

## PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LOS VENENOS DE SERPIENTES PERUANAS DE LOS GÉNEROS *BOTHROPS* Y *LACHESIS*

Mendoza, J.<sup>1\*</sup>; Vivas, D.<sup>1</sup>; Inga, R.<sup>1</sup>; Arbaiza, E.<sup>2</sup>; Rodríguez, E.<sup>1</sup> y Yarlequé, A.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Los venenos de serpientes son mezclas biológicas en las que predominan las proteínas, por lo que es posible establecer las características cualitativas de tales ponzoñas en base al análisis electroforético de dichas macromoléculas.

Usando la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) se analizaron los perfiles electroforéticos de cinco especies de serpientes peruanas: *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti*, *Bothrops brazili*, *Bothrops pictus* y *Lachesis muta*. Previamente se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y *col.* Las muestras de cada veneno diluidas en buffer Tris-HCl 0,05M pH 7,5 fueron evaluadas en condiciones no reductoras y reductoras utilizando geles al 12%.

Los venenos de cada especie tuvieron una concentración proteica típica: *B. atrox*, 78%; *B. pictus*, 69%; *B. barnetti*, 74%; *B. brazili*, 83% y *L. muta* 85%.

Por otro lado, el número de bandas y el rango de peso molecular bajo condiciones **no reductoras** fueron: *B. atrox*, 8 (55,21 a 11,87 kDa); *B. pictus*, 13 (87,04 a 14,08 kDa); *B. barnetti*, 14 (80,68 a 11,88 kDa); *B. brazili*, 7 (37,06 a 11,88 kDa) y *L. muta*, 10 (82,2 a 16,9 kDa), y en condiciones **reductoras** fueron: *B. atrox*, 9 (72,19 a 14,16 kDa); *B. pictus*, 10 (69,85 a 14,63 kDa); *B. barnetti*, 9 (31,01 a 14,63 kDa); *B. brazili*, 9 (59,26 a 14,16 kDa) y *L. muta*, 9 (83,03 a 14,16 kDa).

De acuerdo con ello, los perfiles electroforéticos encontrados de cada veneno son característicos y típicos para las especies en estudio.

**Palabras clave:** Venenos, serpiente, proteína, electroforesis, poliacrilamida.

## ELECTROPHORETICS PATTERNS OF SNAKE PERUVIANS VENOMS FROM *BOTHROPS* AND *LACHESIS* GENERA

### ABSTRACT

Snake venoms are biological mixture when proteins are the principal component. In this way, is possible to establish the qualitative characteristics of these venoms by electrophoretics analysis.

Using sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), electrophoretics patterns from five venoms of peruvians snake, were determinate: *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti*, *Bothrops brazili*, *Bothrops pictus* and *Lachesis muta*. Previously, protein concentrations into whole venoms were measured by Lowry et al. method. Samples of each venom were dissolved in 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,4 in order to evaluated

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular – Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Celular – Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

\* Correspondencia: mendozafernandezjc@hotmail.com

electrophoretical migrations under non reducing and reducing conditions using 12% of acrylamide gels.

Each venoms showed a typical protein concentration values: *B. atrox*, 78%, *B. pictus* 69%, *B. barnetti* 74%, *B. brazili* 83% and *L. muta* 85%. On the other hand, band numbers and weight molecular range under non reducing condition were: *B. atrox*, 8 (51-14kDa); *B. pictus*, 13 (79,5-12,7 kDa); *B. barnetti*, 14 (91,1-14,8 kDa); *B. brazili*, 7 (56,5-18,3 kDa) and *L. muta* 10 (82,2-16,9 kDa). While, under reducing condition the values were: *B. atrox*, 9 (72,19 -14,16 kDa); *B.*, 10 (69,85 -14,63 kDa); *B. barnetti*, 9 (31,01-14,63 kDa); *B. brazili*, 9 (59,26-14,16 kDa) and *L. muta*, 9 (83,03-14,16 kDa).

Therefore, electrophoreticals profiles found to each venoms were characteristics and typical from each species.

**Key words:** Venoms, snake, protein, electrophoresis, poliacylamide.

## INTRODUCCIÓN

Los venenos de las serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas presentes en la naturaleza, y están compuestos por una mixtura de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas<sup>1</sup>. En el caso de las serpientes vipéridas, las proteínas son las moléculas más estudiadas no sólo por su gran abundancia en el veneno sino también por su alta diversidad en acciones biológicas en el rol que cumplen en un envenenamiento.

