

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PERFILES DE ELUCIÓN CROMATOGRÁFICA DEL VENENO TOTAL DE LA SERPIENTE VENEZOLANA *Crotalus durissus cumanensis* (CASCABEL COMÚN) DE LA VILLA DEL ROSARIO, ESTADO ZULIA Y MENE DE MAUROA, ESTADO FALCÓN. NOTA TÉCNICA

Comparative Chromatographic Elution Profile Study of the Whole Venom of the Snake *Crotalus durissus cumanensis* (Common Rattlesnake) from La Villa del Rosario, Estado Zulia and Mene de Mauroa, Estado Falcón. Technical Note

Juan C. López J., Gilberto Negrón G., José Villavicencio¹ y Manuel Alvarado M.

Unidad de Investigaciones Ofidológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15.252. Maracaibo 4005-A, Venezuela. ¹Auxiliar de Laboratorio

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio de los perfiles de elución de dos lotes del veneno total de serpientes *Crotalus durissus cumanensis*, provenientes de la Villa del Rosario (estado Zulia) y Mene de Mauroa (estado Falcón), con la finalidad de compararlos con los perfiles de elución de serpientes de la misma especie pero de distinta zona geográfica. Igualmente, se realizaron comparaciones con los perfiles de elución del veneno total de las serpientes venezolanas *Crotalus vegrandis* y *Crotalus pifanorum* y con serpientes de varias especies del género *Bothrops* venezolanos y suramericanos, con los cuales guarda relaciones filogenéticas cercanas, para establecer semejanzas y diferencias primarias en sus composiciones proteicas. Los perfiles de elución se obtuvieron mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna XK26/100 empacada con Sephadex G-100 Superfine con una longitud de 95 cm y una velocidad de flujo de 7,4 mL/hora. Los perfiles de elución de ambas zonas presentaron un total de 8 picos o fracciones cada uno, manteniendo patrones de elución muy similares, pero observándose marcadas diferencias en los tamaños de los picos I, IV, V y VI al compararlos entre sí. De la misma manera se encontraron similitudes en las posiciones y tamaños de los picos de menor peso molecular al comparar estos perfiles con los del género *Bothrops* considerados.

Palabras clave: Fraccionamiento, veneno, cascabel.

ABSTRACT

The present work make a study of the elution profile of two whole snake venom pools of *Crotalus durissus cumanensis* from La Villa del Rosario (Zulia state) and Mene de Mauroa, (Falcón state), in order to compare their elution profiles with the elution profile of the same snake venoms species from other geographics areas. Likewise, they were compared with *Crotalus vegrandis* and *Crotalus pifanorum* venoms elution profiles and some elution profiles of Venezuela and southamerican's *Bothrops* genera, due to their close phylogenetic relationship, to stablish resemblances and differences between proteic composition. This study try to make a comparison among different elution profiles to find protein composition differences. The elution profile was obtained by molecular exclusion chromatography using an xk26/100 column packed with Sephadex G-100 Superfine, of 95 cm long at 7,4 ml/h of flow velocity. The elution profile of both zones showed eight peaks each one, keeping elution standards very similar, but with different sizes in the peaks number I, IV, V and VI. Also, were found similitude of size and position among the lower molecular weight, in comparison with the *Bothrops* genera picks.

Key words: Fractionation, venom, rattlesnake.

