

FRACCIONAMIENTO DE LOS VENENOS DE LAS SERPIENTES *Micrurus mipartitus* y *Bothrops asper* E IDENTIFICACION DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD PERMEABILIZANTE EN MEMBRANAS DE FOSFOLIPIDOS

JOHN ERI VEGA SANCHEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
POPAYAN
2007

FRACCIONAMIENTO DE LOS VENENOS DE LAS SERPIENTES *Micrurus mipartitus* y *Bothrops asper* E IDENTIFICACION DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD PERMEABILIZANTE EN MEMBRANAS DE FOSFOLIPIDOS

Trabajo de grado

Requisito parcial para optar el titulo de químico

JOHN ERI VEGA SANCHEZ

DIRECTOR

LUIS ALBERTO LENIS V Ph.D

COORDIRECTOR

RAFAEL SANTIAGO CASTAÑO V. M. Sc. Ph. D. (Cand.)

ASESOR

GUILLERMO ORTEGA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
POPAYAN
2007

Nota de Aprobación

El trabajo de grado titulado " **FRACCIONAMIENTO DE LOS VENENOS DE LAS SERPIENTES *Micrurus mipartitus* y *Bothrops asper* E IDENTIFICACION DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD PERMEABILIZANTE EN MEMBRANAS DE FOSFOLIPIDOS**", presentado por el estudiante JOHN ERI VEGA SANCHEZ, para optar al título de Químico, fue revisado por el jurados y calificado como:

Aprobado ----

Ph.D. Luis Alberto Lenis

Director

Ph.D. Leonardo Fierro Perez

Jurado

Msc. Albeiro Zambrano Paz

Jurado

Fecha de sustentación 2 de marzo del 2007

DEDICATORIA

A mi madre Nury Sanchez
A mis hermanos Milton Vega Sanchez
y Zuleima Vega Sanchez
Por su amor y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por ser mi constante guía y compañero incondicional.
- A mi madre Nury por su amor, la comprensión y el apoyo incondicional.
- A mis hermanos, Milton y Zully por el cariño, los consejos y la compañía a lo largo de este camino.
- Al profesor Luis Alberto, mi director, por creer en mí, por la confianza, por las enseñanzas que me transmitió, que fueron muchas, por la colaboración absoluta y la disposición como persona que me brindo en todo momento.
- Al profesor Santiago Castaño, mi codirector, por su amistad, por su apoyo y colaboración en todos los momentos, por todas las cosas que me enseñó y por la confianza depositada para realizar este trabajo.
- Al Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales por permitir iniciar el área investigativa en mi carrera y por el apoyo suministrado.
- A la Doctora Cecilia de Plata directora del laboratorio de bioquímica y al Doctor Leonardo Fierro director del laboratorio de fisiología de la Universidad del Valle, por permitirme desarrollar parte del trabajo de grado
- Al bacteriólogo Guillermo Ortega por toda la colaboración y asesoría prestada para poder desarrollar este trabajo y por su amistad.
- A la profesora Olga y al profesor Jaime por sus consejos, gran colaboración y apoyo.
- A mis jurados, Doctor Leonardo Fierro y el Doctor Albeiro Zambrano por la dedicación y colaboración para realizar las correcciones del trabajo de forma eficaz.
- A la profesora Maite y a los monitores de la Unidad: Mónica, Nury, Sebastián y Zully, por la colaboración prestada durante los casi diez meses de trabajo en el HPLC.
- A los integrantes del laboratorio de bioquímica y fisiología Lorena, Mildre, Milton, Gelber por todo la colaboración prestada en el transcurso del trabajo y por valiosa amistad

- A cada uno de los profesores del departamento de química por dejar en mi algo muy valioso y aprovechable como son los conocimientos adquiridos.
- A mis primos Diego, Johana Xiomara y Senaida por todo su colaboración y su apoyo en toda mi estadía en Cali
- A mi gran amigo Andres por su amistad sincera e incondicional, consejos, la compañía y colaboración.
- A mis grandes amigos del alma que quiero tanto Sonia, Alejandra, Manuel y Mauricio con los cuales compartí momentos inolvidables, por su amistad, compañía y ánimo en todo momento.
- A mis compañeros de Q.P.N., Julián, Jordan, Zully, Diana, Mara, Carmen Cristina, William, Deya, Yesenia y Gaby por la colaboración y compañía en las jornadas de laboratorio.
- A todas las personas que hacen parte de mi vida y que me motivaron para culminar felizmente esta etapa.

TABLA DE CONTENIDO

		Pag.
1	RESUMEN	19
2	INTRODUCCIÓN	21
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4	OBJETIVOS	26
4.1	Objetivo general	26
4.2	Objetivos específicos	26
5	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	27
5.1	LAS SERPIENTES	27
5.1.1	Familia elapidae	27
5.1.2	Familia viperidae	28
5.2	IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA DEL VENENO	28
5.2.1	Caracterización epidemiológica	28
5.2.2	El veneno	30
5.3	ASPECTOS BIOQUÍMICOS DEL VENENO	32
5.4	ENVENENAMIENTO POR SERPIENTE <i>Bothrops</i>	39
5.4.1	Efectos locales	39
5.4.1.1	Hemorragia	40
5.4.1.2.	Edema	40
5.4.1.3.	Mionecrosis	40
5.4.1.4	Infección	40
5.4.2.	Efectos sistémicos	41
5.4.2.1.	Cuadro hemorrágico sistémico	41
5.4.2.2.	Coagulopatías	41
5.4.2.3.	Choque cardiovascular	41
5.4.2.4.	Insuficiencia renal	42

