis*. Lu et al. (2002), usando la metodología de Stiles et al. (1991) verificaron que LAAO de *Pseudechis australis* presentó inhibición del crecimiento de *Aeromonas hydrophila*, la de *Trimeresurus jerdonii* mostró actividad bactericida sobre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Bacillus megaterium*.

Por su parte Wei et al. (2002) reportaron que LAAO del veneno de *T. mucrosquamatus* inhibió el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus dysenteriae*. Este efecto fue anulado por catalasa, evidenciando que el H₂O₂ estaba involucrado en el efecto antibacteriano, tal como se observó en nuestra investigación con BpicLAAO.

Stiles et al. (1991), también reportaron a través de ensayos cromatográficos relacionados a actividad antibacteriana de *N. naja atra*, *N. nigricollis*, *N. haje haje* y *P. australis*; se registra este efecto en venenos amarillos y en 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 LAAO que usualmente tienen pesos moleculares superiores a 100 kDa.

A la fecha no se conoce con precisión el mecanismo de acción de la enzima LAAO 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 se reoxida para producir H_2O_2 . Por todo ello al H_2O_2 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 fuertes inhibidores (Barker, 1975).

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 nuestro caso con BpicLAAO utilizando 6 μg se produjo un halo de 15 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 BpicLAAO purificada, se encontró que con 12 µg sobre *S. aureus*, *V. cholerae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, se produjeron halos de inhibición de 19, 18, 20, 19 y 15 mm respectivamente.

Así mismo los resultados obtenidos, son similares a los reportados por Yarlequé et al. (1997), para el veneno crudo y LAAO de *L. muta* 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. La misma 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. pictus* tiene un mayor efecto antibacteriano sobre *E. faecalis*, en tanto que en los otros venenos de serpientes peruanas se registró menor actividad.

Adicionalmente se midió la actividad LAAO de la enzima en los cultivos bacterianos de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en presencia de catalasa, observando que la actividad antibacteriana se inhibía (Figura 22).

De acuerdo con todo lo señalado, existen venenos de diferentes especies de serpientes que habitan en diversas regiones del mundo, los cuales contienen LAAO, tal como se muestra en la Tabla 13. 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 13 que los

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

El color amarillo en el veneno, que está en relación con la presencia de LAAO 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 LAAO 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 una de las 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 como consecuencia de la actividad de LAAO.

Ande et al. (2006), encontraron que la cantidad de H_2O_2 producido por LAAO de *Calloselasma rhodostoma* fue de $\approx 50 \mu M$. Cuando comparó su toxicidad con la de H_2O_2 externo, necesitó de éste último, alrededor de $100 \mu M$ para inhibir 50% el crecimiento bacteriano.

Tabla 13. Efecto antibacteriano de diferentes venenos de serpientes por el método de difusión en disco.

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*

Pero LAAO produce sólo 50 µM y esta cantidad no podría ser efectiva en una inhibición del 50% de crecimiento bacteriano. Esto indica que podría haber otro mecanismo involucrado para la inducción de actividad antibacteriana de LAAO. Estudios recientes indican que existe un homólogo de LAAO, es una proteína antibacteriana purificada de la mucosidad del caracol gigante *Achatina fulica*, es

muy efectivo en inducir la actividad antibacterial por generación de H_2O_2 en el medio pero además, por unirse a la célula en la fase de crecimiento de la bacteria y produciendo una generación local de peróxido de hidrógeno. Esta unión permitiría la generación de concentraciones mayores de peróxido de hidrógeno en la célula por acumulación y de ese modo efectuaría su actividad antibacterial. (Ehara et al., 2002) Se ha reportado que LAAO contiene ácidos siálicos terminales y esto puede ayudar como agentes de anclaje a la pared celular.

Otro hecho interesante podría ser mirar a la célula bacteriana después del tratamiento con peróxido de hidrógeno y LAAO para ver si hay diferencias en la forma de la bacteria. Esto debido a que ha sido reportado que células bacterianas tratadas con LAAO han incrementado su longitud y no ocurre cuando las bacterias son tratadas con peróxido de hidrógeno de origen externo (Otsuka-Fuchino et al., 1993).

Finalmente estudios de microscopía electrónica, demostraron que el peróxido de hidrógeno producido por LAAO puede causar ruptura de la membrana celular de la bacteria y desorganizar o liberar el contenido plasmático fuera de la célula, trayendo consigo la muerte celular (Toyama et al., 2006; Mitsuru et al., 2003), demostraron que la reducción de aminoácidos del medio puede potenciar la actividad antibacterial. En el presente trabajo de investigación pues la adición de catalasa anula completamente la toxicidad hacia las bacterias. Investigaciones futuras deberán proveer más información sobre el complejo mecanismo de la actividad antibacterial de LAAO.

12. ANTIGENICIDAD

Los venenos ofídicos en general, son compuestos fuertemente antigénicos debido a su elevado contenido proteico; la mayoría de estas proteínas tienen pesos moleculares mayores a 20 kDa. En este caso se demostró mediante ensayos de inmunodifusión e inmunoelectroforesis (Figura 23), la antigenicidad de BpicLAAO

frente al suero antibotrópico polivalente. Dicha propiedad también ha sido demostrada para LAAO de otros venenos tales como *C. adamanteus* (De Kok y Rawitch, 1969), *L. muta* (Sánchez y Mahalgaes, 1991), *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 132,27 kDa, con lo que se aumenta la probabilidad de expresar mayor cantidad de determinantes antigénicos y a su naturaleza glicoproteíca, ya que a una mayor complejidad de la molécula corresponde una mayor respuesta inmunológica.

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 BpicLAAO, demostrándose la reactividad antigénica cruzada de la enzima en estudio. Dicha reactividad cruzada ha sido también demostrada por ELISA indirecto, de varios venenos crotálidos y elápidos con anticuerpos preparados contra las LAAO de *O. hannah* y *C. rhodostoma* (Tan et al., 1993; Tan y Ponnudurai, 1994).

Si bien es cierto, las SV-LAAOs son antigénicamente similares, se ha reportado que anticuerpos para la LAAO del veneno de *O. hannah* evidenció reacciones cruzadas (mediante ELISA indirecto), con neurotoxina, hemorragina y fosfolipasa A₂ aislada del mismo veneno, indicando que LAAO participa compartiendo epitopes comunes aún con proteínas no relacionadas (Tan et al., 1993). Esto también fue corroborado por Stabeli et al., 2004, quienes reportaron que anticuerpos para una homoserina lactona derivada del péptido de 11 residuos: IQRWSLDKYAM (Ile¹ – Hse¹¹), cortado de LAAO de *B. moojeni* tuvo reacción cruzada con algunas serino proteasas, fosfolipasas homólogas y SV-LAAOs de los géneros: *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus*. Por tanto la hipótesis planteada es que la reactividad cruzada de los anticuerpos Ile¹-Hse¹¹ para proteínas no relacionadas de veneno, derivan de su mecanismo de reconocimiento del antígeno, por medio del cual la complementaridad se logra a través de

adaptaciones conformacionales recíprocas de las moléculas reaccionantes (Tan y Fung, 2010).

