

# ESTUDIO CROMATOGRÁFICO, ELECTROFORÉTICO Y ENZIMÁTICO DEL VENENO TOTAL Y FRACCIÓN I DE LA SERPIENTE VENEZOLANA *Bothrops venezuelensis* (TIGRA MARIPOSA)

Chromatographic, Electrophoretic and Enzymatic Study of the Whole Venom and Fraction I of the Venezuelan Snake *Bothrops venezuelensis* (Tigra Mariposa)

Juan Carlos López<sup>1</sup>, Alba M. Vargas<sup>2</sup>, Héctor Scannone<sup>2</sup> e Yrma Fernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela. E-mail: lopezjic@cantv.net

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigaciones, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

## RESUMEN

La serpiente *Bothrops venezuelensis* es endémica de las cordilleras de la Costa y los Andes de Venezuela, donde es responsable de numerosos accidentes en las poblaciones de estas áreas, por lo que impera la necesidad de caracterizar bioquímicamente los componentes de su veneno como punto de partida para posteriores análisis toxicológicos, farmacológicos e inmunológicos de los distintos factores etiológicos de las patologías manifestadas en los emponzoñamientos, con la finalidad de mejorar la elaboración del suero antiofídico y las terapias de recuperación de los pacientes. En la presente investigación se determinaron algunas características bioquímicas en el veneno total y la fracción I del veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* como el perfil de elución del veneno total obtenido por cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex G-100, el perfil electroforético en gel de poliacrilamida con Sodio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE) y tres actividades enzimáticas (Fosfolipasa A<sub>2</sub>, Caseinolítica y Esterásica sobre N-Benzoil - L - Arginin Etil Ester (BAEE)). Se discuten comparativamente los resultados obtenidos en estos ensayos y los de otros venenos de serpientes Venezolanas, Suramericanas y Centroamericanas.

**Palabras clave:** *Bothrops venezuelensis*, cromatografía, electroforesis, enzimas.

## ABSTRACT

The snake known like *Bothrops venezuelensis* of the Venezuelan Cordillera de la Costa and the Andes, where is re-

sponsible of many accidents in this areas. The high frequency of snake's accidents in this zone make necessary to know the biochemistry the snake venom composition to began a toxicological, pharmacological and immunological analysis in order to get a better polyvalent antivenom and convalescence therapy. In the present work was determined some biochemistry characteristics of the whole venom obtained by molecular exclusion chromatography using Sephadex G-100 Superfine and polyacrilamide gel electrophoresis with Sodio Dodecil Sulfate (SDS). Also, three enzymatic activities (Phospholipase A<sub>2</sub>, Caseinolytic and N-benzoil L-arginin Ethyl ester hydrolase (BAEE)) were developed. The results were compared with other Venezuelan, South and Central American snakes venoms.

**Key words:** *Bothrops venezuelensis*, chromatography, electrophoresis, enzymes.

## INTRODUCCIÓN

La serpiente *Bothrops venezuelensis* (tigra mariposa), es endémica de las Cordilleras de la Costa y de Los Andes venezolanos [6]. Su gran ferocidad la hace responsable de un alto número de accidentes ofídicos ocurridos en las zonas donde habita. Los síntomas producidos por el emponzoñamiento de estas serpientes resultan de la combinación de efectos producidos por los componentes proteicos presentes en el veneno [16]. Los venenos de la mayoría de las serpientes de la sub-familia *Crotalinae* inducen severas alteraciones locales (edema, hemorragia y necrosis de los tejidos muscular y conectivo) y efectos sistémicos como alteraciones de la hemostasia, manifestaciones hemorrágicas, shock cardiovascular y nefrotoxicidad [9]. Por ser una serpiente endémica de Venezuela, exis-

ten escasas referencias acerca de la caracterización bioquímica y toxicológica de este veneno, lo que hace necesario analizar los mecanismos generales de acción con la finalidad de administrar terapias médicas acordes con las diferentes manifestaciones encontradas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de la muestra de veneno total

El pool de veneno de *B. venezuelensis* fue obtenido a partir del ordeño manual de los animales adultos de ambos sexos provenientes de varias zonas del Parque Nacional El Ávila y mantenidos en cautiverio en el bioterio de serpientes de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Caracas. Inmediatamente después de la extracción, el veneno fue deshidratado en un desecador con  $\text{CaCl}_2$ , al vacío, dentro de un cuarto frío a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ , hasta su total cristalización [4].