5.5	ENVENENAMIENTO POR SERPIENTE <i>Micrurus</i>	43
5.6	BICAPAS LIPIDICAS	45
5.6.1	Composición de las membranas biológicas	45
5.6.2.	La técnica de voltaje-clamp	47
5.6.3.	Cámaras experimentales	49
5.6.4.	Propiedades eléctricas de las bicapas	50
6	METODOLOGÍA	52
6.1	EQUIPOS Y REACTIVOS	53
6.1.1	Equipos	53
6.1.2	Reactivos	55
6.2	ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	57
6.2.1.	Determinación de la cantidad de proteína	57
6.2.2.	Cromatografía por exclusión molecular	58
6.2.2.1	Separación por columna G-75	59
6.2.2.2	Separación por columna G-25	60
6.2.3	Cromatografía de intercambio iónico	60
6.2.3.1	Separación por columna de DEAE celulosa	61
6.2.4	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	62
6.2.5	Electroforesis en gel	62
6.2.5.1.	Limpieza placa de vidrio	63
6.2.5.2	Preparación del gel	63
6.2.5.3	Preparación de la muestra	63
6.2.5.4	Montaje de la cámara electroforetica	63
6.2.5.5	Proceso de tinsión con nitrato de plata	63
6.2.6	Prueba de actividad hemolítica	65
6.2.6.1	Tratamiento sangre de mamífero	65
6.2.6.2	Obtención de fosfolípidos	65
6.2.6.3	Preparación del agar	66

6.2.6.4	Tratamiento caja de Petri	66
6.2.6.5	Adición de muestra (fracciones de veneno)	66
6.2.7	Técnica de bicapas para tamizaje e identificación de fracciones PLA ₂	67
6.2.7.1	Montaje	67
6.2.7.2	Preparación de las soluciones	69
6.2.7.3	Adquisición y análisis de datos	70
6.2.7.4	Estadística	71
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
7.1	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION PROTEICA	72
7.2	CROMATOGRAFÍA POR EXCLUSIÓN MOLECULAR	73
7.3	CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IONICO	91
7.4	ELECTROFORESIS EN GEL	101
7.5	PURIFICARON POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC	108
7.6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPIDICA EN MEMBRANAS ARTIFICIALES	114
8	CONCLUSIONES	130
9	BIBLIOGRAFÍA	132
10	ANEXOS	137

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1: Componentes de los venenos de serpientes	33
Tabla 2: Datos espectrofotométricos del veneno crudo	72
Tabla 3 Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por la separación con Sephadex G-75 <i>B. asper</i>	74
Tabla 4 Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por la separación con Sephadex G-75 <i>M. mipartitus</i>	75
Tabla 5 Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por el proceso de separación con Sephadex G-25 <i>B. asper</i>	83
Tabla 6 Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por la separación con G-25 <i>M. mipartitus</i>	84
Tabla 7 Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por DEAE celulosa <i>B. asper</i>	92
Tabla 8 Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por DEAE celulosa <i>M. mipartitus</i>	93
Tabla 9 Condiciones empleadas en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución HPLC	109
Tabla 10: Tiempos de ruptura de membrana en segundos	118
Tabla 11: Tiempos de ruptura de membrana en segundos	118
Tabla 12 Determinación de la distribución normal por el método de Shapiro Wilk para cada uno de los tratamientos realizados por la técnica de bicapas	122
Tabla 13 Análisis paramétrico de cada uno de los tratamientos realizados por la técnica de bicapas para determinar si estos son estadísticamente diferentes	123
Tabla 14 Comparación por el método de Tukey de los tratamientos realizados por la técnica de bicapas para ver la diferencias significativas entre cada uno de ellos	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Cabeza de una serpiente donde se muestra el aparato venenoso (color azul) el cual esta constituido por una glándula venenosa donde produce y almacena el veneno y los colmillos por los cuales inocula el veneno	32
Figura 2:	Mecanismo de acción de la enzima PLA ₂ sobre la membrana celular, observándose como hidroliza glicerofosfolipidos en la posición <i>sn</i> -2 del glicerol, liberando lisofosfolipidos y ácidos grasos libres.	38
Figura 3:	Serpiente <i>Bothrops asper</i>	39
Figura 4:	Una mordedura de serpiente <i>Bothrops</i> , ocasiona en la víctima dolor, sangrado local, inflamación, alteraciones en la coagulación, y pérdida de tejido muscular, entre otros.	42
Figura 5:	Serpiente <i>Micrurus mipartitus</i>	43
Figura 6:	Mordedura ocasionada por serpiente <i>Micrurus</i> , que por lo general se produce en las manos. Se caracteriza por no presentar necrosis, edema ni sangrado a nivel superficial, la sintomatología es más del tipo sistémico.	44
Figura 7 :	Principales clases de fosfolípidos de la membrana celular humana. Se caracterizan por tener una cabeza polar y dos cadenas de ácidos grasos. Cada tipo de fosfolípido se distingue por el componente unido al residuo de fosfato de la región de la cabeza. Este componente de la cabeza puede ser etanolamina, serina o colina.	47
Figura 8	Cámara de teflón	50
Figura 9.	Montaje para el estudio de bicapas de fosfolípidos. (a) Montaje de la cámara y el microscopio óptico que enfoca el agujero a través de las paredes traslucidas (señaladas por flechas en rojo). (b) Procedimiento para armar la membrana de fosfolípidos en el agujero de la partición. (c) Diagrama de las conexiones de los equipos utilizados.	68