INTRODUCCIÓN

La serpiente *Crotalus durissus cumanensis* (cascabel común) se encuentra ampliamente difundida por todo el territorio nacional hasta los 2.500 metros sobre el nivel del mar. Tiene hábitos nocturnos y vespertinos y prefiere vivir en zonas bajas y cálidas. Posee un veneno muy activo y neurotóxico [4]. Los venenos de las serpientes, especialmente los de la familia *Crotalidae*, contienen un gran número de proteínas, farmacológica y bioquímicamente activas. No sólo son los venenos más complicados, en comparación con los de los venenos de otras familias, también contienen las proteínas de mayor peso molecular [8]. Por ejemplo, al comparar los patrones de fraccionamiento obtenidos por la separación de ocho venenos de las familias *Crotalidae*, *Viperidae* y *Elapidae* sobre *Sephadex G-75* y *G-50*, todos los venenos de la familia *Crotalidae* presentaron patrones de elución más cercanos al volumen vacío que los de las otras familias, lo que sugiere que éstos poseen fracciones de pesos moleculares mucho más altos. [8]. En vista de la complejidad de la naturaleza de estas sustancias, en este trabajo se realiza un estudio comparativo a nivel cromatográfico entre los perfiles de elución de los venenos totales de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario (estado Zulia) y Mene de Mauroa (estado Falcón), correlacionándolos con los perfiles de elución de otras cascabeles de la misma especie y distinta zona geográfica, del mismo género pero diferentes especies y con serpientes del género *Bothrops*. El fraccionamiento del veneno total mediante la cromatografía de exclusión molecular, constituye el primer paso para la caracterización de los venenos de serpientes, por cuanto inicia el aislamiento de los diferentes principios activos

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la muestra de veneno total

Los lotes de veneno de *Crotalus durissus cumanensis* fueron obtenidos a partir del ordeño manual de los 7 animales procedentes de la Villa del Rosario y 5 animales procedentes de Mene de Mauroa, sedados con Dióxido de Carbono (CO₂) y mantenidos en cautiverio en el bioterio de serpientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Inmediatamente después de la extracción, el veneno fue liofilizado y almacenado en viales a -20°C.

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 2,6 cm de ancho empacada con *Sephadex G-100* (Pharmacia Fine Chemicals) utilizando como eluyente buffer acetato de amonio 0,2M a pH 6,8. Para cada fraccionamiento, se disolvieron 200 mg de veneno seco en 5 ml de eluyente, centrifugados a 3.000 rpm a 4°C y eluidos. Las fracciones fueron recogidas en alícuotas de 4 ml/tubo mediante un

colector automático (SupreFrac, Pharmacia Biotech). Todo el proceso fue realizado en un cuarto frío a 4°C [5].

Determinación del perfil de elución y obtención de las fracciones

Los eluatos fueron leídos a 280 nm con un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-1201 y se trazó el perfil de elución. Las fracciones por debajo de cada pico fueron reunidas por separado, liofilizadas y guardadas a -20°C [5].

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos a partir de los fraccionamientos de los lotes de veneno total *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa serán comparados con los reportados para los venenos totales las serpientes *C. durissus cumanensis* de otras zonas del país, *C. pifanorum*, *C. vegrandis* y los de reportados para varias especies de serpientes del género *Bothrops* venezolanos y peruanos.

Resultados

Fraccionamiento del veneno total y determinación del perfil de elución

La FIG. 1 muestra los perfiles de elución obtenidos a partir del fraccionamiento de los lotes de veneno total de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* provenientes de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa, respectivamente. Se realizaron 6 corridas para cada muestra de veneno, obteniéndose en cada caso una alta reproducibilidad de los patrones de elución para cada tipo. En ambos perfiles de elución se observaron 8 picos claramente identificados, con concentraciones proteicas variables que comenzaron a eluir con el volumen vacío (V₀) de la columna. Con respecto al perfil de elución del veneno total proveniente de las serpientes de la Villa del Rosario, se observó que los picos I y II poseían pesos moleculares muy cercanos entre sí, siendo el pico I de menor tamaño que el pico II, de la misma manera los picos III, IV y V se muestran muy cercanos, siendo el pico IV el de mayor tamaño y el pico III el de menor tamaño. Por último, los picos VI, VII y VIII se comportan como picos individuales y bien definidos. En el caso del perfil de elución obtenido a partir del veneno de las serpientes de Mene de Mauroa, se observó que el patrón de distribución de los picos se mantuvo muy similar al obtenido con veneno de las serpientes de la Villa del Rosario, pero con claras diferencias en cuanto a las concentraciones proteicas en los picos I, IV, V y VI mostrados en éstos.