Es importante también señalar que aún cuando las acciones tóxicas de SVLAAOs son atribuidas principalmente a la producción de H_2O_2 liberado durante la oxidación, la toxicidad propia de esta enzima y su mecanismo aún no está del todo aclarado por lo que se requieren nuevas investigaciones.

13. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD L-AMINOÁCIDO OXIDASA

Los ensayos de neutralización *in vitro* del suero antibotrópico polivalente, mostraron que tiene una alta capacidad neutralizante sobre LAAO presente en el veneno total, de 90 y 100% respectivamente cuando se utiliza una y dos dosis neutralizantes, Figura 24 A. Por su parte la enzima purificada enfrentada con $\frac{1}{2}$ dosis fue ligeramente afectada (27%) en tanto que, al emplearse una y dos dosis neutralizantes, la actividad fue inhibida en 96 y 98% respectivamente (Figura 24 B).

Zeller en 1966 reportó que pese a que el suero monoespecífico para el veneno de *Vipera ammodytes* ofrecía protección contra la acción letal del veneno, la inhibición de la actividad de la L-aminoácido oxidasa sólo fue de 36%. Los mismos resultados obtuvieron Wellner 1966 y Shaham (1973) al enfrentar sueros anti L-aminoácido oxidasa de *Crotalus adamanteus* y *Vipera palestinae* respectivamente contra la enzima; en ambos casos la acción catalítica no fue inhibida. Nosotros en este trabajo mostramos que el suero proporcionado por el INS es efectivo para LAAO presente en el veneno total, sólo con una y dos dosis neutralizantes, más no con la dilución de $\frac{1}{2}$ dosis; En cambio la BpicLAAO fue inhibida casi totalmente usando una y dos dosis neutralizantes. Aunque la inhibición *in vitro* de la enzima presente en el veneno total por el suero antibotrópico es sólo con una y dos dosis neutralizantes, esto no quiere decir que el suero no pueda proteger *in vivo* de la posible acción tóxica de la enzima, así tenemos el caso de la ureasa

cuyo antisuero sólo la inhibe en un 20% *in vitro*, sin embargo, *in vivo* protege totalmente a los animales de su acción tóxica (Zimmerman et al., 1971).

14. ANÁLISIS MOLECULAR

Al igual que los componentes proteicos que participan en el envenenamiento, las LAAOs son codificadas en las glándulas del veneno, por este motivo, los estudios sobre transcriptomas de los principios activos presentes en los venenos conllevaban al sacrificio de especímenes para la obtención de dichas glándulas. Sin embargo se ha demostrado que es posible la obtención de RNAs a partir de la extracción del veneno fresco, sin este requerimiento. En este punto es importante señalar que debido a los peligros que genera la ampliación poblacional, *B. pictus* está considerada actualmente entre las especies vulnerables y en peligro de extinción tanto por la pérdida de su hábitat, como por la matanza indiscriminada por lugareños y trabajadores que temen ser atacados por esta serpiente.

Obtención de los mRNA

Tal como se describió en el acápite correspondiente, es posible obtener mRNA a partir del veneno recién extraído de las glándulas, utilizando el kit ya mencionado, con lo que se evita su degradación principalmente por la ribonucleasas, que dicho sea de paso son enzimas de alta eficiencia para atacar estas macromoléculas y con una alta resistencia térmica. Con este procedimiento, se hace más fácil obtener las secuencias génicas ribonucleotídicas y transferirlas a los cDNA respectivos.

Alineamiento de la secuencia nucleotídica

La secuencia nucleotídica de BpicLAAO, mostró una alta homología con secuencias codificantes para las SVLAAOs. En la tabla 8, se muestran las

especies cuyas secuencias presentaron más semejanza con la de *B. pictus*, obteniendo un 98% de identidad con la LAAO de *Bothrops moojeni*, 97% con la LAAO de *Bothriopsis neuwiedi pauloensis*, 97% con la LAAO de *Bothrops jararacussu*, 93% con la LAAO de *Lachesis muta* y 93% con la enzima de *Agkistrodon blomhoffii*. Por tanto podemos considerar idónea la técnica empleada, la cual nos ha permitido establecer este alto grado de homología con otras SVLAAOs.

Secuencia aminoacídica de la BpicLAAO

La secuencia de aminoácidos correspondiente a la enzima de interés fue deducida por el análisis de Expressed Sequence Tags, ESTs, traducidos tanto con el programa ORF Finder como por Translate tool, resultando en ambos casos una secuencia de 498 aminoácidos, siendo los primeros once aminoácidos residuos que corresponden a la parte C-terminal del péptido señal dejando una proteína madura de 487 aminoácidos (Figura26); valor cercano a la de *B. jararacussu* (473 residuos aminoacídicos) y la de *A. halys blomhoffii* con una secuencia de 504 residuos de aminoácidos de los cuales 18 corresponden al péptido señal, y 486 a la proteína madura (Takatsuka et al., 2001).

Al ser evaluada por el algoritmo BLASTp, la secuencia de aminoácidos mostró una alta homología con las enzimas del grupo de amino oxidasas, específicamente con las SVLAAOs, siendo la LAAO de *Bothrops pauloensis* la que posee la mayor semejanza (Tabla 9).

Así mismo LAAOs clonadas de las serpientes *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox*, *Calloselasma rhodostoma*, *Agkistrodon halys blomhoffii*, *Trimeresurus stejnegeri* y *Bothrops moojeni* mostraron una secuencia homogénea de ~80% (Rodrigues et al., 2009).

En cuanto a la comparación de los posibles tripletes de bases codificadoras de aminoácidos de BpicLAAO (codón usage) de SVLAAOs fue elaborada a partir de comparaciones de las secuencias de nucleótidos de *Bothrops pauloensis* y *Calloselasma rhodostoma*, habiendo preferencia de BpicLAAO en el uso de codón para alanina, prolina y ácido glutámico (Tabla 10).

El análisis bioinformático mediante el programa Protparam(<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>), muestra que la secuencia compone una proteína de peso molecular de 55,28 kDa con un punto isoeléctrico de 5,75 que determina el carácter ácido del esqueleto proteico cuya composición de aminoácidos se detalla en la tabla 10. Así mismo en base a resultados previos sobre la presencia de carbohidratos ligados a la proteína, se realizó una búsqueda de motivos de glicosilación cuyos resultados se detallan en las Figuras 26 y 28. Dos sitios conservados a los residuos de asparragina en las posiciones 172 y 192 que siguen el patrón N-X-S y un sitio con una mutación (P-T) en el sitio formado por los residuos N₃₆₁F₃₆₂P₃₆₃. Esto mismo fue reportado por França et al., 2007 para las LAAOs de los venenos de *B. moojeni* y *B. jararacussu*, estos resultados muestran la conservación de regiones importantes para la actividad enzimática.