### Fraccionamiento del veneno total

El fraccionamiento del veneno total fue realizado por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de 95 cm de largo por 2,5 cm de ancho empacada con Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) utilizando como eluyente buffer acetato de amonio 0,2M, pH 6,8. Para cada fraccionamiento, se disolvieron 250 mg de veneno seco en 5 ml del eluyente, centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos e introducidos a la columna, la cual está ajustada a una velocidad de flujo de 7 ml/hora. Los eluatos fueron recogidos en alícuotas de 3,5 ml / tubo mediante un colector automático Gilson, modelo Linear Fractinator. Todo el proceso fue realizado en un cuarto frío a  $4^\circ\text{C}$  [4].

### Determinación del perfil de elución y obtención de las fracciones

Los eluatos obtenidos a partir del fraccionamiento, fueron leídos a 280 nm con un espectrofotómetro Hitachi-Perkin-Elmer UV-VIS y se trazó el perfil de elución. Las fracciones se obtuvieron reuniendo los eluatos por debajo de cada pico por separado para luego ser liofilizadas en un liofilizador Labconco y guardadas en un desecador con  $\text{CaCl}_2$ , al vacío, en un cuarto frío a  $4^\circ\text{C}$  [4].

### Actividad caseinolítica

La actividad proteolítica sobre la caseína fue determinada utilizando el método de Wirnt Rick [19]. Como sustrato se utiliza una solución de caseína al 1% en buffer tris-HCl 0,1M a pH 8,0. Las muestras de veneno se preparan en dosis seriadas utilizando HCl 1 mM. La mezcla de incubación tiene un volumen final de 2,0 ml y está constituida por volúmenes fijos de 0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$  al 5% y 1,0 ml de solución de caseína al 1% y volúmenes variables de la solución de veneno y de buffer tris-

HCl 0,1 M a pH 8,0, c.s.p. 2,0 ml. La mezcla se incuba por 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con agitación suave y constante. Al finalizar el período de incubación, se detiene la reacción agregando a cada tubo 3 ml de ácido tricloroacético 5% para obtener un volumen final de 5 ml, se dejan en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente, se filtran a través de papel Whatman N° 1 y se procede a la determinación de la densidad óptica a 280 nm. Los ensayos se realizan por duplicado más un blanco para cada dosis de veneno. Al blanco, se le agregó el ácido tricloroacético antes de comenzar la reacción con el sustrato. La actividad proteolítica sobre caseína se expresa en unidades de Tripsina-Caseína por mg de enzima ( $\text{TU}^{\text{CAS}}/\text{mg enzima}$ ) según la fórmula: [19].

$$\text{TU}^{\text{CAS}} = \frac{\text{DO} - \text{B} \times 10^3}{\text{mg enzima} \times 20 \text{ min}}$$

donde DO: Densidad óptica; y B: DO del Blanco.

### Actividad Fosfolipasa A<sub>2</sub>

Se emplea el método de titulación propuesto por Yang y King [20]. Como solución tituladora se utiliza NaOH 0,01 N, previamente valorada. La titulación se realiza en un titulador automático Radiometer a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y a pH 8,0. Como sustrato se utiliza una emulsión de yema de huevo en 300 ml de agua destilada, añadiendo 2,7 mM de desoxicolato de sodio y 20 mM de cloruro de calcio. Para cada determinación se usan 10 ml del sustrato y diluciones adecuadas del veneno en un volumen de 10 microlitros para cada determinación. Se define la unidad de actividad enzimática como la liberación de un micromol de ácido graso por minuto [20].