DISCUSIÓN

Comparando los perfiles de elución de los venenos de los lotes de trabajo de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa con los de otras serpientes venezolanas de la misma especie,

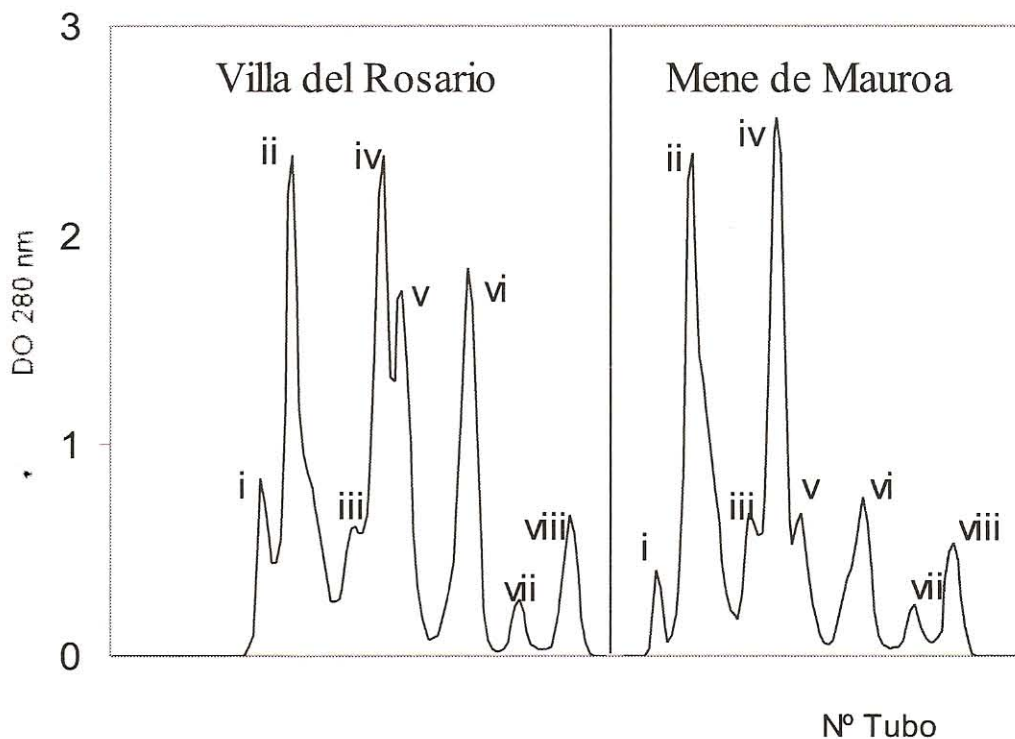


FIGURA 1. PERFILES DE ELUCIÓN DE LOS VENENOS TOTALES DE *Crotalus durissus cumanensis* DE LA VILLA DEL ROSARIO (ESTADO ZULIA) Y MENE MAUROA (ESTADO FALCÓN).

pero de distintas zonas geográficas y del mismo género y distinta especie, se observaron importantes diferencias a nivel interespecífico y de menor magnitud a nivel intraespecífico.