Identificación molecular de BpicLAAO

La secuencia obtenida a partir del análisis del CDNA fue comparada también con los 23 primeros aminoácidos: ADDRN PLEEC FRET D YEEFL EIA, de la región N- terminal obtenida por secuenciación directa de la proteína para otras especies. En el análisis es congruente la secuencia ADDRN PL que son los primeros aminoácidos de la proteína madura hallados en la mayoría de LAAOs como se muestra en la Figura 26. Con respecto a las secuencias aminoacídicas del extremo N-terminal muchas han sido elucidadas y son muy similares los primeros 23 aminoácidos

conservados en SVLAAOs, (a excepción de la LAAO de *Ophiophagus hannah* (HVI-N-LEESFQEPEYXNHL), mostrando la presencia de un motivo altamente conservado rico en ácido glutámico (Figuras 26 y 28) el cual jugaría un rol importante en la unión al sustrato (Stabeli et al., 2007; Toyama et al., 2006; Wei et al., 2003; Moustafa et al., 2006).

La estructura de BpicLAAO, revela también lo anterior constituyendo estos primeros residuos de aminoácidos, una parte del dominio de unión al sustrato y también rico en ácido glutámico (Figura 28), esto mismo fue reportado para las LAAOs de los venenos de *B. alternatus* (Stabeli, et al., 2004) en donde al menos nueve de veinte aminoácidos principalmente son ácido glutámico y para *C. rhodostoma* que presenta los residuos del 5 al 25 totalmente conservados en todas las secuencias.

De la comparación de las secuencias N-terminal de LAAOs al menos 13 de 24 aminoácidos fueron encontrados altamente conservados en todas las secuencias, sugiriendo que estos aminoácidos juegan un rol importante en la unión al sustrato (Izidoro et al., 2006). Se detectó también la presencia de metionina en el sitio 43 para los venenos de *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. pauloensis*, *L. muta* y *B. pictus* (Figura 28), mostrando un sitio altamente conservado, esto también fue observado para la LAAO del veneno de *Crotalus durissus cascavella* (Toyama et al., 2006).

Comparando las secuencias del extremo N-terminal de BpicLAAO con otras LAAOS de venenos de otras serpientes como *E. macmahoni*, *C. atrox*, *C. adamanteus*, *T. flavoviridis*, *C. rhodostoma* y *A. contortrix laticinctus*, se revela hasta ahora que son secuencias con homología cercana.

La composición de aminoácidos de BpicLAAO no difiere sustancialmente de otras SVLAAOs y es bien caracterizada por el alto contenido de asparragina y ácido aspártico (N y D), glutamina y ácido glutámico (Q y E)

y la presencia de bajo contenido de metionina y triptófano (M y W). Sin embargo mayores diferencias han sido encontradas al estudiar los contenidos de cisteína (C), lo cual puede indicar la posible variación en la estructura terciaria de todas las SVLAAOs (Ali et al., 2000). Consecuentemente estos residuos estarían probablemente más involucrados en el reconocimiento de sitios específicos y/o moléculas por incremento de unión al substrato y desde luego la potencia de actividades biológicas de LAAOs (Rodrigues et al., 2009).

La BpicLAAO posee 6 residuos de cisteína en posición conservada con respecto a otras LAAOs estudiadas, estos aminoácidos estarían involucrados en la formación de puentes disulfuro. En base a la estructura cristalizada de *C. rhodostoma*, los pares de residuos de cisteínas predichos para la formación de enlaces disulfuro serían C₁₀, C₁₇₃, C₂₉₃, C₃₃₁, C₃₈₉ y C₄₁₂ (Figura 28).

La estructura secundaria de la proteína, determinada por el programa Protparam reveló que muestra un 31,83% de alfa hélice, 20,94% de hebra extendida y 23% de random coil (Figura 29) lo que difiere de lo encontrado para LAAO del veneno de *E. macmahoni*: 49% de alfa hélice, 19% de hebra extendida y 22% de random coil. Del mismo modo Izidoro et al. (2006), determinaron que la estructura secundaria de LAAO de *Bothrops pirajai* contiene 48% de α -hélice, 20% de hebra extendida y 20%, de estructura de random coil.

RebO, una L-aminoácido oxidasa producida por la bacteria *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243 tiene 27% de identidad con la LAAO de *Scomber japonicus* "caballa" y es un miembro de la familia de las enzimas oxidadas FAD dependientes (Tomoyasu et al., 2005), basados en el alineamiento de sus aminoácidos con varias LAAOs y monooxigenasas, mostraron un motivo conservado en el extremo N-terminal de $\beta\alpha\beta$ - unido al

dinucleótido - G-X-G-X-X-G-X-X-X-[G/A], el cual es un sitio de unión a FAD típico para amino oxidasas de esta clase, y un motivo GG. Este motivo de unión a dinucleótido y el doblete GG aparecen en varias familias de flavoproteínas. Es interesante remarcar el hecho que BpicLAAO, también muestra ambos motivos en el dominio de unión al FAD en el extremo N-terminal (Figura 28), lo que confirma su fuerte similaridad de esta enzima con otras LAAOs.

Pawelek et al. (2000), presentaron la estructura cristalizada de LAAO de *C. rhodostoma* obtenida con rayos X de alta resolución y determinaron que la estructura de la LAAO es un dímero funcional. Cada subunidad está compuesta por 15 alfa hélices y veintidos hebras beta que se pliegan en tres dominios bien definidos: el dominio de unión al FAD, dominio de unión al sustrato y el dominio helicoidal. Un profundo surco se localiza en la interfase entre el dominio de unión al sustrato y el dominio helicoidal, permitiendo al sustrato acceso al sitio activo. El dominio de unión al FAD es similar a aquellas LAAOs encontradas en humanos, bacteria y hongos y es encontrado ser importante para la actividad enzimática (França et al., 2007; Mandal y Bhattacharyya, 2008; Moustafa et al., 2006).

BpicLAAO, es una proteína que también presenta estos tres dominios: El dominio de unión al FAD consiste de tres regiones discontinuas en su estructura: residuos 36-71, 241-319 y 446-486; el dominio de unión al sustrato: residuos 1-27, 75-130, 231-239 y 321-444 y el dominio helicoidal con residuos: 132-329, (Tabla 12).

França et al. (2007), reportaron que LAAO del veneno de *B. moojeni* contiene un alto número de residuos aminoácidos mutados cuando se compara con la estructura de LAAO de *C. rhodostoma*, así en el dominio de unión al FAD (residuos 35-64, 242-318 y 446-471); cerca de 17,5% de los residuos de esta región son diferentes comparados a los de la LAAO de *C. rhodostoma*, en donde la principal característica estructural en el

dominio de unión al FAD, consiste de (residuos 35-64, 242-318 y 446-486) tratándose de una hoja B-plegada de seis hebras, intercalado entre tres alfa-hélices y una hoja B-plegada de cuatro fibras. Este motivo constituye el pliegue de nucleótidos vinculante clásico visto en muchas enzimas de unión al FAD.

Además los otros dos dominios principales y funcionales comparados con la LAAO de *C. rhodostoma* son: los sitios de unión al sustrato (residuos 5-25, 73-129, 233-236 y 323-420) y el dominio helicoidal (residuos: 130-230), habiendo detectado que sólo 12,8 y 9,9% de residuos son mutados respectivamente. Con respecto a los residuos encontrados para BpicLAAO tenemos: el dominio de unión al FAD (residuos 36-71, 241-319, 446-486); dominio de unión al sustrato (residuos 1-27, 75-130, 231-239, 321-444), dominio helicoidal: (132-229).