Hasta la fecha se reconoce sólo al antiveneno ofídico como el único tratamiento válido clínica y científicamente comprobado contra las mordeduras de serpientes, haciendo que su producción sea llevado a cabo bajo los más rigurosos estándares de calidad<sup>2</sup>. Debido a esto, los análisis cuantitativos y electroforéticos del contenido proteico a la par de los estudios de actividades enzimáticas *in vitro* y actividades biológicas *in vivo*, son fundamentales para aquellos venenos que son considerados en la elaboración de sueros antiofídicos o antivenenos ofídicos.

La gran variación intra e interespecífica en la composición química y en las actividades farmacológicas de los venenos debido a múltiples factores, tales como: ubicación geográfica, el tipo de alimentación y el estado fisiológico del reptil<sup>3,4,5,6</sup>, hace necesario establecer patrones para cada una de las especies venenosas presentes en el Perú, principalmente de aquellas causantes de ofidismo.

Numerosos autores han analizado los patrones electroforéticos de venenos de serpiente como un paso previo y preciso para la caracterización del tales ponzoñas<sup>7-13</sup>.

En el presente trabajo describimos los patrones electroforéticos de cinco serpientes peruanas para las cuales se producen antivenenos, con el fin que sean usados como una referencia en la evaluación de su pureza e identidad, ya sea para optimizar la producción de sueros o para identificar nuevos componentes bioactivos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico.

Los venenos de serpientes usados en el presente estudio proceden del stock de venenos del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, obtenidas de especímenes capturados en diferentes regiones geográficas y mantenidos en cautiverio en el serpentario Oswaldo Meneses de esta Universidad. Los especímenes corresponden a: *Bothrops atrox* “jergón” (Ucayali, 15 especímenes), *Bothrops pictus* “jergón de costa” (Pachacamac-Lima, 5 especímenes), *Bothrops barnetti* “sancarranca” (Santa Cruz-Cajamarca, 5 especímenes), *Bothrops brazili* “jergón shushupe” (Madre de Dios, 5 especímenes) y *Lachesis muta* “shushupe” (Junín, 7 especímenes).

Para el estudio, los venenos liofilizados fueron resuspendidos en solución amortiguadora Tris-

HCl 0,05M pH 7,5; centrifugados a 3000rpm durante 15 minutos para eliminar restos insolubles. La concentración de dichos venenos fue ajustada a 30mg/ml.

#### Cantidad de proteína

La concentración proteica en el veneno fue estimada por el método de absorción ultravioleta a 280 nm<sup>14</sup> y por el método de Lowry y col. 1951<sup>15</sup>, usando como estándar de proteína, albúmina sérica bovina.

#### Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% según el método de Laemmli<sup>16</sup>; las muestras fueron preparadas bajo condiciones no reductoras y en condiciones reductoras con el agente 2-β-mercaptoetanol. Se colocaron 40μg de veneno por carril y la corrida electroforética se realizó en una cámara OmniPAGE Modelo CVS10D y fuente de poder Cleaver scientific MP 300V durante 1 hora a 120V.

Después de la corrida electroforética los geles fueron fijados y se tiñeron con solución de Azul brillante de Coomassie R-250 al 0,05% por 1 hora.

#### Estándares de peso molecular

Se utilizaron las siguientes proteínas patrones adquiridos de Sigma Chem Co.-USA: Albúmina sérica bovina (66KDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29KDa) y Lisozima (14,3 KDa).

#### Análisis de resultados

Los datos obtenidos de la cuantificación fueron promediados y establecidos las desviaciones estándar para cada uno de los especies en estudio de acuerdo al número de repeticiones que se creyó conveniente.

Para el análisis electroforético se construyó en primer lugar, usando regresión lineal, la curva patrón con el logaritmo del peso molecular versus Rf (movilidad electroforética relativa) de las proteínas estándar. Se procedió a reconocer el número de bandas principales de cada especie, y determinar el Rf de cada una de ellas, hallando su peso molecular al tomar el antilogaritmo correspondiente.

## RESULTADOS

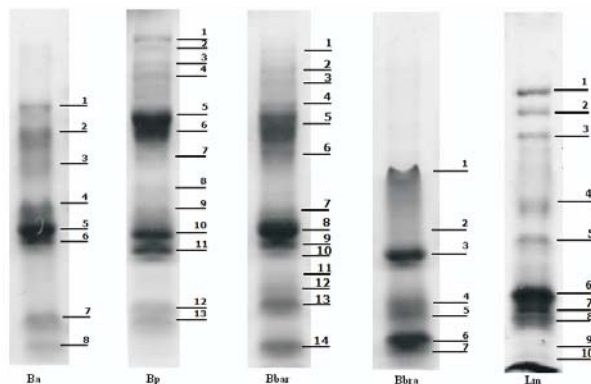
### Contenido proteico

La tabla 1 muestra el contenido proteico promedio por miligramo de veneno para cada especie donde el veneno de *Lachesis muta* posee el más alto contenido de proteína seguido por *Bothrops brazili* en tanto que las concentraciones más bajas pertenecen a los venenos de *Bothrops barnetti* y *Bothrops pictus*.