- Figura 10:** Caja de petri con agar-sangre. Nótese los puntos centrales de siembra y el halo semitransparente de la hemólisis inducida por fracciones que contienen la enzima con actividad tipo PLA₂ (obtenidas por la separación con Sephadex G-75 a partir de veneno entero) **(a)** *Bothrops asper* y **(b)** *Micrurus mipartitus*. El color rosado que circunda los halos se debe a los glóbulos rojos que permanecen intactos 77
- Figura 11:** Identificación de fracciones con actividad tipo PLA₂ por hemólisis en agar sangre la cual se determino por su decoloración (formación de un halo semitransparente) para las fracciones obtenidas por el proceso de separación por la columna de Sephadex G-25 **(a)** Veneno de *B.asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus* 86
- Figura 12** Actividad hemolítica de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico. La fracción decolorada del agar es donde se presenta hemólisis por la acción de la enzima con actividad tipo PLA₂ **(a)** Veneno de *B. asper* **(b)** Veneno de *M mipartitus* 95
- Figura 13:** Reacción de copolimerización de monómeros de acrilamida y bisacrilamida para formar un gel poroso 103
- Figura 14:** Equipo de electroforesis vertical en placas 104
- Figura 15:** SDS–PAGE del veneno de *B. asper*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera línea se encuentran los marcadores de peso molecular y en su orden: la mezcla de las fracciones 7–13 obtenidas por la separación por Sephadex G-75, la mezcla de las fracciones 10-20 obtenidas por la separación por Sephadex G-25 y finalmente el veneno entero 105
- Figura 16:** SDS–PAGE del veneno de *B. asper*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera línea se observa el veneno entero seguida de las fracciones 6-12 concentradas, obtenidas por DEAE-Celulosa y por último los marcadores 106

- Figura 17:** SDS–PAGE del veneno de *M. mipartitus*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera línea se observan las fracciones 6-12 concentradas obtenidas por la separación con Sephadex G-75, las fracciones 7-14 concentradas, obtenidas por la separación con Sephadex G-25, el veneno entero y finalmente los marcadores 107
- Figura 18:** SDS–PAGE del veneno de *M. mipartitus*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera parte se observan las fracciones 6-12 concentradas, obtenidas por la separación con DEAE-Celulosa, el veneno entero y finalmente los marcadores 108
- Figura 19:** Cromatograma de las fracciones obtenidas por la separación por DEAE-celulosa veneno de *B. asper* 110
- Figura 20:** Cromatograma de las fracciones obtenidas por la separación por DEAE-celulosa veneno de *M. mipartitus* 111
- Figura 21:** Determinación de la actividad hemolítica para las fracciones obtenidas por HPLC. Se observó para la primera banda presencia de actividad reflejada en la lisis de los eritrocitos presentes en la sangre por acción de la enzima con actividad tipo PLA₂, actividad similar a la del veneno entero **(a)** Veneno *B. asper* **(b)** Veneno *M. mipartitus* 112
- Figura 22:** Cromatograma veneno *B asper* PLA₂ recolectada de la fracción obtenida por DEAE 113
- Figura 23:** Cromatograma veneno *M. mipartitus* PLA₂ recolectada de la fracción obtenida por DEAE 114

LISTA DE GRAFICAS

- Gráfica 1:** Actividad del veneno. Barrido realizado en una longitud de onda entre 200 a 300 nm (eje X). En el eje Y se presentan unidades de absorbancia. Se observa la banda de absorción característica para este tipo de procedimientos, para las dos especies *M. mipartitus*. y *B. asper* 73
- Grafica 2:** Comparación de la actividad frente a la cantidad de proteína de las fracciones obtenidas por la separación a través de Shepadex G-75. En el eje Y (color negro) va la cantidad de proteína en cada fracción y en el eje Y (color rojo) se observa la actividad para cada fracción expresada por el tamaño del halo producido en la prueba de hemólisis para las dos especies **(a)** Veneno de *B. asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus* 79
- Grafica 3:** Comparación de actividad específica frente a la cantidad de proteína. Datos obtenidos por el proceso de separación a través de Shepadex G-75. En el eje Y (color azul) se presenta la actividad específica y en el eje Y (color negro) se observa la cantidad de proteína para cada fracción, en el eje X el numero de fracciones obtenidas en el proceso de separación **(a)** Veneno de *B. asper* y **(b)** Veneno *M. mipartitus* 81
- Grafica 4:** Comparación de cantidad de proteína frente a la actividad de las fracciones obtenidas por la columna con Sephadex G-25 **(a)** Veneno de *B.asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus*. Las fracciones que se encuentran resaltadas por la cuadrícula azul se emplearon para la separación por DEAE-celulosa 88
- Grafica 5:** Comparación de la cantidad de proteína frente a la actividad específica de las fracciones obtenidas por la columna con Sephadex G-25. En el eje Y (color azul) está determinado por la actividad específica y en el eje Y (color negro) está determinado por la cantidad de proteína y en el eje X el número de fracciones **(a)** Veneno de *B.asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus* 90