Pawelek et al.(2000), también identificaron en la estructura de LAAO de *C. rhodostoma* algunos residuos importantes involucrados en la estabilización de la molécula del FAD y en la orientación de un inhibidor del sitio activo de esta enzima. La cadena lateral de los residuos Glu63, Arg71 y Glu457 interactúan con la molécula del FAD, el anillo dimetilbenceno del FAD está rodeado por los residuos hidrofóbicos Ile374, Trp420 e Ile430. Comparaciones entre la LAAO de *C. rhodostoma* con la estructura de las D-aminoácido oxidasas de mamíferos revelan diferencias significantes en sus modos de entrada del sustrato. Moustafa et al. (2006), informaron de una estructura por rayos X de alta resolución de la LAAO de *C. rhodostoma* con su sustrato L-fenilalanina, los datos revelaron un dinámico sitio activo, como cambios conformacionales evidentes para el anillo isoaloxazina. Hay un sistema de canal en forma de “Y”, extendido desde la superficie externa de la proteína al sitio activo. Los autores sugieren que una porción de este canal puede servir como trayectoria de entrada del oxígeno durante la reacción oxidativa. Por otro lado, la segunda región, que está separada del

canal de oxígeno propuesto, por los residuos del extremo N-terminal (residuos 8-16) de la proteína puede jugar un rol importante en la liberación del H₂O₂. Presumiblemente, el canal dirigiría el H₂O₂ a la superficie exterior de la proteína, cerca al sitio de glicosilación Asn 172, el cual se piensa que serviría para anclar la enzima a la célula huésped. La localización de este canal puede explicar la habilidad de la enzima para dirigir H₂O₂ a la célula diana y luego inducir el efecto apoptótico, así como también otras actividades farmacológicas. La estructura por rayos X confirma que los restos de carbohidratos están vinculados a Asn172 y en algunos casos a Asn361. Los autores especularon que los oligosacáridos disializados en Asn172, que se encuentra en las proximidades del canal que conduce al sitio activo de la enzima, se pueden unir a Siglecs (inmunoglobulinas de la superfamilia de las lectinas de unión a ácido siálico) de las células diana a través de su resto glicano sializado, lo que resulta en la producción de una concentración localmente alta de peróxido en o cerca de la interfase de unión. Esto, a su vez, podría conducir a daño oxidativo a la Siglec u otro elemento estructural celular adyacente (Bregge-Silva et al., 2012).

Otro potencial residuo esencial de la estructura de LAAO de *C. rhodostoma* es la Lys326. De acuerdo a França et al. (2007), este residuo coordina una molécula de agua, la cual puede ser importante para el ataque hidrolítico sobre el intermediario imino, transformándolo en el correspondiente α -keto ácido por un corte no enzimático. Además un incremento de la nucleoficidad de la molécula de agua, se logra gracias a la disminución del pKa de la Lys326 causada por el medio ambiente hidrofóbico generado por los residuos, localizados alrededor de la Lys 326 (residuos: Leu 86, Met 89, Phe 328, Tyr 356, Ile 370 y Tyr 372) y puede atacar como una base el incremento de la nucleoficidad de la molécula de agua para atacar al imino intermediario (Pawelek et al., 2000). Todos estos residuos están conservados en los modelos de la LAAO de *B. moojeni* y *B. jararacussu* y también se mantienen conservados en BpicLAAO (Figura 28),demostrando

la similaridad funcional entre estas enzimas y la estructura de *C. rhodostoma*.

Esta diversidad sugiere que la familia de las flavoproteínas ha experimentado grandes cambios evolutivos desde su separación de una proteína ancestral putativa (Macheroux et al., 2001).

Ponnudurai et al., 1994 reportaron que el cofactor de *C. rhodostoma* era el flavin mononucleótido (FMN) en vez de FAD; sin embargo Pawelek et al., 2000 detectaron 2 mol de FAD por mol de enzima homodimérica en la estructura cristalizada de *C. rhodostoma*. Sin embargo la mayoría de SVLAAO, son proteínas unidas a FAD al igual que otros miembros de la familia de las oxidetas. Torii et al. (2000), indicaron que el dominio unido al FAD es importante para la actividad enzimática y otros dominios también están involucrados en el centro activo. Además estudios estructurales de LAAO de *C. rhodostoma* brindaron información acerca de dos sitios de glicosilación Asn 172 y Asn 361 y son descritos ser importantes para la interacción entre LAAOs y la superficie celular, incrementando la concentración de peróxido de hidrógeno en la región de interacción, permitiendo la toxicidad celular (Geyer et al., 2001).

El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA 5 en base a 26 secuencias nucleotídicas, pertenecientes a las familias Viperidae y Elapidae, usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), este método analiza las secuencias basándose en distancias genéticas y agrupándolas (análisis por cluster). Las SVLAAOs de viperidos y elápidos fueron claramente divididas en dos grupos monofiléticos (Figura 30). Este árbol evidenció que BpicLAAO, está evolutivamente más relacionada con la LAAO de *Bothrops jararacussu* y *Bothrops moojeni* (França et al., 2007), a ellas se encuentra cercana la LAAO de *Bothrops pauloensis* Todas pertenecientes a venenos de serpientes del género *Bothrops* pertenecientes a la familia Viperidae. La acelerada evolución que ocurre en las isoenzimas

permite adquirir una particular función, la relación entre las mutaciones y la fuerza de divergencia son especulativas y aún no se cuenta con un mecanismo totalmente elucidado (França et al., 2007).

Los experimentos de modelaje molecular con superposición de los modelos de LAAOs de *B. jararacussu* y *B. moojeni* demostraron que estas proteínas son casi idénticas (França et al., 2007). Además el plegamiento general (estructura tridimensional) de los dos modelos es muy similar a la LAAO del veneno de *C. rhodostoma*. Todos los residuos esenciales en la LAAO de *C. rhodostoma* están conservados en los modelos de las LAAOs de *B. jararacussu* y *B. moojeni*, demostrando la similitud funcional entre dichos modelos y la estructura de LAAO del veneno de *C. rhodostoma*. Esto mismo fue encontrado para BpicLAAO (Figura 31 a,b,c y 32). Por tanto puede deducirse que la mayoría de SVLAAOs tienen una similar estructura tridimensional.

CONCLUSIONES

1. El veneno de la serpiente *Bothrops pictus* 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 de alto peso molecular, formada por dos cadenas polipeptídicas, las cuales presentan al menos un puente disulfuro, con un peso molecular de 65,25 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 edema con una DEM de 7,80 μ g de proteína.
5. BpicLAAO produce hemorragia en ratones albinos y presenta una DHM de 2,79 μ g de proteína y carece de actividad hemolítica sobre rojos humanos lavados.
6. La L-aminoácido oxidasa mostró tener efecto antibacteriano contra bacterias Gram positivas y Gram negativas e inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP de una manera dosis dependiente.
7. Los estudios *in silico* muestran que la región codificante de la enzima purificada tiene nucleótidos que codifican una proteína madura de 487 aminoácidos con motivos para N-glicosilación.

8. Estructuralmente la L-aminoácido oxidasa de *B. pictus* es una proteína que muestra una significativa similaridad con otras LAAOs de venenos de serpientes.