Tabla 1. Contenido proteico de los venenos de serpientes peruanas

Serpiente	Contenido proteico promedio (por mg de peso seco de veneno)	
	Abs UV 280nm	Método de Lowry
<i>Bothrops atrox</i>	1,300± 0,14	0,78 ± 0,05
<i>Bothrops barnetti</i>	0,980± 0,18	0,74 ± 0,02
<i>Bothrops brazili</i>	1,250± 0,08	0,83 ± 0,02
<i>Bothrops pictus</i>	1,100± 0,18	0,69 ± 0,03
<i>Lachesis muta</i>	1,500± 0,19	0,85 ± 0,06

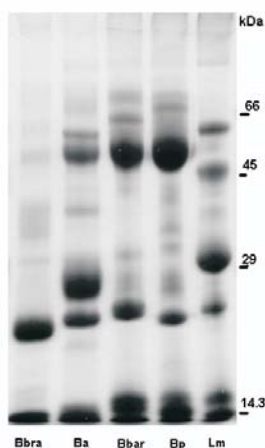
\* Nótese que la absorbancia a 280nm es un valor referencial para cada veneno en tanto que los valores encontrados por el método de Lowry corresponden a la concentración de proteína de acuerdo con el peso de la muestra por lo que se puede establecer los porcentajes respectivos. En este sentido fue posible determinar los siguientes % de proteína *B. atrox*, 78%; *B. pictus*, 69%; *B. barnetti*, 74%; *B. brazili*, 83% y *L. muta* 85%.



**Figura 1.** Perfiles electroforéticos en PAGE-SDS en condiciones no reductoras de venenos de serpientes peruanas, indicando el número y posición de bandas electroforéticas particular. Ba, *Bothrops atrox*; Bp, *Bothrops pictus*; Bbar, *Bothrops barnetti*; Bbra, *Bothrops brazili*, Lm, *Lachesis muta*

#### Patrones electroforéticos en condiciones no reductoras.

Los venenos de cada especie analizados mostraron patrones electroforéticos distintos. La figura 1 muestra los patrones electroforéticos resultantes del PAGE-SDS en condiciones no reductoras. En *Bothrops barnetti* y *Bothrops pictus* fue común encontrar bandas proteicas de alto peso molecular, por encima de los 66 kDa. El patrón electroforético de estas dos serpientes mantienen una cercanía en cuanto al peso de la mayoría de las bandas (tabla 1), no obstante *B. pictus* posee más proteínas de bajo peso molecular. Asimismo, una banda de 28 kDa fue común en los venenos de *B. atrox*, *B. pictus* y *B. barnetti* (figura 1 y tabla 2: bandas Ba5 Bp10 y Bbra8).



**Figura 2.** Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE con el agente reductor 2-β-mercaptoetanol de venenos de serpientes peruanas y el rango de peso molecular en el cual se distribuyen. Ba, *Bothrops atrox*; Bp, *Bothrops pictus*; Bbar, *Bothrops barnetti*; Bbra, *Bothrops brazili*, Lm, *Lachesis muta*

Por otro lado, el patrón electroforético del veneno de *Bothrops brazili* mostró significativa diferencia en cuanto al peso y cantidad de proteínas con respecto a los demás venenos al no presentar bandas por encima de los 45 kDa (figura 1: Ba8 Bbra6 Bbar14). Sin embargo, una banda de 11,8 kDa fue similar con los venenos de *B. atrox* y *B. barnetti*.

El veneno de *Lachesis muta* presentó una distribución de bandas que también abarcó proteínas de alto, mediano y bajo peso molecular, siendo su distribución diferente al obtenido con los venenos del género *Bothrops* (figuras 1 y 2).

Es necesario indicar que algunos patrones electroforéticos, a nivel intraespecífico, pusieron en evidencia ciertas variaciones en intensidad de bandas pero dichas variaciones fueron poco frecuentes en todos los especímenes analizados.

**Tabla 2.** Número de bandas proteicas analizadas por PAGE SDS bajo condiciones no reductoras del veneno de las serpientes peruanas.