Grafica 6:	Comparación de la cantidad de proteína frente a la actividad de cada una de las fracciones obtenidas a través de DEAE-Celulosa, la cual permitió seleccionar las fracciones para la siguiente etapa de purificación por HPLC resaltadas por la cuadrícula azul. En el eje Y (color rojo) determinado por la actividad y en el otro eje Y (color negro) por la cantidad de proteína, ambos comparados con el número de fracciones (a) Veneno de <i>B. asper</i> (b) Veneno de <i>M. mipartitus</i>	97
Grafica 7:	Comparación de la cantidad de proteína frente a la actividad específica de las diferentes fracciones obtenidas por DEAE-Celulosa (a) Veneno de <i>B. asper</i> (b) Veneno de <i>M. mipartitus</i>	99
Grafica 8:	Comparación de la actividad específica de las diferentes etapas de purificación por Sephadex G-75, G-25 y DEAE-Celulosa para el veneno de <i>M. mipartitus</i>	100
Grafica 9:	Comparación de la actividad específica de las fracciones obtenidas por Sephadex G-75 y G-25 DEAE- celulosa para el veneno de <i>B. asper</i>	100
Grafica 10:	Registro de energía para determinar el comportamiento de la bicapa de fosfolípidos en el proceso de ruptura por acción de la enzima con actividad tipo PLA ₂ . En el eje Y se observa la corriente en nanoamperios y en el eje X el tiempo en milisegundos. La línea negra representa los cambios de estabilidad de la bicapa. Al inicio la línea base se encuentra estable pero a medida que transcurre el tiempo esta se va desestabilizando por acción de las enzimas con actividad tipo PLA ₂ hasta que la corriente eléctrica empieza incrementarse lentamente. La bicapa se rompe cuando se alcanza un valor de corriente de 10 nA	117

Grafica 11: (a) Tiempos de duración de ruptura de la bicapa por la acción del veneno de las serpientes *M. mipartitus* y *B. asper* (eje izquierdo en segundos y derecho en horas). (b) Ampliación de los tratamientos excluyendo el blanco, donde se observa que las diferentes muestras ejercen una acción diferente sobre la bicapa de fosfolípidos. BLANCO-Ca: solución salina con CaCl_2 sin veneno o enzima, VB-EGTA: veneno entero de *B. asper* en solución de EGTA 0.05 mM, VM-EGTA: veneno entero de *M. mipartitus* en solución de EGTA 0.05 mM, VB-Ca: veneno entero de *B. asper* en solución de calcio 0.2 mM, VM-Ca: veneno entero de *M. mipartitus* en solución de calcio 0.2 mM, FB-EGTA: fracción de PLA_2 de *B. asper* en solución de EGTA 0.05 mM, FM-EGTA: fracción de PLA_2 de *M. mipartitus* en solución de EGTA 0.05 mM, FB-Ca: fracción de PLA_2 de *B. asper* en solución de calcio 0.2 mM, FM-Ca: fracción de PLA_2 de *M. mipartitus* en solución de calcio 0.2 mM.

119

LISTA DE ACRONIMOS Y ABREVIATURAS

HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
mg:	miligramos
min:	minutos
μ L	microlitros
mL:	mililitro
A	Amperios
μ m:	micras
nm:	Nanómetros
$^{\circ}$ C:	Grados centígrados
KD	Kilodaltons
TEMED	Persulfato, N,N,N,N - tetrametiletilendiamina
SDS	Duodecil sulfato de sódio
DEAE	Dietilaminoetil
D	Daltons
TFA	Acido trifluoroacético
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PBS	Buffer fosfato salino
UV:	Ultravioleta
mm	milímetros
s	segundos
h	horas
FE	Fosfatidiletanolamina
FC	Fosfatidilcolina
FS	Fosfatidilserina
nA	nanoamperios
BLANCOEGTA	Solución de EGTA 0.05 mM,

BLANCOCa	Solución de calcio 0.2 mM
VBEGTA	Veneno entero de <i>B. asper</i> en solución de EGTA 0.05 mM
VMEGTA	Veneno entero de <i>M. mipartitus</i> en solución de EGTA 0.05 mM
VBCa	Veneno entero de <i>B. asper</i> en solución de calcio 0.2 mM,
VMCa	Veneno entero de <i>M. mipartitus</i> en solución de calcio 0.2 mM
FBEGTA	Fracción de PLA ₂ de <i>B. asper</i> en solución de EGTA 0.05 mM
FMEGTA	Fracción de PLA ₂ de <i>M. mipartitus</i> en solución de EGTA 0.05 mM
FBCa	Fracción de PLA ₂ de <i>B. asper</i> en solución de calcio 0.2 mM
FMCa	Fracción de PLA ₂ de <i>M. mipartitus</i> en solución de calcio 0.2 mM
M	Molar
m.s.n.m	metros sobre el nivel del mar
r,p.m	revoluciones por minuto
mV	milivoltios
mM	milimolar

1. RESUMEN

En el territorio colombiano habita una gran variedad de serpientes capaces de producir e inyectar venenos en sus presas para inmovilizarlas y matarlas o como defensa contra agresores o depredadores potenciales. Accidentalmente estas serpientes pueden inocular sus venenos en humanos, fundamentalmente de la población rural, generando cuadros clínicos de envenenamiento que, dependiendo de la dosis inoculada, del tipo de veneno y del tiempo que permanece el veneno activo en el organismo, puede ser mortal. La muerte o la amputación de miembros por envenenamiento ofídico puede ser evitada con el suministro oportuno de anti-venenos. Existen en la actualidad sueros anti-ofídicos basados en inmunoglobulinas que neutralizan los componentes activos del veneno, y que son provenientes de otras especies diferentes a los humanos. Aunque relativamente efectivos, la utilización de estos sueros comprende dos dificultades: (a) al estar constituidos por proteínas de especies distintas a los humanos, pueden provocar reacciones inmunológicas por si mismos, y (b) se han observado variaciones filogenéticas, ontogenéticas y geográficas en la composición específica de los venenos de serpientes.

En este contexto y considerando que el accidente ofídico constituye un problema de salud pública, existe gran interés por estudiar las características bioquímicas, la acción farmacológica y las complejas interacciones fisiopatológicas que suscitan estos venenos. Igualmente, el conocimiento de las características bioquímicas de los venenos de especies de serpientes geográficamente endémicas en Colombia, puede contribuir al desarrollo de anti-venenos más efectivos para tratar los accidentes ofídicos en nuestro país, y ayudar a comprender la evolución molecular de las fracciones proteicas que componen estos venenos. Conocimiento que puede contribuir a percibir mejor nuestra biodiversidad y su potencial ecológico y económico.