### Actividad esterásica sobre n-benzoil-L-arginin etil ester (BAEE)

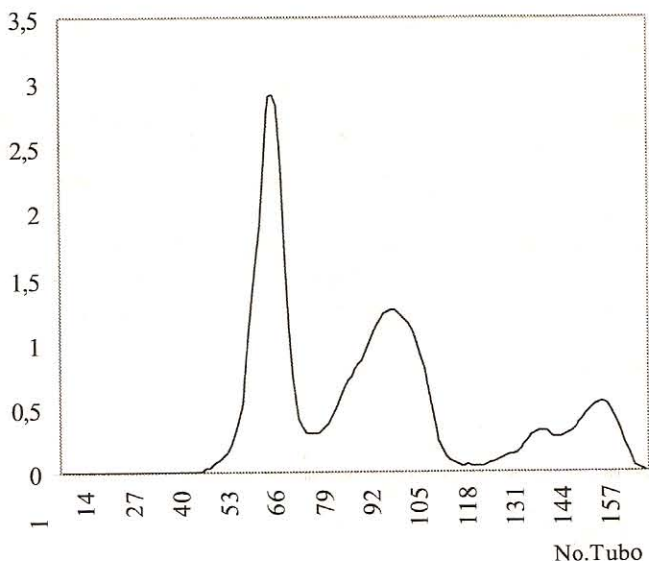
Se emplea el método propuesto por Tu y col [17]. Se utiliza como sustrato el N-Benzoil L-arginin-Etil-ester (BAEE). El sustrato se disuelve en buffer fosfato 0,0667 M a pH 7,0 para una concentración final de 0,25 mM. El veneno se prepara realizando diluciones adecuadas en solución salina isotónica. Se toma una alícuota de 2,9 ml de la solución de sustrato en una celda de cuarzo y al tiempo de incubación cero (0) se agrega 0,1 ml de la dilución del veneno. Se toma una lectura de la variación de la densidad óptica cada 30 segundos a 253 nm con un espectrofotómetro Hitachi-Perkin-Elmer UV-VIS, durante aproximadamente seis minutos. La actividad enzimática viene dada por la siguiente fórmula:

$$\text{UNIDADES} / \text{mg} = \frac{\Delta \text{DO} / \text{min} \times 10^3}{\text{mg veneno}}$$

donde: DO: Variación de la Densidad óptica

### Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Sodio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE)

Se usa el método propuesto por Laemmli [5]. El soporte se construye con una matriz discontinua de poliacrilamida for-



**FIGURA 1. PERFIL DE ELUCIÓN DEL VENENO TOTAL DE LA SERPIENTE *Bothrops venezuelensis*.**

mada por dos geles de distinta densidad. Un primer gel, de concentración al 4,5% y un segundo gel de separación al 12,5%. Para la corrida se utiliza una cámara MINI-PROTEAN II de la casa BIO-RAD. El proceso de fraccionamiento se comienza con una corriente de 50 voltios hasta que la muestra ha entrado al gel de separación, para luego elevarla hasta 100 voltios. El tiempo de corrida es de aproximadamente 1 hora 45 minutos. Como marcador de corrida se utiliza azul de bromofenol. La muestra es diluida en buffer de disolución el cual contiene sodio dodecilsulfato (SDS) a una concentración de 10%, buffer tris 0,5 M a pH 6,8; glicerol y el marcador de corrida. Una vez finalizada la corrida, los geles son coloreados con azul de Coomassie R-250 por una hora, para luego someterlos al proceso de decoloración.

### Análisis estadístico

Se determinan regresiones lineales, coeficientes de relación y distribución de frecuencia a las gráficas obtenidas a partir de las velocidades de reacción de las actividades fosfolipasa A<sub>2</sub>, BAEE y sobre caseína mediante el paquete Statgraphics Ver.5.0. A partir de estos valores se estiman las unidades de actividad enzimática mediante las respectivas ecuaciones.