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.

AHN M, LEE BM, KIM YS. Characterization and cytotoxicity of L- amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) Int J Biochem Cell Biol 1997; 29: 911-919.

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 AR, FAIGLE M, NEUMEISTERB, 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 SA, DEVRIES A, BERGERA. The direct lytic factor of cobra venom: Purification and chemical characterization. Biochim Biophys Acta 1968; 154: 53-60.

ALVES RM, ANTONUCCI GA, PAIVA HH, CINTRA AC, FRANCO JJ, MENDONCA-FRANQUEIRO EP, DORTA DJ, GIGLIO JR, ROSA JC, FULY AL, DIAS-BARUFFI M, SOARES AM, SAMPAIO SV. Evidence of caspase mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. Comp Biochem Physiol A 2008; 151: 542-550.

AMARAL A. Serpentes do Brasil: Iconografia colorida. 2 ed. São Paulo: Melhoramentos; 1977.

ANDE R, KOMMOJU P, DRAXYL S, MURKOVIC M, MACHEROUX P, GHISLA S, FERRANDO E. Mechanisms of cell death induction by L- amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis* 2006; 11:1439-1451

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

ASCENCIOS H, CUTTI F. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa del Perú. *Boletín de Lima* 1995; 97: 222-233.

AVRAMEAS S, URIEL J. Methode de coloration des acides amines a Paide de la L-aminoacideoxhidrase. *J Comp Rend* 1995; 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. 1 ed. Barcelona: Edit Alambra; 1975.

BARRAVIERA B. 1994. Venenos animais:uma visão integrada. Rio de Janeiro: Edit EPUB ; 1994. Cap. 63: p. 97-105

BELISARIO MA, TAFURI S, DI DOMENICO C, SQUILLACIOTI C, DELLA MORTE R, LUCISANO A, STAIANO N. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1495 (2): 183-193.

BELLIDO C. Purificación y caracterización de una metaloproteasa hemorrágica del veneno de la serpiente del Perú *Bothrops pictus* (Tschudi, 1845) “Jergón de la costa” [tesis para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga]. Lima : Universidad Nacional Mayor de San Marcos ; 2014.

BENDER M, BRUBACHER L. Catálisis y acción enzimática. 1 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.

BREGGE-SILVA C, NONATO MC, DE ALBUQUERQUE S, LEE P, JUNQUEIRA DE AZEVEDO I, VASCONCELOS M, LOMONTE B, RUCAVADO A, DÍAZ C, GUTIÉRREZ J, CANDIANI E. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of anovel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. Toxicon 2012; 60: 1263-1276.

BRESSAN E, FARGES RC, FERRARA P, TONUSSI CR. Comparison of two PBR ligands with classical anti-inflammatory drugs in LPS-induced arthritis in rats. Life Sci 2003; 72: 2591-2601.

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

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

CARRILLO DE ESPINOZA 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 DE ESPINOZA N, ICOCHEA J. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural. UNMSM 1995; (49): 1-27.

CHAVES F, BARBOSA M, GUTIERREZ JM. Pharmacological study of oedema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) IN MICE. Toxicon 1995; 33: 31-39.

CHAVES F, LEON G, ALVARADO VH, GUTIERREZ JM. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon 1998; 36: 1861-1869.

CHU CC, PAUL WE. Fig 1, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis. Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 2507-2512.

CISCOTTO C, MACHADO DE AVILA R, COELHO E, DINIZ JC, FARIAS L, DE CARVALHO M, MARIA W, SÁNCHEZ E, BORGES A, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of a L- amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon 2009; 53(3): 330-41.

CISNEROS Y, LAZO F, GUTIERREZ S, YARLEQUÉ A. Características bioquímicas de una proteína antibacteriana aislada del veneno de *Lachesis Muta* "Shushupe" Bol Soc Quim Perú 2006; 2(4): 187-196.

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

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

CORTEZ R. Aislamiento, propiedades bioquímicas y acción fibrinogenolítica de una proteasa del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* "Jergón de costa". [Tesis para optar al Título profesional de Biólogo con mención en Genética]. Lima : UNMSM; 1977.

COSTA TAF, DANTAS RT, TOYAMA MH, DIZ FILHO E, ZARA FJ, RODRIGUES DE QUEIROZ MG, PINTO NOGUEIRA NA, ROSA DE OLIVEIRA M, DE OLIVEIRA TOYAMA D, MONTEIRO HS, MARTINS AM. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A₂ and l- amino acid oxidase. Toxicon 2010; 55: 795-804.

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. *En: F. Mueller (ed.), Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme*. Boca Ratón (NY) : CRC Press; 1992 . p. 69-94.

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): 1405-1411.

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

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 A2 from *Agkistrodon halys pallas*. *J Toxicol Toxin Rev* 1998; 17:15-22.

DU X, CLEMETSON K. Snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* 2002; 40: 659-665.

EHARA T, KITAJIMA S, KANZAWA N, TAMIYA T, TSUCHIYA T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Lett* 2002; 531: 509-512.

ESCOBAR E, CÁRDENAS J, YARLEQUÉ A. 1994. Caracterización parcial de una fosfolipasa A del veneno de *Bothrops pictus*. Libro Resúmenes IV Reunión Científica ICBAR 1994; p. 56.

ESCOBAR E, MORANTE Y, MESÍA M, HEREDIAV, YARLEQUÉ A. 1994. Purificación y algunas propiedades de dos enzimas proteolíticas presentes en el

veneno de *Bothrops pictus*. Libro resúmenes IV Reunión Científica ICBAR 1994; p. 57.

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

FERSHT AR, Shindler JS Tsui WC. Biochemistry 1980; 19: 5520-5524.

FITZPATRICK PF. Carbanion versus hydride transfer mechanism in flavoprotein-catalyzed dehydrogenations. Bioorg Chem 2004; 32:125-139.

FRANÇA S, KASHIMA S, ROBERTO P, MARINS M, TICLI F, PEREIRA J, ASTOLFI-FILHO S, STÁBELI R, MAGRO A, FONTES M, SAMPAIO S, SOARES A. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis and molecular modeling. Biochem Biophys Res Commun 2007; 355: 302-306.

FRANCISCHETTI IM, CARLINI CR, GUIMARAES JA. Human platelets activation by convulxin is accompanied by tyrosil-phosphorylation of PLC gamma 2 and occurs independently of integrin alpha IIb beta3. Platelets 1998; 9(3- 4):185-189.

GANONG W. Fisiología Médica. 8 ed. México: Edit. El Manual Moderno; 1982. p. 421- 433.

GEORGEIVA D, MURAKMI M, PERBAND M, ARNI R, BETZEL C. The structure of a native L- amino acid oxidase, the major component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions. Mol Biosyst 2011; 7: 379-384.

GEYER A, FITZPATRICK T, PAWELEK P, KITZING K, VRIELINK A, GHISLA S, MACHEROUX P. Structure and characterization of the glycan moiety of L- amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Eur J Biochem.2001; 268: 4044-4053.

GIULIANO F, WARNER TD. Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and cox-2 in human and rat systems. J Pharmacol Exp Ther 2002;. 303:1001-1006.