Especie	Número de bandas (-)	Pesos moleculares
<i>Bothrops atrox</i>	8	55,21 kDa; 45,67 kDa; 37,78 kDa; 28,97 kDa; 25,37 kDa; 23,7 kDa; 13,82 kDa; 11,87 kDa
<i>Bothrops pictus</i>	13	87,04 kDa; 81,45 kDa; 73,34 kDa; 68,66 kDa; 52,15 kDa; 47,43 kDa; 41,14 kDa; 32,46 kDa; 28,96 kDa; 24,88 kDa; 22,63 kDa; 15,49 kDa, 14,08 kDa
<i>Bothrops barnetti</i>	14	80,68 kDa; 70,74 kDa; 65,48 kDa; 53,34 kDa; 49,27 kDa; 40,36 kDa; 28,42 kDa; 25,8 kDa; 23,07 kDa; 21,38 kDa; 19,8 kDa; 17,36 kDa; 15,49 kDa; 11,88 kDa
<i>Bothrops brazili</i>	7	37,06 kDa; 25,85 kDa; 21,80 kDa; 16,09.3 kDa; 15,19 kDa; 12,81 kDa; 11,88 kDa
<i>Lachesis muta</i>	10	82,2 kDa; 67,0 kDa; 59,9 kDa; 56,6 kDa; 42,8kDa; 36,2 kDa; 32,4 kDa; 25,4 kDa; 21,5kDa; 16,9 kDa

### Patrones electroforéticos bajo condiciones reductoras

El uso del agente reductor 2-β-mercaptoetanol, modificó de manera significativa el patrón electroforético de las bandas proteicas, especialmente de aquéllas de alto peso molecular por encima de los 66 kDa (figura 2, tabla 3), manifestando la presencia de puentes disulfuro intra e intercatenario como parte de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas en estudio. Bajo este tratamiento, el veneno de *B. brazili* fue más afectado; en cambio, los patrones de *B. barnetti* y *B. pictus* mantuvieron la semejanza con los patrones obtenidos en condiciones no reductoras (figura 1).

### DISCUSIÓN

El veneno es una mezcla compleja de proteínas que pueden ser agrupadas en dos categorías principales: a) *toxinas*, que son polipéptidos de pesos moleculares menores a 30 kDa, abundantes en los venenos de serpientes de la familia Elapidae y b) *enzimas*, las cuales poseen pesos moleculares mayores a 30 kDa y constituyen el componente mayoritario del veneno de serpientes de la familia Viperidae<sup>1</sup>. Como puede apreciarse, los venenos estudiados poseen principalmente componentes proteicos enzimáticos; sin embargo, debemos resaltar la presencia de proteínas de bajo peso en todos ellos ( $\leq 29$ KDa). Así tenemos un grupo de proteínas bien caracterizadas presentes en estos venenos que son las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), las cuales están dentro de este rango (Iwanaga y Suzuki., 1979)<sup>17</sup>.

**Tabla 3.** Número de bandas proteicas analizadas por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras del veneno de las serpientes peruanas.

Especie	Número de bandas (+)	Pesos moleculares
<i>Bothrops atrox</i>	9	58,29 kDa; 51,95 kDa; 44,07 kDa; 39,27 kDa; 26,46 kDa; 22,82 kDa. 20,17 kDa, 14,63 kDa, 14,16 kDa.
<i>Bothrops pictus</i>	10	69,85 kDa; 66,49 kDa; 51,10 kDa; 41,95 kDa; 369,17 kDa; 32,77 kDa; 26,46 kDa; 22,82 kDa; 15,38 kDa; 14,63 kDa;
<i>Bothrops barnetti</i>	9	71,01 kDa; 62,25 kDa; 51,95 kDa; 43,35 kDa; 31,19 kDa; 27,52 kDa; 23,58 kDa; 15,37 kDa; 14,63 kDa.
<i>Bothrops brazili</i>	9	39,93kDa; 35kDa; 33,32kDa; 36,68kDa; 21,37kDa. 20 kDa, 16,15 kDa. 15,63 kDa 14,16 kDa.
<i>Lachesis muta</i>	9	83,03 kDa; 51,1 kDa; 47,85 kDa; 42,64 kDa; 393,27 kDa; 30,43 kDa; 23,97 kDa; 15,38 kDa; 14,16 kDa;

Nuestros resultados nos indican que, en función al número de bandas proteicas que presentan, los venenos más complejos son los de *B. pictus*, *B. barnetti* y *L. muta* seguidos de *B. atrox* y *B. brazili*. Asimismo, la mayor intensidad de algunas bandas indicaría su mayor concentración, tal como ocurre en el caso de *B. atrox* con las bandas 5 y 6; en *B. pictus* bandas 5, 6, 10 y 11; en *B. barnetti* bandas 5, 8 y 9; en *B. brazili* bandas 3 y 6 y en *L. muta* bandas 6 y 7 (figura 1).