Con este trabajo se pretende fortalecer la línea de investigación en toxicología en la Universidad del Valle y Cauca, que permitirá conocer la naturaleza y características bioquímicas del veneno específicamente la acción degradante de membrana de la enzima con actividad tipo fosfolipasa A₂ (PLA₂) a través de la comparación del veneno de la serpiente *Bothrops asper* especie ampliamente estudiada y de la cual ya se tienen algunos reportes de su actividad fosfolipídica con el veneno de la especie *Micrurus mipartitus*. De la cual no se conoce reporte alguno de la acción enzimática de la proteína aislada.

El proceso metodológico empleado en el fraccionamiento del veneno entero de las dos especies de serpientes escogidas, consistió en una primera etapa de separación por cromatografía por exclusión molecular, seguida de una separación por cromatografía de intercambio iónico y finalmente por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). A cada fracción se determinó la cantidad de proteína aislada. Se identificaron las fracciones con actividad tipo PLA₂ a través de la prueba de hemólisis indirecta y de electroforesis en gel. Finalmente, la fracción con actividad tipo PLA₂ obtenida por HPLC se utilizó para determinar su acción desestabilizante sobre bicapas artificiales de fosfolípidos, en ausencia y en presencia de calcio. Considerando, su reconocida actividad hemolítica y miotóxica, y con fines comparativos, un fraccionamiento y estudio idéntico se realizó para el veneno entero de individuos de la especie *B. asper*, capturados en la región del Cauca y Valle. Los resultados obtenidos permiten establecer la presencia de una fracción con actividad tipo PLA₂ en los dos venenos analizados y comparar su actividad por el tiempo de desestabilización de las bicapas artificiales, presentando tiempos de ruptura menores para el veneno de *M. mipartitus* y evidenciando que la actividad enzimática tipo PLA₂ aislada del veneno de *M. mipartitus*, tiene una actividad hemolítica y desestabilizadora de bicapas artificiales mayor que la actividad enzimática tipo PLA₂ con actividad hemolítica y desestabilizadora de bicapas artificiales, encontrada en el veneno entero de *B. asper*.

2. INTRODUCCION

Los envenenamientos por mordeduras de serpiente constituyen un problema de salud pública de gran importancia, especialmente en países tropicales y subtropicales [1,2,3,4,5]. Debido al sub-registro estadístico observado, es muy posible que la información que se tiene sobre la incidencia esta subestimada. Se cree que anualmente ocurren varios millones de envenenamientos por mordedura de serpiente en el mundo, con decenas de miles de muertes [6,7,9]. Pese a que existen diversos laboratorios productores de antivenenos en todos los continentes, el impacto de estos envenenamientos, tanto en términos de morbilidad como de mortalidad, afecta enormemente a las poblaciones y a los sistemas sanitarios, en América Latina (Colombia) [8]. Desafortunadamente, las autoridades de salud pública, tanto a nivel nacional como internacional, le prestan muy poca atención a este problema, relegando así al envenenamiento por mordedura de serpiente a la categoría de un accidente desatendido en los albores del siglo XXI.

Los venenos de las serpientes, son secreciones complejas producidas en la glándula venenosa (glándula salival modificada) de las serpientes. Cócteles que contienen fracciones tóxicas, a las cuales se les atribuyen los efectos hemolíticos, proteolíticos, citotóxicos, coagulantes y neurotóxicos. Estas secreciones, se producen y almacenan en las glándulas que están ubicadas en la parte superior de la cabeza. Dicha secreción es empleada por la serpiente para inmovilizar y matar a una presa o como defensa contra agresores o depredadores potenciales.

Los envenenamientos causados por la mayoría de las serpientes de la familia Viperidae inducen un fuerte daño tisular local, caracterizado por edema, bulas, hemorragia y necrosis del tejido muscular. Los efectos patológicos locales son causados, principalmente, por la fracción tipo fosfolípasa A₂ [10,11] y tienen la particularidad de que se desarrollan muy rápidamente después de la mordedura,

por lo que un retardo en el tratamiento trae como consecuencia un daño tisular importante y la aparición de secuelas permanentes. Las manifestaciones sistémicas también ocurren con frecuencia en estos envenenamientos y son causantes de letalidad.

A diferencia de lo anterior, el envenenamiento por elápidos (corales verdaderas y serpientes marinas) se observan manifestaciones neurotóxicas, causadas por neurotoxinas (PLA₂) con acciones pre y post-sináptica a nivel de las uniones neuromusculares. Dichas toxinas causan una parálisis progresiva que puede ser letal cuando se afectan los músculos respiratorios. En envenenamientos por elápidos, y por algunos vipéridos, hay un cuadro de rabdomiólisis generalizada inducido por fosfolipasas A₂, el cual se asocia con mioglobinemia, hiperkalemia e insuficiencia renal aguda. Las manifestaciones sistémicas en envenenamientos por vipéridos incluyen hemorragia espontánea, siendo la hemorragia cerebral la manifestación más seria, desfibrinogénación, coagulación intravascular diseminada y choque cardiovascular secundario a hipovolemia, vasodilatación y efectos directos sobre el miocardio. La insuficiencia renal aguda y el síndrome de estrés respiratorio agudo también son consecuencias frecuentes de estos envenenamientos. Existen muchas excepciones a este perfil fisiopatológico general descrito, dado que los proteomas de los venenos de serpientes incluyen toxinas con muy diversos efectos fisiopatológicos (para un panorama general de las manifestaciones clínicas de estos envenenamientos, véase la referencia ^[12])

La evaluación clínica de los accidentes ofídicos ha demostrado que los envenenamientos deben ser evaluados individualmente para un mejor tratamiento específico. La caracterización bioquímica de los venenos y el conocimiento de las actividades enzimáticas permite aportar la información necesaria para desarrollar antivenenos. Los múltiples antivenenos que circulan en Colombia, muchos de ellos producidos en otros países con venenos no necesariamente idénticos a los de las

serpientes de este país, no resultan tan eficaces como lo podrían ser los antivenenos desarrollados a partir de las especies nativas y capaces de neutralizar los venenos de diferentes regiones.