## RESULTADOS

### Cromatografía de exclusión molecular

La FIG. 1 muestra el perfil de elución del veneno total de la serpiente *B. venezuelensis*. En ella se pueden observar cuatro fracciones diferenciadas, de las cuales la fracción denominada I, presenta la mayor concentración de proteínas y masa molecular, seguida en orden de magnitud por la fracción denominada II. Las fracciones III y IV, son de muy baja concentración proteica y las de menor peso molecular.

### Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas determinadas fueron: actividad proteolítica sobre caseína, fosfolipasa A<sub>2</sub> e hidrolítica sobre ésteres de arginina (B.A.E.E.).

**Proteasas:** Con respecto a la actividad proteolítica sobre la caseína, el veneno total presentó 116 TU<sup>cas</sup>/mg de veneno, ajustándose a una regresión lineal positiva y altamente significativa ( $r = 0,91$ ;  $p < 0,01$ ) entre los microgramos de veneno y la densidad óptica. La fracción I presentó 122 TU<sup>cas</sup>/mg de la fracción, ajustándose a una regresión lineal positiva y altamente significativa ( $r = 0,86$ ;  $p < 0,01$ ) entre los microgramos de veneno y la densidad óptica.

**Esterasas:** En relación con la actividad hidrolítica sobre ésteres de arginina (B.A.E.E.), el veneno total manifestó la mayor actividad esterásica (209 U/mg de veneno), ajustándose a una regresión lineal positiva y altamente significativa ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,01$ ) entre los microgramos de veneno y la velocidad de reacción, comparativamente con los valores presentados por la fracción I (96 U/mg de fracción), la cual se ajustó a una regresión lineal positiva y altamente significativa ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,01$ ) entre los microgramos de veneno y la velocidad de reacción.

**Fosfolipasa A<sub>2</sub>:** Con respecto a la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, el veneno total presentó un valor de 30 U/mg de veneno, ajustándose a una regresión lineal positiva y altamente significativa ( $r = 0,91$ ;  $p < 0,01$ ) entre los microgramos de veneno y la velocidad de reacción. La fracción I no presentó actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>.

### Perfil electroforético

La FIG. 2 muestra el perfil electroforético del veneno total y la fracción I del veneno de *B. venezuelensis*. El veneno total en estudio presentó doce bandas proteicas, con pesos moleculares entre 10.000 y 61.500 dalton. Un alto número de estas bandas, ocho en total, se encuentran en el rango de pesos entre 10.000 y 15.000 dalton. Por su parte, la fracción I mostró once bandas proteicas con un rango de pesos moleculares entre 10.000 y 71.000 dalton. Comparativamente, la fracción I presentó cinco bandas comunes con el veneno total, en un rango entre 10.000 y 45.000 dalton.

## DISCUSIÓN

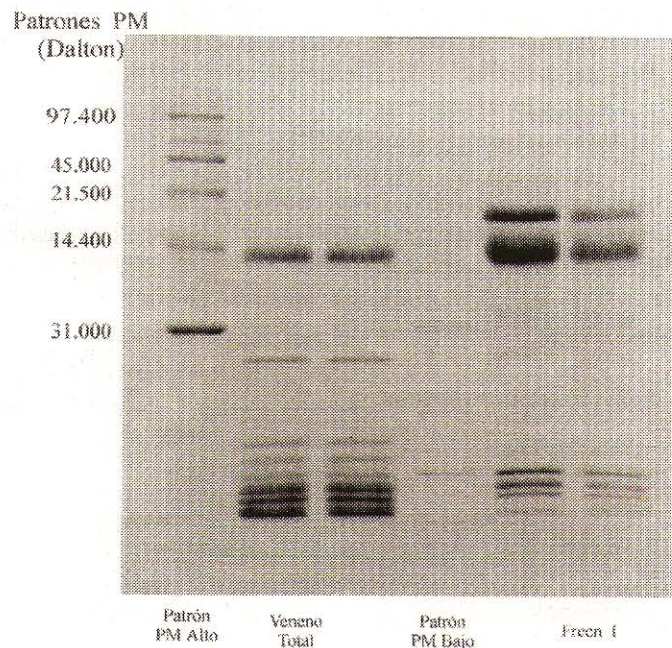
### Cromatografía de exclusión molecular

