

La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína

Bruno Lomonte y José María Gutiérrez

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

(Recibido para su publicación el 18 de noviembre de 1982)

Abstract: Experimental conditions for the comparative measurement of proteolytic activity of Costa Rican snake venoms on casein are established, and the activity of 13 different venoms is described. Venoms showed marked differences in activity not only between species, but between specimens of the same species captured in different geographic regions of Costa Rica.

Los venenos de serpientes ubicadas en la familia Crotalidae se caracterizan por poseer una alta actividad proteolítica (Tu, 1977). El estudio de las enzimas proteolíticas de los venenos de serpiente es importante desde varios puntos de vista. Por un lado, se ha demostrado que algunos componentes tóxicos poseen efecto proteolítico, como es el caso de varias toxinas hemorrágicas (Bjarnason y Tu, 1978). Por otra parte, una vez purificadas y conocida su especificidad, dichas enzimas pueden ser útiles instrumentos en el estudio de la estructura de otras proteínas (Tu *et al.*, 1981).

La actividad proteolítica sobre caseína de los venenos de serpientes de Costa Rica ha sido preliminarmente descrita (Gutiérrez y Chaves, 1980). Sin embargo, en nuestro laboratorio observamos posteriormente que la concentración de veneno utilizada en dichos experimentos fue muy elevada, por lo que la linealidad de la relación entre concentración de veneno y actividad enzimática se perdía para algunos venenos. En el presente informe se describe la actividad proteolítica de los venenos de serpiente de Costa Rica sobre la caseína, empleando condiciones experimentales óptimas para fines comparativos.

MATERIAL Y METODOS

Los venenos utilizados pertenecen a la colección del Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, siendo mezclas obtenidas de gran número de ejemplares de cada especie, congelados inmediatamente después de la ex-

tracción, liofilizados y mantenidos a -70°C hasta su uso. Todos los venenos se disolvieron en solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7,2.

Se utilizó caseína (BDH Chemicals) como sustrato, de acuerdo con Friedrich y Tu (1971), con las siguientes modificaciones: a 2,0 ml de una solución de caseína al 1% en amortiguador de fosfatos 0,1 M pH 7,0 se le añadió 1,0 ml de la solución de veneno (0,1 mg/ml). La mezcla se incubó a 37 C durante 30 minutos y la reacción fue detenida mediante la adición de 4,0 ml de ácido tricloroacético al 5%. Luego de un período de 30 minutos a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados y la absorbancia del sobrenadante fue determinada en un espectrofotómetro Varian-Techtron, empleando una longitud de onda de 280 nm. Se utilizó un blanco en el cual se omitió la solución de veneno. La actividad proteolítica se expresó en Unidades/mg, dividiendo el cambio de absorbancia en 30 minutos por los mg de veneno presentes en el tubo y multiplicando la relación anterior por 100:

$$U/mg = \frac{\Delta A_{280}}{\text{mg veneno}} \times 100$$

Todos los resultados son el promedio de 4 determinaciones \pm una desviación estándar. Todos los reactivos utilizados son de grado analítico.

Se efectuó curvas de actividad proteolítica a diferentes concentraciones de veneno, en un ámbito que varió desde 2,5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 1 mg/ml. Para estas determinaciones se escogió tres vene-

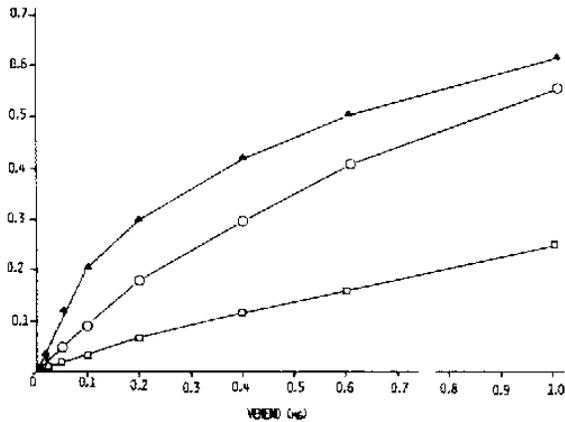


Fig. 1. Efecto de la concentración sobre la actividad proteolítica de los venenos de *B. nummifer*, *C. durissus* y *B. nasuta*. Cada punto representa el promedio de 4 determinaciones.

ΔA_{280} = cambio en la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en 30 minutos.

- Δ *B. nummifer*
- *C. durissus*
- *B. nasuta*

nos con base en pruebas de escrutinio realizadas previamente: el de mayor actividad (*Bothrops nummifer*), uno de actividad intermedia (*Crotalus durissus durissus*) y uno de muy baja actividad (*Bothrops nasuta*).