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

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

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

GUO CH, LIU S, YAO Y, ZHANG Q, SUN M. Past decade study of snake venom L- amino acid oxidase. Toxicon 2012; 60: 302-311.

GUYTON A, HALL J. 2008. Tratado de Fisiología Médica. 11 ed. España: Edit Elsevier; 2008.p. 457-467.

HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98NT. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41: 95-98.

HARRIS SG, PADILLA J, KOUMAS L, RAY D, PHIPPS RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol 2002; 3: 144-150.

HAYES M, WELLNER D. Microheterogeneity of L- amino acid oxidase. Separation of multiple components by polyacrylamide gel electrofocusing. J Biol Chem 1969; 244: 6636-44.

HOFMANN K, BARON MD, HARMUT S. Box Shade. Pretty-printing of multiple sequence alignments. Ubuntu Manuals; 1997.

HUANG JJ, XU YL. The research of L- amino acid oxidase in snake venom. World Tumor 2009; 8: 91-95.

HURTADO L, LERMA L, RODRÍGUEZ E, YARLEQUÉ A. Aislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hialuronato glucanohidrolasa del veneno de la serpiente *Lachesis muta* "Shushupe". Rev Soc Quim Perú 2007; 73(4):226-234.

INGA R, VIVAS D, PALERMO P, MENDOZA J, LAZO F, YARLEQUÉ A. Caracterización biológica y acción de inhibidores de una fosfolipasa A₂ del veneno de *Lachesis muta*. Rev peru biol 2010; 17(1): 123-128.

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

IZIDORO L, RIBEIRO M, SOUZA G, SANT'ANA C, HAMAGUCHI A, HOMSI-BRANDEBURGO M, GOULART L, BELEBONI R, NOMIZO A, SAMPAIO S, SOARES A, RODRIGUES V. Biochemical and functional characterization of an L- amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. Bioorg Med. Chem 2006; 14: 7034-7043.

JAIN D, KUMAR S. Snake venom: A potent anticancer agent. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(10): 4855-4860.

JIMENEZ K, ZAVALA A, IZAGUIRRE V, YARLEQUÉ A, INGA R. Clonaje y caracterización molecular *in silico* de un transcripto de fosfolipasa A₂ aislada del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Rev peru Med Exp Salud Pública 2010; 27(4): 532-539.

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.

KINI RM, EVANS HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets. Toxicon 1990; 28: 1387-1422.

KINI RM. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. J Thromb Haemost 2011; 9(1): 195-208.

KISS TICLI FABIO. Caracterização funcional e estrutural de uma L- aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua ação antitumoral, antiparasitaria e bactericida. [Tese de Doutorado em toxicología]. Brasil: Universidade de São Paulo. Fac Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto. 2006.

KOH D, ARMUGAM A, JEYASEELAN K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Lige Sci 2006; 63: 3030- 3041.

KOHLHOFF M, BORGES M, YARLEQUÉ A, CABEZAS C, RICHARDSON M, SÁNCHEZ E. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti* and *Bothrops pictus*. J Proteomics 2012; 75: 2181-2195.

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

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

KREBS HA. The Enzymes. 1 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.

LAZO F, MÁLAGA O, YARLEQUÉ A, SEVERINO R. Algunas propiedades bioquímicas de una L- aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. Rev Soc Quim Perú 2007; 73(3): 131-41.

LAZO F, MÁLAGA O, YARLEQUÉ A, SEVERINO R, GUTIERREZ S. Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (Jergón). Rev Soc Quim Perú 2007; 73(4): 197-207.

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.

LIU JW, CHAI MQ, DU XY, SONG JG, ZHOU YC. Purification and characterization of L -amino acid oxidase from *Agkistrodon halys pallas* venom. *Acta Biochim Biophys Sin* 2002; p. 305-310.

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

LOMONTE B, LEÓN 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.

LU QM, WEI Q, JIN Y, WEI JF, WANG WY, XIONG YL. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. *J Nat Toxins* 2002; 11 (4): 345-352.

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.

MALEY F, TRIMBLE RB, TARENTINO AL. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical Biochemistry* 1989; 180 (2): 195-204.

MANDAL S, BHATTACHARYYA D. Two L- amino acid oxidase isoenzymes from Russell's viper (*Daboia russelli russelli*) venom with different mechanism of inhibition by substrate analogs. *FEBS J* 2008; 275: 2078-2095.

MANNERVICK B, BOGGARAM V, CARLBERG I, LARSON K. The catalytic mechanism of mechanism of glutathione reductasa- flavin and flavoproteins 1 ed. 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.

MASUDA S, ARAKAKIS, YAMAMOTO T, KAJI K, HAYASHI H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. Biochem. Biophys Res Commun 1997; 235: 59-63.

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

MEBS D, KUCH U, HERRMANN H, ZIEGLER T. Biochemical and biological activities of the venom of a new species of pitviper from Vietnam, *Triceratolepidophis sieversorum*. Toxicon 2003; 41: 139-43

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

MESÍA M, LAZO F, YARLEQUÉ A. Purificación y caracterización de un principio coagulante del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus*.2011. Rev Soc Quim Perú 2011; 77 (3): 182-190

MINTON SA, MINTON MR. Venomous Reptiles. 1 ed. New York: Scribners; 1980. p. 195-199.

MITSURU J, FUMIE N, RYUICHI S, KOJI M, HISAO K. Characterization of L-amino acid oxidase and antimicrobial activity of aplysianin A, a sea hare-derived antitumor-antimicrobial protein. Fisheries Science 2003; 69(6): 1240-1246.

MOUSTAFA I, FOSTER S, LYUBIMOV A, VRIELINK A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate; Insights into structure and mechanism. J Mol Biol 2006; 364: 991-1002.

NAIR B, NAIR C, ELLIOTT W. Temperature stability of phospholipase A activity. II Variations in optimum temperature of phospholipase A₂ from various snake venoms. Toxicon 1976; 14: 43-47.

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

NATHAN I, DVILANSKY A, YIRMIYAHU T, AHARON M, LIVNE A. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂. Thromb Haemost 1982; 48: 277-282.

NAUMANN G, SILVA L, SILVA L, FARIA G, EVANGELISTA K, RICHARDSON M, KOHLHOFF M, GONTIJO C, NAVADAEV A, DE REZENDE F, EBLE J, SANCHEZ E. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. Biochimica et Biophysica Acta 2011; 1810(7): 683-94.

NORRIS G, STILLMAN T, ANDERSON B, BAKER E. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum* Structure 1994; 2(11): 1049-1059.

OLASCOAGA M. Estudio del veneno de *Bothrops pictus*, bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos. [Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo] Lima: Universidad Agraria la Molina; 1987.

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

OTSUKA-FUCHINO H, WATANABE Y, HIRAKAWA C, TAKEDA J, TAMIYA T, MATSUMOTO J, TSUCHIYA T . Morphological aspects of Achacin-treated bacteria. Comp Biochem Biophys Physiol C 1993; 104: 37-42.

OUCHTERLONY O, NILSSON L. Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. In: Weir D. (Comp). Handbook of Experimental Immunology. Vol 1 Immunochemistry 4 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1978. p. 32.1- 32.5.