La importancia de realizar estudios comparativos entre los perfiles de elución de los venenos totales, intraespecífica e interespecíficamente, radica en que permite realizar una caracterización primaria a la composición proteica de los mismos, pudiendo relacionar ciertas actividades farmacológicas y tóxicas al tamaño y a la presencia o ausencia de una determinada fracción. Por otra parte, la técnica de fraccionamiento por exclusión molecular constituye la fase inicial del proceso de aislamiento de cada una de los principios activos presentes en

estas potentes toxinas. La TABLA I muestra el resumen comparativo de los datos expuestos.

El perfil de elución obtenido a partir del pool de trabajo del veneno, presenta diferencias en el número de fracciones y contenido proteico, cuando es comparado con los obtenidos en otras especies de *Bothrops* venezolanos. Es importante señalar que, en la mayoría de los venenos comparados, las dos fracciones de menor peso molecular presentaron la misma configuración y localización dentro del perfil de elución [3, 8, 10, 13, 14].

Con respecto al pool de veneno de *B. venezuelensis* utilizado por Scannone y col. [13], se observa que el número de fracciones se mantuvo constante en ambos venenos. Comparando con el veneno de *B. colombiensis* de Venezuela [14], el veneno de *B. venezuelensis* posee una fracción proteica menos. El veneno de *B. castelnaudi* de Venezuela posee seis fracciones, dos más que el pool de trabajo del veneno, pero de menor contenido proteico. Sus dos fracciones de menor peso molecular no mantuvieron la semejanza descrita para los tres venenos anteriormente presentados [10]. Por otro lado, *B. jararaca* del Brasil [3], a pesar de presentar cinco fracciones, mantuvo el patrón descrito en los dos picos de menor peso molecular señalados con anterioridad. Para los venenos de



**FIGURA 2. PERFIL ELECTROFORÉTICO (SDS-PAGE) DEL VENENO TOTAL Y FRACCIÓN I DE LA SERPIENTE *Bothrops venezuelensis*.**

**TABLA I  
RESUMEN COMPARATIVO DE LOS PERFILES DE ELUCIÓN CROMATOGRÁFICO Y ELECTROFORÉTICO DE LOS VENENOS TOTALES Y FRACCIONES DE VARIAS ESPECIES DE *BOTHROPS***

Especies Comparadas		Cromatografía Nº de Fracciones Proteicas	Electroforeis Número de Bandas (Rangos de PMx10 <sup>3</sup> )	Referencias
<i>Bothrops venezuelensis</i>	Veneno Total	4	12 (10,0-61,5) <sup>c</sup>	Este trabajo
<i>Bothrops venezuelensis</i>	Veneno Total	4	16 (11,5-76,0)	13
<i>Bothrops castelnaudi</i>	Veneno Total	6 <sup>a</sup>		10
<i>Bothrops colombiensis</i>	Veneno Total	5		14
<i>Bothrops jararaca</i>	Veneno Total	5		3
<i>Bothrops atrox</i>	Veneno Total	6		8
<i>Bothrops barnetti</i>	Veneno Total	5		8
<i>Bothrops hyoprurus</i>	Veneno Total	2 <sup>b</sup>		8
<i>Bothrops pictus</i>	Veneno Total	6		8
<i>Bothrops colombiensis</i>	Veneno Total		13 (14,9-52,0)	15
<i>Bothropsatrox</i>	Veneno Total		15 (12,8-57,0)	18
<i>Bothrops asper</i>	Veneno Total		10 (16,5-61,5)	2
<i>Bothrops venezuelensis</i>	Fracción I		11 (10,0-71,0)	Este trabajo
<i>Bothrops colombiensis</i>	Fracción I		16 (14,5-71,0)	15

<sup>a</sup> Presenta dos fracciones adicionales de bajo peso molecular y no mantiene semejanza con las dos fracciones de bajo peso molecular características de todos los venenos comparados, las cuales presentan similares configuraciones y localizaciones dentro del perfil de elución.