El perfil de elución obtenido a partir del veneno total de *Crotalus durissus cumanensis* de la región del Guri, estado Bolívar [9], presentó siete picos, uno menos que el perfil de los venenos de la presente investigación. De la misma forma, el perfil de elución del veneno total de *C. durissus cumanensis* provenientes de la región de Clarines, estado Anzoátegui [1], presentó siete picos, con un volumen de elución similar al de los venenos de cascabel de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa, en comparación con los ocho picos presentados por los venenos de este trabajo. El pico faltante en el perfil de elución del veneno de Clarines corresponde a los picos III observados en los perfiles de los venenos de esta investigación, los cuales se presentan de muy baja concentración proteica. Relacionando los perfiles de elución de los venenos de la Villa del Rosario y Clarines, se observó que existe similitud proporcional en el tamaño y posición de los picos I y II de ambos venenos. El pico IV del perfil de elución del veneno de la Villa del Rosario presentó mayor concentración proteica que el homólogo del veneno de Clarines, que corresponde al pico III de dicho perfil de elución. El resto de los picos presentaron proporcionalidad en sus concentraciones proteicas. Comparando los perfiles de elución de los venenos de Mene de Mauroa y Clarines, se observó la misma situación con respecto a los picos I, II y IV de La Villa del Rosario, encontrándose diferencias en los picos V y VI del perfil de elución de Mene de Mauroa los

cuales presentaron mucha menos concentración proteica que sus homólogos de Clarines (picos IV y V). El perfil de elución del veneno de *C. durissus cumanensis* de Clarines mantuvo el patrón observado para los dos últimos picos de menor peso molecular al compararlo con los venenos de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa. [1].

El veneno total de la serpiente *Crotalus vegrandis*, [2], presentó tres picos menos que los venenos de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa, manteniendo el patrón de los dos últimos picos de menor peso molecular. El volumen de elución del veneno de *C. vegrandis* fue similar al de los venenos utilizados del presente trabajo, lo cual sugiere que las proteínas de mayor peso molecular de los tres venenos son similares.

Comparando con el perfil de elución del veneno total de la serpiente *C. pifanorum* [7] se observó que éste presentó cuatro picos menos que los venenos de las serpientes de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa, manteniendo la similitud en la presencia de los dos últimos picos de menor peso molecular. Su volumen de elución fue un poco mayor al de los venenos de trabajo, lo cual indica que las proteínas de mayor peso molecular de *Crotalus pifanorum* son de menor tamaño que las presentes en los venenos de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa [7].

Relacionando los perfiles de elución de los venenos de *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario y Mene de Mauroa con los perfiles de elución de los venenos totales de serpientes de las especies *B. colombiensis* [3] y *B. vene-*

zuelensis [5] de Venezuela, se observó similitud en la presencia de las dos fracciones típicas de menor peso molecular localizadas al final de los perfiles de elución y en los volúmenes de elución de los venenos, cercanos al volumen de exclusión de la columna. En general, ambas especies de *Bothrops* presentaron un menor número de fracciones que los venenos de *Crotalus* de trabajo. *B. colombiensis* presentó cinco fracciones mientras que *B. venezuelensis* presentó cuatro, en contraste con *C. durissus cumanensis* de La Villa del Rosario y Mene de Mauroa que presentaron ocho fracciones cada uno.

Con respecto a otras especies de *Bothrops* peruanos se observó que *B. barnetti* y *B. pictus* [6], presentaron los dos picos de menor peso molecular situados al final de los perfiles de elución. Por otra parte, *B. atrox* y *B. hyoprorus* del Perú no presentaron las dos fracciones finales de menor peso molecular [6].

CONCLUSIONES

Los perfiles de elución de los venenos totales de las serpientes *Crotalus durissus cumanensis* de La Villa del Rosario y Mene de Mauroa presentan volúmenes de elución similares para cada pico, aun cuando existan diferencias en las concentraciones proteicas de los mismos.

Las proteínas presentes en los venenos de las serpientes de *Crotalus durissus cumanensis* de La Villa del Rosario y Mene de Mauroa se caracterizan por presentar altos pesos moleculares.

Los perfiles de elución de los venenos de las serpientes *Crotalus durissus cumanensis* de La Villa del Rosario y Mene de Mauroa presentaron importantes diferencias relacionadas el número de fracciones obtenidas y las concentraciones proteicas de las mismas, al compararlas con los perfiles de elución de reportados para los venenos totales *Crotalus durissus cumanensis* de otras zonas geográficas de Venezuela.