Se realizó determinaciones empleando períodos de tiempo de 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación, utilizando tanto un veneno de alta actividad (*B. nummifer*) como de baja actividad (*B. nasuta*).

RESULTADOS

Las curvas de actividad proteolítica vs. cantidad de veneno agregado, mostraron que hay una relación que es lineal sólo hasta cierto límite, a partir del cual se observa un aplanamiento de la curva (Fig. 1). Dichos experimentos también mostraron que cuanto mayor es la actividad proteolítica de un veneno, más rápidamente se pierde la relación de linealidad al ir aumentando la cantidad de veneno agregado (Fig. 1). Con base en estos resultados se determinó que agregando 1,0 ml de una solución de veneno de 0,1 mg/ml se está en el ámbito adecuado de linealidad para la determinación comparativa de la actividad de todos los venenos estudiados. Lo anterior se confirmó al

realizarse una curva con el veneno de mayor actividad (*B. nummifer*), utilizando cantidades de veneno entre 0,02 y 0,1 mg; dicha curva mostró una adecuada relación de linealidad (Fig. 2).

Al estudiar el efecto del tiempo sobre la actividad de los venenos, se obtuvo linealidad entre los 15 y los 60 minutos, por lo que se escogió un tiempo de reacción de 30 min. (Fig. 3). La actividad proteolítica sobre la caseína de los venenos de serpientes costarricenses, determinadas en las condiciones óptimas anteriormente señaladas, se resume en el Cuadro 1.

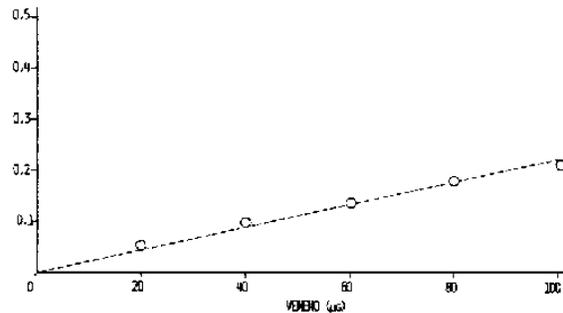


Fig. 2. Efecto de la concentración sobre la actividad proteolítica del veneno de *B. nummifer*. Cada punto representa el promedio de 4 determinaciones.

ΔA_{280} = cambio en la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en 30 minutos.

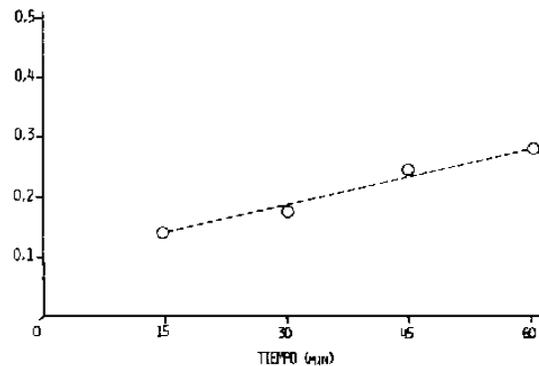


Fig. 3. Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad proteolítica del veneno de *B. nummifer*. Cada punto representa el promedio de 4 determinaciones. La cantidad de veneno utilizada es de 0,1 mg.

ΔA_{280} = cambio en la absorbancia del sobrenadante a 280 nm.

DISCUSION

Todos los venenos de serpientes de la familia Crotalidae estudiados en el presente trabajo po-

seen actividad proteolítica sobre la caseína, aunque existen marcadas diferencias cuantitativas entre los mismos. El veneno de *Micrurus nigrocinctus* presenta una actividad proteolítica muy baja, lo cual coincide con lo descrito en la literatura sobre venenos elapídeos (Tu, 1977).

Existen variaciones cuantitativas en el efecto proteolítico no sólo entre especies, sino que también se observan diferencias al comparar los venenos de ejemplares de distintas zonas geográficas dentro de una misma especie. Esta variación cuantitativa intraespecífica se manifiesta claramente en los venenos de *Lachesis muta* y *Bothrops asper*. Trabajos previos han descrito variaciones intraespecíficas de tipo bioquímico entre estas poblaciones (Jiménez-Porras, 1964; Aragón y Gubensek, 1981). También se han señalado variaciones inmunológicas y toxinológicas entre poblaciones de una misma especie dentro del territorio costarricense (Bolaños *et al.*, 1978; Gutiérrez *et al.*, 1980).

CUADRO 1

Actividad proteolítica sobre caseína de los venenos de serpiente de Costa Rica.