<sup>b</sup> Presenta sólo una fracción de bajo peso molecular.

<sup>c</sup> Presenta cuatro bandas por debajo de 11.500 dalton, siete por debajo de 14.900 dalton, ocho por debajo de 16.500 dalton y una sola por encima de 5.200 dalton.

serpientes de distintas zonas geográficas de Perú, se observó que *B. atrox* de Iquitos y Pucallpa, mostraron dos fracciones más que el veneno de *B. venezuelensis*; *B. barnetti* de Lambayeque mostró un pico más que la muestra, manteniendo la característica observada para las dos fracciones finales de menor peso molecular, *B. hyoprurus* de Centro Unión y Moropón mostraron dos fracciones menos que el veneno de *B. venezuelensis* y una sola fracción final de muy bajo peso molecular, finalmente el veneno de *B. pictus* de Lima mostró dos fracciones más que la muestra, conservando el patrón observado para las dos fracciones de menor peso molecular [8].

### Actividades enzimáticas

La TABLA II muestra el resumen comparativo de los datos expuestos.

**Proteasas:** El veneno total de *B. venezuelensis* en estudio mostró una actividad proteolítica aproximadamente tres veces menor a la presentada por los venenos de las serpientes *B. venezuelensis* [13] y *B. castelnaudi* de Venezuela [10]. Por otro lado, el veneno total de la serpiente *B. colombiensis* de Venezuela presentó el doble de las unidades mostradas por el veneno muestra [12]. Lomonte y Gutierrez [7] reportan, en el veneno total de *B. nummifer* de Costa Rica, actividades caseinolíticas con valores muy similares a los presentados por *B. colombiensis* de Venezuela. Por su parte, el veneno total de *B. picadoi* de Costa Rica presentó un valor de actividad caseinolítica aproximado al obtenido por veneno total de *B. venezuelensis* de trabajo [7]. El veneno muestra, presentó una activi-

dad caseinolítica aproximadamente el doble de la reportada para los venenos totales de las serpientes *B. atrox* de diferentes zonas de Colombia, una actividad aproximadamente cuatro veces mayor a la de *B. nasutus* de Urubá (Colombia) y cinco veces mayor a la de *B. nasutus* del Magdalena Medio y *B. schlegelii* de Antioquia, Colombia [9]. Azevedo [1], reportó actividad caseinolítica para el veneno de *B. jararaca*.

Los venenos de *B. venezuelensis* [13] y *B. colombiensis* de Venezuela [12], también mostraron actividad caseinolítica en la fracción I.

**Esterasas:** El veneno total de *B. venezuelensis* en estudio, presentó la menor actividad esterásica sobre B.A.E.E., en comparación con los venenos de *B. venezuelensis* [13] 300 U/mg y *B. colombiensis* de Venezuela [11], 480 U/mg. Comparando con el veneno total de *B. castelnaudi* de Venezuela, este último presentó un valor de actividad esterásica aproximadamente 10 veces mayor al reportado para el veneno muestra 2400 U/mg [10].

**Fosfolipasa A<sub>2</sub>:** La actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> reportada para el veneno de trabajo, resultó ser la mitad del valor obtenido para el veneno total de *B. venezuelensis* de Scannone [13]. Comparando con el veneno de *B. colombiensis* de Venezuela [12], se observó que el valor de actividad de este último corresponde aproximadamente a cuatro veces el valor obtenido para el veneno muestra, 110 U/mg. Por su parte, el veneno total de *B. castelnaudi* de Venezuela, presentó una actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> aproximadamente veinticinco veces menor que el veneno en estudio 1,65 U/mg [10].