OYAMA E, FURUDATE N, SENUKI K, TAKAHASHI H. Purification and characterization of a new platelet aggregation inhibitor with dissociative effect on ADP-induced platelet aggregation from the venom of *Protobothrops elegans* (Sakishima-habu) Toxicon 2009; 53: 706-712.

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, MÁLAGA 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.

PAWELEK P, CHEAH J, COULOMBRE R, MACHEROUX P, GHISLA S, VRIELINK A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *The Eabo Journal* 2000; 19(16): 4204-4215.

PERALES J, AMORIN CZ, ROCHA SL, DOMONT GB, MOUSSATCHE H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antibothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Agents Actions* 1992; 37: 250-259.

PIGNATELLI P, PULCINELLI FM, LENTI L, GAZZANIGA PP, VIOLI F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998; 91: 484-490.

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 dependence of flavin reduction in the L-amino acid oxidase reaction. *J Biol Chem* 1980; 255: 2969-2975.

RAIBEKAS A, MASSEY V. Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig. 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 476-478.

RIBEIRO DE QUEIROZ M, MAMEDE CC, DE MORAIS NCG, CORTES FONSECA K, BARBOSA DE SOUSA B, MIGLIORINI TM, PEREIRA DF,

STANZIOLA L, CALDERON L, SIMÕES-SILVA R, MARTINS SOARES A, DE OLIVEIRA F. Purification and characterization of Bmoo Ai: A new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation. Bio Med Research International 2014; .Vol 2014, Article ID 920942 : 1-7.

RODRIGES RS, DA SILVA JF, BOLDRINI FRANCA J, FONSECA FP, OTAVIANO R, HENRIQUE SILVA F, HAMAGUCHI A, MAGRO AJ, BRAZ AS, DOS SANTOS JI, HOMSI-BRANDEBURGO MI, FONTES MR, FULY AL, SOARES AM, RODRIGUES VM. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-aminoacid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. Biochimie 2009; 91: 490-501.

RODRIGUES RS, BOLDRINI- FRANÇA J, FONSECA FP, DE LA TORRE P, HENRIQUE-SILVA F, SANZ L, CALVETE J, RODRIGUES VM. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. J proteomics 2012; 75: 2707-2720.

RODRÍGUEZ E, YARLEQUÉ A. Aislamiento y algunas propiedades de la proteinasa I del veneno de la serpiente peruana lachesis muta. Acta Científica Venezolana 1991; 42: 219-225.

SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol 1987; 4: 406-425.

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

SAKURAI Y, SHIMA M, MATSUMOTO T, TAKATSUKA H, NISHIYA K, KASUDA S, FUJIMURA Y, YOSHIOKA A. Anticoagulant activity of M-LAO, L- amino acid

oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. *Biochim Biophys Acta* 2003;1649: 51-57.

SAMEL M, VIJA H, RONNHOLM G, SIIGUR J, KALKKINEN N, SIIGUR E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764:707-714.

SAMEL M, TONISMAGI K, RONNHOLM G, VIJA H, SIIGUR J, KALKKINEN N, SIIGUR E. L-amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. *Comp Biochem Physiol B* 2008; 149, 572-580.

SAMY RP, GOPALAKRISHNAJONE P, THWIN MM, CHOW TKV, BOW H, YAP EH, THONG TWJ. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 150-159.

SÁNCHEZ EF, 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.

SERHAN CN. Eicosanoids in leukocyte function. *Curr Opin Hematol* 1994; 1: 69-77.

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

SHAHAM N, BDOLAH A, KOCHVA E. Isolation of L-amino acid oxidase from *Vipera palestinae* venom and preparation of a monoespecific antiserum in rabbits. In: De Vries A, Kochva E, editors. *Toxins of Animal and Plant Origin*. London: Gordon & Breach; 1973. 3: 919-925.

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

SILVA-JUNIOR F, GUEDES H, GARVEY C, AGUIAR A, BOURGUIGNONS, DI CERA E, GIOVANNI-DE-SIMEONE S. A novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon* 2007; 50(1): 18-31.

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-amino acid oxidase a bactericidal system. *Nature* 1970; 225: 1072-1073.

SMITH CJ, ZHANG Y, KOBOLDT CM, MUHAMMAD J, ZWEIFEL BS, SHAFER A, TALLEY JJ, MASFERRER JL, SEIBERT K, ISAKSON PC. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13313-13318.

SOLÍS C, ESCOBAR E, YARLEQUÉ 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 IM, 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.

STABELI RG, MARCUSSI, CARLOS GB, PIETRO RC, SELISTRE-DE-ARAUJO HS, GIGLIO JR, OLIVEIRA EB, SOARES AM. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L- amino acids oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 2881-86.

STABELI RG, SANT'ANA CD, RIBEIRO PH, COSTA TR, TICLI FK, PIRES MG, NOMIZO A, ALBUQUERQUE S, MALTA- NETO NR, MARINS M, SAMPAIO SV, SOARES AM. Cytotoxic L- amino acid oxidase from *Bothrops moojeni* biochemical and functional characterization. *Int J Biol Macromol* 2007; 41: 132-140.

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, TAKATSUKA 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 Commu* 1996; 224 (1): 134-139.

SUN M.Z, GUO C, TIAN Y, CHEN D, GREENAWAY FT, LIU S. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L- amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. *Biochimie* 2010; 92: 343-349.

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* Boulenger) venoms. *Toxicon* 1964; 2(4): 283-289.

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*) venom. *Toxicon* 1987; 25(11):1249.

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, 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, 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.

TAN N, FUNG S. Snake venom L amino acid oxidases. In: *Handbook of Venoms and toxins of reptiles*. Mackessy S, editor New York: CRC Press; 2010. Chapter 10. P. 221-235.

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. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280 (3): 620-624.

THOMPSON J, GIBSON T, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS D. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 24:4876-82.

TOMOYASU N, COURTNEY A, SHERMAN D. Molecular analysis of the Rebeccamycin L- amino acid oxidase from *Lachevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *Journal of bacteriology* 2005; 187(6): 2084-2092.

TONISMAGI K, SAMEL M, TRUMMAL K, RONNHOLM G, SIIGUR J, KALKKINEM N, SIIGUR E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: Isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Toxicon* 2006; 48: 227-237.

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: 9539-9542.

TORII S, YAMANE K, MASHIMA T, HAGA N, YAMAMOTO K, FOX J, NAITO M, TSURUO T. Molecular cloning and functional análisis of apotoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. Biochemistry 2004; 39: 3197-3205.

TOYAMA H, DE TOYAMA O, PASSERO L, LAURENTI M, CORBETT C, TOMOKANE T, FONSECA F, ANTUNES E, JOAZEIRO P, BERIAM L, MARTINS M, MONTEIRO H, FONTELES M. Isolation of a new L- amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. Toxicon 2006; 47: 47-57.

TU A. Venoms: Chemistry and molecular biology. New York: John Wiley; 1977.

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

ULLAH A, SOUZA T, ABREGO J, BETZEL C, MURAKAMI M, ARNI R. Structural insights into selectively and cofactor binding in snake venom L- amino acid oxidase. Biochem Biophys Res Commun 2012; 421(1): 124-128.