De allí la importancia de estudiar las fracciones que componen el veneno de cada especie de serpiente que permitan comprender la fisiopatología y de allí, poder establecer un esquema terapéutico para los pacientes que han sufrido un accidente ofídico. Son ya conocidos los efectos de las fracciones tipo fosfolipasa A₂ (PLA₂) de varias especies de serpientes como *Crotalus durissus* (Cascabel), *Lachesis muta* (Verrugoso) y la *Bothrops asper*, (Talla “x”, mapana). Menos estudiadas permanecen las fracciones con actividad PLA₂ de Elápidos como *Micrurus mipartitus*, la cual es responsable de la mayor parte de los accidentes ofídicos de tipo elapídico, ya que prácticamente se distribuye en la mitad occidental de nuestro país (excepto en la Amazonia y la orinoquía) y es una especie que tolera la intervención humana, lo que ha hecho que se les encuentre inclusive en zonas sub-urbanas de las ciudades grandes del país.

Considerando lo anterior, en el presente estudio se hizo un fraccionamiento por separación con cromatografía por exclusión molecular, seguida de una separación con cromatografía de intercambio iónico y finalmente con cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), de las fracciones con actividad tipo PLA₂ del veneno entero de individuos de las especies *Micrurus mipartitus* y *Bothrops asper*, capturados en la región del Cauca y del Valle del Cauca. Para cada fracción se determinó la cantidad de proteína aislada por espectrofotometría a 260 y 280 nm. Se identificaron las fracciones con actividad tipo PLA₂ a través de la prueba de hemólisis indirecta y de electroforesis en gel. Las fracciones con actividad tipo PLA₂ obtenidas por HPLC se utilizaron para determinar su acción desestabilizante sobre bicapas artificiales de fosfolípidos, en ausencia y en presencia de calcio.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia los dos géneros que producen gran impacto epidemiológico debido al accidente ofídico son los causados por el género *Bothrops* (de la familia *Viperidae*) causante del 90 % de este tipo de accidentes con una mortalidad del 2 – 3%. y el género *Micrurus* (de la familia *Elapidae*), causante del 4% de accidentes con una mortalidad del 1-2% [13].

Dentro de las características de la familia *Viperidae*, esta presenta venenos que producen miotóxicidad (destrucción de tejido muscular) y cambios en las cascadas de la coagulación de la víctima (o la presa de la serpiente), mientras que en los Elápidos prevalece la actividad neurotóxica (generando parálisis en el sistema nervioso de la víctima o la presa) [13]

Para el caso de la miotóxicidad se puede citar (entre otras) como molécula responsable a la fosfolípasa tipo 2 (PLA₂), La característica funcional de esta enzima-tóxina es que hidroliza cada fosfolípido de la membrana celular (especialmente fosfolípidos cargados negativamente), liberando su segundo ácido graso y dejándolo libre en la matriz hidrofóbica de la membrana. Experimentalmente se ha visto que esta actividad enzimática desestabiliza la membrana celular y aumenta su permeabilidad, esta acción puede provocar la muerte de la célula y por ende del tejido (necrosis). El tratamiento no oportuno del envenenamiento puede traer como consecuencia para la víctima (hombre), amputaciones de miembros e incluso la pérdida de la vida [14].

Siempre se ha reportado que las PLA₂ de los Viperidos tienen mayor actividad miotóxica, destrucción de tejido muscular (necrosis) que las presentes en los Elápidos. Se ha propuesto que la causa de esta actividad radica en el reemplazo

de un aminoácido Lisina de la posición 49 de la secuencia proteica lo que se relaciona con su mayor letalidad en comparación con los otros géneros de serpientes existentes en el país ^[15].