TABLE II  
RESUMEN COMPARATIVO DE LOS VALORES DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS VENENOS TOTALES Y FRACCIONES DE VARIAS ESPECIES DE *BOTHROPS*

Especies comparadas	Proteasas TU <sup>cas</sup> /mg	Esterasas U/mg	Fosfolipasa A <sub>2</sub> U/mg	Referencias
<i>Bothrops venezuelensis</i> Veneno Total	116 <sup>a</sup>	209	36	Este trabajo
<i>Bothrops venezuelensis</i> Veneno Total	3 veces >a	300	60	13
<i>Bothrops castelnaudi</i> Veneno Total	3 veces >a	2400	1,65	10
<i>Bothrops colombiensis</i> Veneno Total	2 veces >a	*	110	12
<i>Bothrops nummifer</i> Veneno Total	2 veces >a	*	*	7
<i>Bothrops picadoi</i> Veneno Total	Igual a <sup>a</sup>	*	*	7
<i>Bothrops atrox</i> Veneno Total	2 veces >a	*	*	9
<i>Bothrops nasutus</i> de Urubá Veneno Total	4 veces >a	*	*	9
<i>Bothrops nasutus</i> de Magdalena Medio Veneno Total	5 veces >a	*	*	9
<i>Bothrops schlegelii</i> de Antioquia Veneno Total	5 veces >a	*	*	1
<i>Bothrops colombiensis</i> Veneno Total	*	480	*	11
<i>Bothrops venezuelensis</i> Fracción I	112 <sup>b</sup>	96	No presenta	Este trabajo

(\*) No reportados

## Perfil electroforético

La TABLA I muestra el resumen comparativo de los datos expuestos.

Los resultados de las electroforesis muestran marcadas diferencias entre los patrones de corrida obtenidos para los venenos totales de *B. venezuelensis* reportados por Scannone y col. [13] y el pool de trabajo actual. Se observó que el veneno de trabajo presenta un menor número de bandas, con pesos moleculares que se encuentran en un rango entre 61.500 y 10.000 dalton, en comparación con el utilizado por Scannone que presentó dieciséis bandas, con rangos de peso molecular entre 11.500 y 76.000 dalton. El veneno de trabajo presentó cuatro bandas con pesos por debajo de 11.500 dalton. Comparativamente con el veneno total de *B. colombiensis* de la zona central de Venezuela [15], se observó que éste último presentó trece bandas, una banda más que el veneno de trabajo, con pesos moleculares en un rango entre 14.900 y 52.000 dalton. El veneno muestra presentó siete bandas por debajo de 14.900 dalton y una banda sobre 52.000 dalton. Con respecto al *B. atrox* del Paují Venezuela [18], este último presentó tres bandas más que el veneno muestra con un rango de pesos moleculares comprendidos entre 57.000 y 12.800 dalton. El veneno total de *B. asper* de Costa Rica, [2], presentó diez bandas de las cuales dos de encuentran sobre los 61.500 dalton. Con respecto a la zona de bajo peso molecular se observó que el veneno total de trabajo presentó ocho bandas por debajo de los 16.500 dalton, límite de menor peso molecular reportado para *B. asper* [2]

Con respecto a la fracción I se observó que el pool de trabajo presentó once bandas, cinco menos que las reportadas para la fracción I de *B. colombiensis* de la zona central de Venezuela. Ambas fracciones presentaron pesos moleculares de 71.000 dalton como límite del rango superior, pero *B. colombiensis* no presentó bandas menores de 14.500 dalton [15].