ULLAH A, CORONADO M, MURAKAMI M, BETZEL C, ARNI R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an L- amino acid oxidase from *B. jararacussu* venom. Acta Cryst 2012; F68:211-213.

VANE J, BAKHLE YS, BOLTING RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998; 38: 97-120.

VARGAS L, QUINTANA J, PEREAÑEZ J, NUÑEZ V, SANZ L, CALVETE J. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon* 2013; 64: 1-11.

VIVAS D, SANDOVAL G, MENDOZA J, INGA R, GONTIJO S, RICHARDSON M, EBLE J, YARLEQUÉ A, SÁNCHEZ E. Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: Molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties. *Biochimie* 2013; 95:1476-1486.

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 Biophysica Sinica*. 2002; 35(3): 219-224.

WEI JF, WEI Q, 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 Biochem Biophys Sin* 2003;35: 219-224.

WEI JF, YANG HW, WEI XL, QIAO LY, WANG WY, HE SH. Purification, characterization and biological activities of the L- amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. *Toxicon* 2009; 54: 262-271.

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. In: The Worthington Enzymes Manual. Enzymes Related Biochemicals. New Jersey: 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. New York: Biochemistry Plenum Press; 1976. Vol 1 P.97.

YARLEQUÉ A, CAMPOS S, ESCOBAR E, LAZO F, SÁNCHEZ N, MARSH N, BUTTERWORTH P, PRICE R. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian Bushmaster) Toxicon 1989; 27(11): 1189-1197.

YARLEQUÉ A, CÁRDENAS 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.

YOSHIHIKO S, TAKATSUKA H, YOSHIOIDA A, MATSUI T, SUZUKI M, TITANI K, FUJIMURA Y. Inhibition of human platelet aggregation by L- amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon* 2001; 1827-1833.

ZAMUNER SR, TEXEIRA CF. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators Inflamm* 2002; 11: 351-357.

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: Summer JB, Myrback K, editors. *The enzymes*. New York: Academic Press; 1951. Vol 1. 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.

ZHANG YI, WANG J, LEE W, WANG Q, LIU H, ZHENG Y, ZHANG Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochim Biophys Res Commun* 2003; 309:598-604.

ZHANG H, YANG Q, SUNM, TENG M, NIU L. Hydrogen peroxide produced by two amino acid oxidases mediates antibacterial actions. *J Microbiol* 2004; 42: 336-339.

ZHONG SR, JIN Y, WU JB, JIA YH, XU G, WANG G, XIONG Y, LU Q. Purification and characterization of a new L- amino acid oxidase from *Daboia russelli siamensis* venom. *Toxicon* 2009; 54: 763-771.

ZIMMERMAN SE, BROWN RK, CURTI B, MASSEY V. Immunochemical studies of L- amino acid oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1971; 229: 260-270.

ANEXOS

Especie de serpiente	Peso molecular por cromatografía de filtración (kDa)	Peso molecular obtenido por PAGE-SDS (kDa)	Referencia
<i>A. contortrix laticinctus</i>	120	60	Souza et al., 1999
<i>Bothrops brazili</i>	126	60	Solís et al., 1999
<i>Bothrops moojeni</i>	140	69	Stabeli et al., 2007
<i>Crotalus atrox</i>	100	55	Geyer et al., 2001
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	132	66	Ponnudurai et al., 1994
<i>Naja naja kaouthia</i>	112	57	Sakurai et al., 2001
<i>Ophiophagus hannah</i>	135	65	Tan y Saifuddin, 1989
<i>Pseudechis australis</i>	142	56	Stiles et al., 1991
<i>T. mucrosquamatus</i>	140	70	Ueda et al., 1988
<i>Bothrops atrox</i>	128	63	Alves et al., 2008
<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	120	60	Zhang et al., 2003
<i>Bothrops pauloensis</i>	130	65	Rodrigues et al., 2009
<i>Naja naja oxiana</i>	110	55	Samel et al., 2008
<i>A. blomhoffii ussurensis</i>	124	62	Sun et al., 2010
<i>D. russelli siamensis</i>	100	55	Zhong et al., 2009
<i>Bothrops pirajai</i>	130	65	Izidoro et al., 2006
<i>Vipera berus berus</i>	126	63	Samel et al., 2006
<i>C. durissus cascavella</i>	120	60	Toyama et al., 2006
<i>Vipera lebetina</i>	140	70	Tonismagi et al., 2006
<i>Bothrops alternatus</i>	123	61	Stabeli et al., 2004
<i>Bothrops marajoensis</i>	67	67	Costa et al., 2010
<i>Bungarus fasciatus</i>	70	70	Wei et al., 2009
<i>Bothrops insularis</i>	68	68	Braga et al., 2008
<i>A. halys blomhoffii</i>	60	60	Takatsuka et al., 2001
<i>Eristocophis macmahoni</i>	58	58	Ali et al., 2000.

Anexo 1. Pesos moleculares de algunas L-aminoácido oxidasas purificadas de venenos de serpientes

Especie	Agregación plaquetaria	Apoptosis	Anti-leishmaniasis	Anti-Bacterial	Otras actividades biológicas
<i>B. marajoensis</i>	ND*	ND	Si	Si	
<i>B. fasciatus</i>	Induce	Si	ND	ND	Edema, miotóxica
<i>T. stejnegeri</i>	ND	Si	ND	Si	Anti-HIV, citotóxica
<i>B. pauloensis</i>	Induce	ND	Si	Si	Antitumor, citotóxica
<i>B. jararaca</i>	ND	Si	Si	Si	Antigenic, antitumor, hemolítica.
<i>B. atrox</i>	Induce	Si	Si	Si	Citotóxica, edema
<i>A. acutus</i>	ND	Si	ND	ND	Citotóxica, antitumor
<i>N. naja oxiana</i>	Inhibe	ND	ND	Si	
<i>B. insularis</i>	ND	Si	ND	ND	Necros. tubular aguda
<i>A. contortrix laticinctus</i>	ND	Si	ND	ND	Hemorrágica
<i>A. blomhoffii ussurensis</i>	Inhibe	ND	ND	Si	Injuria Pulmon. aguda
<i>A. halys blomhoffii</i>	Inhibe	Si	ND	ND	Anticoagulante
<i>B. moojeni</i>	Induce	Si	Si	Si	Anti-HIV, antitumor, edema
<i>D. russelli siamensis</i>	Inhibe	ND	ND	Si	
<i>O. hannah</i>	Induce	ND	ND	Si	Citotóxica
<i>B. pirajai</i>	Induce	Si	Si	Si	Edema, antitumor, anti-HIV, citotóxica
<i>N. naja kaouthia</i>	Inhibe	ND	ND	Si	
<i>E. macmahoni</i>	Induce	Si	ND	ND	Edema, hemolítica
<i>V. lebetina</i>	Inhibe	ND	ND	Si	
<i>C. rhodostoma</i>	ND	Si		Si	
<i>V. berus berus</i>	Inhibe	Si	ND	ND	

ND* = No determinado

Anexo 2. Actividades biológicas de algunas LAAOs aisladas de venenos de serpientes