En este estudio se propone desarrollar un modelo para tamizar enzimas tipo fosfolipasas provenientes del veneno de las serpientes empleando pruebas de halo de hemólisis y la técnica de bicapas lipídicas. Este modelo permitirá responder con mayor certeza, cual es la actividad de cada una de las fracciones que se puedan aislar de los venenos enteros de las serpientes. Utilizando el modelo propuesto, se evaluará comparativamente la actividad enzimática de dos enzimas homólogas producidas en dos organismos venenosos que tienen orígenes filogenéticos diferentes: *Bothrops asper* y *Micrurus mipartitus*. Específicamente en este estudio se busca estudiar la actividad enzimática de la fosfolipasa A₂ encontrada en el veneno de *Micrurus mipartitus* para promover la desestabilización de bicapas lipídicas artificiales en las cuales se pretende simular la composición de fosfolípidos encontrada en la membrana plasmática de fibras musculares de mamíferos. Las investigaciones realizadas previamente sobre la serpiente *M. mipartitus* en cuanto a la composición bioquímica, especialmente la acción hemolítica de la PLA₂, de la cual se conoce únicamente un estudio indirecto de Otero ^[16] con veneno entero pero se desconoce el efecto de sus fracciones o componentes individuales, este estudio plantea que la fosfolipasa A₂ de *M. mipartitus* tendría una actividad importante capaz de desestabilizar la membrana plasmática de músculo esquelético. Este estudio busca corroborar esta hipótesis en un modelo aislado y controlado de bicapas artificiales, aplicando un modelo de tamizaje para aislar la fracción con actividad de fosfolipasa A₂, a partir del veneno completo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Aislar y determinar en las fracciones del veneno de *Micrurus mipartitus* y *Bothrops asper*, los componentes proteicos asociados con actividad tipo PLA₂ y evaluar su actividad enzimática, hemolítica y de desestabilización de bicapas lipídicas, que simulan la composición de fosfolípidos de las fibras musculares de mamíferos.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración proteica de los venenos crudos de las dos serpientes *Micrurus mipartitus* y *Bothrops asper* a través de espectroscopia Ultravioleta Visible.
- Fraccionar los venenos de las serpientes *Micrurus mipartitus* y *Bothrops asper* por cromatografía de exclusión molecular.
- Estandarizar la técnica para la separación de los diferentes componentes peptídicos del veneno de cada una de las dos especies, a través de cromatografía líquida de alta resolución HPLC.
- Identificar la presencia de actividad de la PLA₂ en cada una de las fracciones obtenidas empleando la técnica hemólisis de glóbulos rojos.
- Comparar la actividad de desestabilización de bicapas artificiales de fosfolípidos de cada una de las fracciones de PLA₂, obtenidas del fraccionamiento por HPLC de los venenos enteros de las dos especies estudiadas.

5. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

A lo largo de la historia, las serpientes han sido una parte importante del desarrollo cultural del hombre. Su presencia en las diferentes culturas se encuentra rodeada de mitos y magia. Un ejemplo claro son las tradiciones judeocristianas, en donde la serpiente es considerada como la reencarnación terrenal del mal. En otras culturas, tanto pasadas como presentes, las serpientes han sido divinizadas en los cultos y tradiciones; ejemplo de ello son algunos pueblos orientales, americanos y europeos ^[17].

En la actualidad en Colombia hay 69 especies de reptiles que tienen algún grado de amenaza, la mayor parte de las cuales (43%) se distribuyen en las selvas húmedas tropicales del Chocó y la Amazonía y tan solo 7 especies se encuentran a lo largo de los bosques nublados andinos; muchas de las especies han sido reportadas dentro de áreas protegidas, pero sin embargo esto no es garantía para la supervivencia de estas especies, pues algunas de las causas por la que se ven amenazadas son, la contaminación ambiental que están afectando también a estas áreas y es mucho lo que aun se desconoce acerca de la historia natural de estas especies ^[18].

5.1. Las Serpientes

Es importante la identificación precisa de las serpientes a estudiar; para ello realizamos una breve descripción de las mismas.

5.1.1. Familia elapidae

Comprende algunas serpientes, como las cobras, las mambas, los búngaros, las serpientes de coral americanas y las serpientes australianas. Las serpientes de coral, por lo general son de talla pequeña comparadas con sus parientes de África,

Asia y Australia. Miden entre medio metro aunque pueden llegar a metro y medio. Se encuentran desde los desiertos de EEUU y México a las selvas tropicales y subtropicales de América Central y del Sur. Causan pocos accidentes fatales aunque su veneno es muy tóxico para los humanos. Los elápidos presentan colores aposemáticos, es decir que muestran una pauta cromática muy llamativa con secuencias alternantes de bandas o anillos negros, rojos, blancos o amarillos que en la naturaleza son colores que advierten que el animal que los posee es potencialmente peligroso. De las corales a estudiar, se destaca la especie *Micrurus mipartitus*, la cual es responsable de la mayoría de los accidentes de tipo elapídico y está catalogada como una de las más venenosas en su especie. [19]

5.1.2. Familia viperidae

Se incluye las víboras. Son serpientes de cabeza grande y triangular, debido a la presencia de voluminosas glándulas venenosas de Duvernoy, la cabeza tiene unas pequeñas escamas. El cuerpo es grueso y la cola corta. Las pupilas son verticales como las de los gatos, adaptados a visión nocturna, pues cazan de noche o en lugares umbríos. En esta familia se destaca la especie *Bothrops asper* [19].

5.2. Importancia epidemiológica del veneno

5.2.1. Caracterización epidemiológica

Los accidentes ofídicos son de importancia médica en virtud de su frecuencia y gravedad. En el mundo existen aproximadamente 3.000 especies de serpientes, de las cuales 36 son consideradas venenosas para el hombre, se ha señalado que aproximadamente 22 se encuentran en Colombia. Estas serpientes venenosas pertenecen a 2 familias y 9 géneros y en general para Colombia se pueden encontrar por debajo de los 2.500 m.s.n.m con una sola especie en el mar, siendo

la especie *Pelamis platurus* la única serpiente que se encuentra exclusivamente en el Océano Pacífico ^[13].

La accidentalidad con serpientes se estima en el mundo en unos 5.400.000 casos anuales, de las cuales, 2.682.500 son producidos por serpientes venenosas: La mortalidad por esta causa es de 125.345 personas al año. Para Latinoamérica se estiman 150.000 accidentes con envenenamiento y la muerte de unas 5.000 personas al año por esta causa. Para Colombia, de acuerdo a la información recibida en el Instituto Nacional de Salud (Grupo de Sueros), en el periodo de 1975 a 1999, se recopiló la información de 1.771 accidentes. La mayoría de los accidentes informados corresponden al departamento de Meta (21.63%), seguido por los departamentos de Putumayo (11.29%), Santander (10.78%), Cesar (8.70%), Arauca (8.41%), Norte de Santander (8.13%) y Boyacá (4.91%). Los otros departamentos notificaron los accidentes en menor proporción (< 3% por departamento). De estos accidentes informados, solo el 1.92% murieron. De todos los accidentes informados el 59.91% corresponden a Bothrops, el 2.09% a Micrurus y el 1.3% corresponde a Crótalus. Hay que destacar el 35.91% corresponde a accidentes sin información de la serpiente agresora. Así, de la información recopilada y conocido el agresor, tenemos que para el género Bothrops se presenta la mayor incidencia con el 94.64%, seguido por los géneros Micrurus y Crotalus con 3.3% y 2.06% respectivamente ^[13].