ESPECIE	LOTE DE VENENO	ACTIVIDAD (U/mg)*
<i>Bothrops nummifer</i> (Pacífico)	BNUP-2-79	217 ± 8 **
<i>B. godmani</i>	BG -2-79	172 ± 5
<i>B. lateralis</i>	BL -2-79	141 ± 10
<i>Lachesis muta</i> (Atlántico)	LMA -4-79	134 ± 8
<i>B. picadoi</i>	BP -3-81	103 ± 7
<i>Crotalus durissus</i>	CD -1-79	87 ± 4
<i>B. asper</i> (Pacífico)	BAP -4-79	87 ± 5
<i>L. muta</i> (Pacífico)	LMP -2-79	85 ± 6
<i>B. asper</i> (Atlántico)	BAA -4-79	76 ± 5
<i>B. namu</i>	BNA -2-79	42 ± 3
<i>B. schlegelii</i>	BS -2-79	40 ± 4
<i>B. ophryomegas</i>	BO -2-79	34 ± 6
<i>Micrurus nigrocinctus nigrocinctus</i>	MN -1-80	18 ± 1

$$* U/mg = \frac{\Delta A_{30 \text{ min}}}{\text{mg}} \times 100$$

** cada valor es el promedio de cuatro determinaciones ± una desviación estándar.

Para una adecuada determinación de la actividad proteolítica de los venenos sobre caseína, es necesario establecer condiciones experimentales de manera que se obtenga una relación de linealidad entre la concentración de veneno y la actividad proteolítica. En nuestro caso, la cantidad de veneno empleada para el sustrato fijado no puede ser mayor de 0,1 mg/ml. Otros autores han mostrado que al medir la actividad proteolítica de venenos sobre caseína empleando un exceso de veneno, se pierde la relación de linealidad entre concentración de veneno y efecto enzimático (Taborda y Taborda, 1940; Azevedo y Martirani, 1950; Goucher y Flowers, 1964). Al estudiar el veneno de *Bothrops jararaca*, Taborda y Taborda (1940) concluyeron que la determinación

del efecto proteolítico se puede realizar utilizando concentraciones óptimas de caseína y veneno de 1% y 0,1 mg/ml, respectivamente. Estas condiciones son idénticas a las establecidas en el presente estudio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al señor Alvaro Flores B. la valiosa ayuda técnica prestada a este estudio y a la Srta. Gabriela Gutiérrez por el trabajo mecánográfico.

RESUMEN

Se establecen las condiciones óptimas para la determinación comparativa de la actividad proteolítica de los venenos de serpientes costarricenses sobre la caseína y se describe dicha actividad para 13 venenos diferentes. Los venenos mostraron marcadas diferencias de actividad entre las diversas especies y aún entre los venenos de ejemplares de distintas zonas geográficas dentro de una misma especie.

REFERENCIAS

- Aragón, F., & F. Gubensek. 1981. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific coasts of Costa Rica. *Toxicon*, 19:797-805.
- Azevedo, M.P. & I. Martirani. 1950. Ação proteolítica do veneno da *Bothrops jararaca* (Wied). I Ação sobre hemoglobina e caseína. *Mem. Inst. Butantan*, 22:31-46.
- Bjarnason, J.B., & A.T. Tu. 1978. Hemorrhagic toxins from Western Diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry*, 17:3395-3404.
- Bolaños, R., G. Muñoz & L. Cerdas. 1978. Toxicidad, neutralización e inmunoelectroforesis de los venenos de *Lachesis muta* de Costa Rica y Colombia. *Toxicon*, 16:295-300.
- Friedrich, C., & A.T. Tu. 1971. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. *Bioch. Pharm.*, 20:1549-1556.
- Goucher, C.R., & H. Flowers. 1964. The chemical modification of necrogenic and proteolytic activities of venom and the use of EDTA to produce *Agkistrodon piscivorus*, a venom toxoid. *Toxicon*, 2:139-149.

- Gutiérrez, J.M., & Chaves. 1980. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon*, 18:315-321.
- Gutiérrez, J.M., F. Chaves, & R. Bolaños. 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.*, 28:341-351.
- Jiménez-Porras, J.M. 1964. Venom proteins of the Fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon*, 2:155-166.
- Taborda, A., & L.C. Taborda. 1940. Protease do veneno da *Bothrops jararaca*. *Mem. Inst. Butatan*, 14:181-195.
- Tu, A.T. 1977. *Venoms: Chemistry and molecular biology*. Wiley. New York. 104. p.
- Tu, A.T., T. Nikai, & J.O. Baker. 1981. Proteolytic specificity of hemorrhagic toxin α isolated from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochemistry*, 20:7004-7009.