Se observaron importantes diferencias al comparar los perfiles de elución de los venenos de las serpientes *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario (estado Zulia) y Mene de Mauroa (estado Falcón) con los perfiles de las serpientes *Crotalus pifanorum* y *Crotalus vegrandis*

Los perfiles de elución de las serpientes *Crotalus durissus cumanensis* de La Villa de Rosario y Mene de Mauroa presentaron similitudes en el tamaño y localización de los dos picos de menor peso molecular al compararlos con los perfiles de elución de los venenos totales de serpientes venezolanas *Bothrops venezuelensis*, *B. colombiensis* y *B. atrox* y las especies *Bothrops barnetti*, *B. pictus*, *B. atrox* y *B. hyoprorus* del Perú.

RECOMENDACIONES

Realizar análisis electroforéticos, tanto de los venenos totales como de cada una de sus fracciones, para determinar los rangos de peso molecular de los diferentes complejos proteicos que conforman cada veneno.

Continuar el proceso de aislamiento de los distintos principios activos presentes en estos venenos de importancia fisiopatológica mediante la utilización de la cromatografía de intercambio iónico.

Continuar los ensayos con venenos totales de las serpientes de otras zonas geográficas del estado Zulia, tomando en consideración diferencias sexuales y etarias.

AGRADECIMIENTO

Al los laboratorios de Bioquímica, Farmacología-Toxicología, Ciencia y Tecnología de la Leche; a la Unidad de Investigaciones Ofidológicas y a la División de Investigación, todos de la Facultad de Veterinaria. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES). A los laboratorios de Inmunología y Ecología Microbiana de la Facultad Experimental de Ciencias, todos de la Universidad del Zulia, por la valiosa colaboración prestada durante el desarrollo del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GRILLO, O.; SCANNONE, H. Fractionation of *Crotalus durissus cumanensis* venom by gel filtration. **Toxicon**. Vol. 14: 400-403. 1976
- [2] GRILLO, O.; SCANNONE, H. Enzymatic activity and other characteristics of *Crotalus vegrandis* snake venom. **Symposium on animal, plants and microbial Toxins**: 223-229, Agosto 1976, San José, Costa Rica.
- [3] GRILLO, O.; SCANNONE, H.; FERNANDEZ, Y. Estudio del veneno de *Bothrops colombiensis* Fraccionamiento por filtración sobre Gel. **Acta Científica Venezolana**, Vol.45. Suplemento No 1: 314. 1994
- [4] LANCINI, A. **Serpientes de Venezuela**. Ernesto Armitano, Editor. Segunda Edición: 209-212, 1986.
- [5] LÓPEZ, J.J.C., VARGAS, A.M.; FERNANDEZ Y.; SCANNONE, H. Caracterización bioquímica y toxicológica de la fracción I del Veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* (TIGRA MARIPOSA). **Acta Científica Venezolana**, Vol. 45: Suplemento N° 1: 124. 1994.
- [6] OREJUELA, P.; ZAVALA, A.; SALAS, M.; MARSH, N. Thrombin-like activity in snake venoms from peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. **Toxicon**. Vol. 29(9): 1151-1154. 1991

- [7] SCANNONE, H.; VARGAS, A.; FERNANDEZ, I. Estudio del veneno de la nueva especie de serpientes *Crotalus pifanorum*, descrita en Venezuela (Sander. 1980). **Acta Científica Venezolana**. Vol. 45. Suplemento Nº 1:123. 1994.
- [8] TU, A. Venoms of Crotalidae, (Crotalids, Pit Vipers). In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. A Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, Ed. New York: 211 - 231. 1977.
- [9] VARGAS, A.; FERNÁNDEZ, Y.; SCANNONE, H.; FERNÁNDEZ, N. Estudio bioquímico comparativo de la fracción IV y el veneno total de *Crotalus durissus cumanensis* de la región del Guri, estado Bolívar. **Acta Científica Venezolana**. Vol.44. Suplemento Nº 1: 35 1993.