## AGRADECIMIENTO

Al personal que labora en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, por su colaboración durante la elaboración de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AZEVEDO, M.; MARTIRANI, I. Ação proteolítica do veneno da *Bothrops jararaca*. **Mem. Inst. Butantan**. 22:31-46. 1950.
- [2] CHÁVEZ, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**. Vol. 30 (9): 1099-1109. 1992.
- [3] FURUKAWA, Y.; HAYASHI, K. Factor X converting and thrombin-like activities of the *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. Vol. 15: 107-114. 1977.
- [4] GRILLO, O.; SCANNONE, H. Fractionation of *Crotalus durissus cumanensis* venom by gel filtration. **Toxicon**. Vol. 14: 400-403. 1976.
- [5] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4. **Nature**. Vol. 227, August 15, 1.970.
- [6] LANCINI, A. **Serpientes de Venezuela**. Editorial Artimano, Segunda edición, 262 pp. 1986.
- [7] LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. La actividad proteolítica de los venenos de las serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Rev. Biol. Trop.** 31 (1): 37-40. 1.983.
- [8] OREJUELA, P.; ZAVALETA, A.; SALAS, M.; MARSH, N. Thrombin-like activity in snake venoms from peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. **Toxicon**. Vol. 29, No. 9: 1151-1154. 1991.
- [9] OTERO, R.; OSORIO, R.; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, C. Efectos farmacológicos y enzimáticos de las serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). **Toxicon**. Vol. 30, No. 5 y 6: 611-620. 1992.
- [10] SCANNONE, H. Propiedades químicas y biológicas del veneno de *Bothrops castelnaudi* XIII Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica y XVI Congreso Centro Americano y el Caribe de Ciencias Farmacéuticas. Santo Domingo, República Dominicana, del 27 de Noviembre al 3 de Diciembre de 1988.
- [11] SCANNONE, H.; FERNÁNDEZ, N.; FERNÁNDEZ, I.; VARGAS, A. Caracterización bioquímica y toxicológica de la fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* (mapanare). **Acta Científica Venezolana**, Vol. 44 (supl.1): 34. 1993.
- [12] SCANNONE; H., GRILLO, O. Physical, chemical and biological characteristics of the vemon of *Bothrops colombiensis* The 6<sup>th</sup> International Symposium of animal, plants and microbial toxins. **Toxicon**. Vol. 17, suppl 1:161. 1979.
- [13] SCANNONE, H.; GRILLO, O.; FERNÁNDEZ, I. Estudio del veneno de *Bothrops venezuelensis* **Acta Científica Venezolana**, Vol. 45 (supl.1): 123. 1994.
- [14] SCANNONE, H.; GRILLO, O.; FERNÁNDEZ, I. Estudio del veneno de *Bothrops colombiensis*, fraccionamiento sobre filtración por gel. **Acta Científica Venezolana**, Vol. 45 (supl. 1): 315. 1994.
- [15] SCANNONE, H.; GRILLO, O.; FERNÁNDEZ, I.; VARGAS A. Estudio del veneno de *Bothrops colombiensis*. **Acta Científica Venezolana**, Vol. 45 (supl. 1): 315. 1994.

- [16] TU, A. **Venoms: Chemistry and molecular biology**. A Wiley-Interscience Publication, 1<sup>ra</sup> Ed. 1-19. 1977.
- [17] TU, A.; GORDON, P.; CHUA, A. Some biochemical evidence in support of the classification of the venomous snakes. **Toxicon**. 3: 5-8. 1965.
- [18] VARGAS, A.; GUEVARA, M.; MÉNDEZ, E.; BATTAGLIA, M.; FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ, N.; LÓPEZ J.C.; SCANNONE, H. Estudio bioquímico y toxicológico del veneno de *Bothrops atrox* de la región del El Paují, Edo. Bolívar. **Acta Científica Venezolana**. Vol. 45 (supl. 1): 314. 1994.
- [19] WIRNT, R. Trypsin en Bergmeyer, H. U. **Methods of enzymatic analysis**, Vol. 2: 1018-1021. 1974.
- [20] YANG, C.; KING, K. Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A<sub>2</sub> from *Hemachatus haemachatus* snake venom. **Toxicon**. 18: 529-547. 1977.