En el Perú, Bonilla y Zavaleta<sup>18</sup> en 1997 describieron el perfil del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprora* y caracterizan parcialmente este veneno. En el 2000 Málaga y col. estudiaron las variaciones del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* en relación con la edad mostrando diferencias entre los patrones electroforéticos de serpientes juveniles y adultas así como también algunas variaciones en el contenido proteico del veneno de una misma especie localizada en diferentes regiones geográficas<sup>19</sup>. Es por ello que para establecer un veneno estándar debe seleccionarse claramente los especímenes juveniles o adultos según los requerimientos de la institución productora del antiveneno respectivo.

Es importante también remarcar que la alteración en los perfiles electroforéticos puede deberse al estado fisiológico del reptil, ocasionado por el estrés al cautiverio, mala alimentación, presencia de parásitos y a una inapropiada manipulación durante la extracción de la ponzoña. Estos factores fueron considerados en la obtención de las muestras analizadas a fin de obtener patrones altamente reproducibles para cada especie.

Finalmente, podemos indicar que la técnica electroforética es una valiosa herramienta en la caracterización de un veneno ofídico, permitiendo su identificación, verificar el estado de conservación y calidad en su obtención, cualidades muy importantes a tener en cuenta no sólo en la preparación de antivenenos, sino también en la medida de efectividad de los sueros antiofídicos producidos.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Vicerectorado de Investigación de la UNMSM por el apoyo financiero brindado a esta investigación.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Tu, A. T. (1977) *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, 560pp. New York: Wiley.
2. Chippaux, J.P.; Goyffon, M.; 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. **36**, 823.
3. Chippaux J. P., Boche J. and Courtois B. 1982 Electrophoretic patterns of the venoms from a litter of *Bitis gabonica* snakes. *Toxicon* 20, 521-523.
4. Glenn J. L. and Straight R. (1977) The midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*) venom: lethal toxicity and individual variability. *Toxicon* 15, 129-133
5. Rael E. D., Knight R. A. and Zepeda H. (1984) Electrophoretic variants of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venoms and migration differences of Mojave toxin. *Toxicon* 22, 980-984.
6. Willemse G. T. (1978) Individual variation in snake venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B, 553-557
7. Aragon F, Gubensek P. 1981. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon*, 19: 797-805.
8. Gutierrez, J. M., Chaves, F. y Bolaños, R. (1980) Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28, 341-351
9. Johnson B. D. (1968) Selected Crotalidae venom properties as a source of taxonomic criteria. *Toxicon* 6, 5-10.
10. Lomonte B, Gene JA, Gutierrez JM, Cerdas L. 1983. Estudio comparativo de los ejemplares de serpiente cascabel (*crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon*, 21,3: 379-384.
11. Minton S. A. and Weistein S. A. (1986) Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon* 24, 71--80.
12. Perrone MAL, Siles Villaroel M, Furtado M de FD. Estudio comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* procedentes do estado de São Paulo e do Estado do Parana com algumas espécies morfológicamente duvidosas. *Mem Inst Butantan* 1989, 51,1: 25-32.

13. Suttner J., Dyr J. E. and Kornalik F. (1988) Evaluation of individual variability in the composition of *Agkistrodon contortrix* venom by means of HPLC and two-dimensional PAGE. *Folia Haematol., Leip.* 115, 197-202.
14. Warburg, O. and Christian, W. 1941. Isolierung and crystallization of garungs ferments. *Biochem. Z.* 310: 384-421.
15. Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
16. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural during the assembly of the headbacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685.
17. Iwanaga, S. & T. Suzuki. 1979. Enzymes in snake venom, p. 684-750. En: C.Y. LEE (Ed.). Snake Venoms. Berlin, Springer-Verlag, 1129p.
18. Bonilla, C.; Zavaleta A. 1997. Estudio bioquímico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprurus*. *Rev Med Exp.* Vol. 14 N° 2
19. Malaga, O.; Pantigoso, C.; Morante, Y.; Heredia, V.; Cardenas, J. y Yarleque, A. 2000. Variaciones en la Composición Proteica, Actividades Enzimáticas y Biológicas del Veneno de la Serpiente *Bothrops atrox* (Viperidae) en relación con la Edad. *Rev. Peru de Biol.* Vol. 7, No. 2, pp.: 161 – 170.