Los reportes indican que las extremidades inferiores en humanos son las que presentan mayor incidencia en los accidentes con el 61.43% debido a que las serpientes son por lo general de hábitos terrestres y estas áreas del cuerpo son las que mas cerca están a un posible ataque. Las extremidades superiores le siguen con el 23.66%. Por tal motivo se recomienda una protección adecuada como zapatos, botas y otros accesorios que pueden reducir significativamente este tipo de accidentes en estas extremidades. ^[20].

Existen múltiples estudios en Latinoamérica acerca de la actividad biológica y bioquímicos de los venenos de las serpientes, como el reporte hecho por Sánchez *et al* [21]. Estudios específicos sobre Bothrops y Micrurus han sido desarrollados por Da Silva y Aird [22], quienes compararon la letalidad y diferencias en composición de venenos en las especies de Brasil, así como estudios comparativos de la composición enzimática. En Colombia Otero *et al* [16], estudió los efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes del área de Chocó y Antioquia.

5.2.2. El veneno

Los venenos se cuantifican según su potencia por la dosis letal mínima, o cantidad de veneno que inyectado es capaz de matar a un animal de laboratorio en el plazo de 24 horas, extrapolada al hombre y en miligramos [19,23,24]. Los venenos de las serpientes son mezclas complejas formadas por proteínas y polipéptidos con una actividad tóxica y enzimática. Pueden ser proteolíticos, coagulantes, hemolíticos y neurotóxicos. En general los venenos de los elápidos e hidrófidos suelen tener efectos neurotóxicos, en tanto que los viperinos y crotálidos los tienen hemotóxicos-citotóxicos [25,26].

Los venenos de elápidos tienen neurotoxinas, miotoxinas y cardiotoxinas. Las primeras producen bloqueo pre y postsináptico en las placas neuromusculares, originando una parálisis flácida que puede afectar a los músculos respiratorios, su actividad es de diez a once veces mayor a la de la d-tubocuranina. Las miotoxinas y cardiotoxinas despolarizan las fibras musculares esqueléticas, cardíacas y lisas, disminuyendo el rendimiento del corazón, originando parálisis, todo esto favorece el shock.

Los efectos de estas dos especies estudiadas son los siguientes [19,24,25]

- **Efectos citotóxicos e inflamatorios.** Por acción de enzimas citolíticas y activación del complemento se liberan mediadores de la inflamación por parte de mastocitos y eosinófilos (histamina, serotonina, bradicinina, etc.) que originan vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar con formación de edema. En ocasiones dificulta la circulación de la sangre con necrosis celular y fenómenos de gangrena.
- **Efectos hemolíticos.** La hemólisis es causada por enzimas proteolíticas y complemento, lo que conlleva anemia que agrava el shock.
- **Efectos trombóticos y hemostáticos.** Muchos venenos activan los factores de coagulación X, V, protrombina y fibrinógeno, y pueden dañar el endotelio vascular. Inicialmente hay un cuadro de coagulación intravascular diseminada (CID), posteriormente hemorragias generalizadas (por orina, digestivo, respiratorio, piel) por agotamiento de los factores de coagulación.
- **Efectos cardiotóxicos.** Con disminución del gasto cardíaco y arritmias.
- **Efectos miotóxicos.** Con miolisis, bloqueo sobre la placa neuromuscular y parálisis respiratoria.
- **Efectos nefrotóxicos.** La mioglobulinuria, hemoglobinuria y shock pueden producir fallo renal agudo.
- **Efectos neurotóxicos.** El veneno actúa sobre las placas neuromusculares de forma similar al curare, originando bloqueo en la transmisión del impulso nervioso a dicho nivel, parálisis muscular, con parálisis respiratoria y muerte.
- **Anafilaxia.** Al estar formados por proteínas de gran peso molecular, actúan como antígenos que despiertan reacción antígeno-anticuerpo que puede ser de dos tipos: tipo I o inmediata, reacciona el antígeno con el anticuerpo fijo a los mastocitos liberando histamina y otras sustancias, que producen hipotensión, shock, broncoespasmo, etc. Y tipo III, más tardía, en la que los inmunocomplejos tras varios días se depositan en los pequeños vasos sanguíneos originando vasculítis, glomerulonefritis, etc.

5.3. Aspectos Bioquímicos del veneno

Estos venenos son secreciones de naturaleza compleja que se producen y almacenan en las glándulas salivales modificadas que están ubicadas en la parte superior de la cabeza de las serpientes (ver figura 1). Están compuestos de proteínas no enzimáticas, enzimas, péptidos, nucleótidos, aminoácidos libres, azúcares fosforilados, lípidos, sodio, potasio, zinc, calcio, magnesio, hierro, cobalto, detritus celulares y bacterias. Sus efectos farmacológicos también son variados y complejos y normalmente se hacen evidentes en alteraciones fisiopatológicas sanguíneas, del sistema cardiovascular, del sistema neuromuscular y en el sistema respiratorio del envenenado [27].

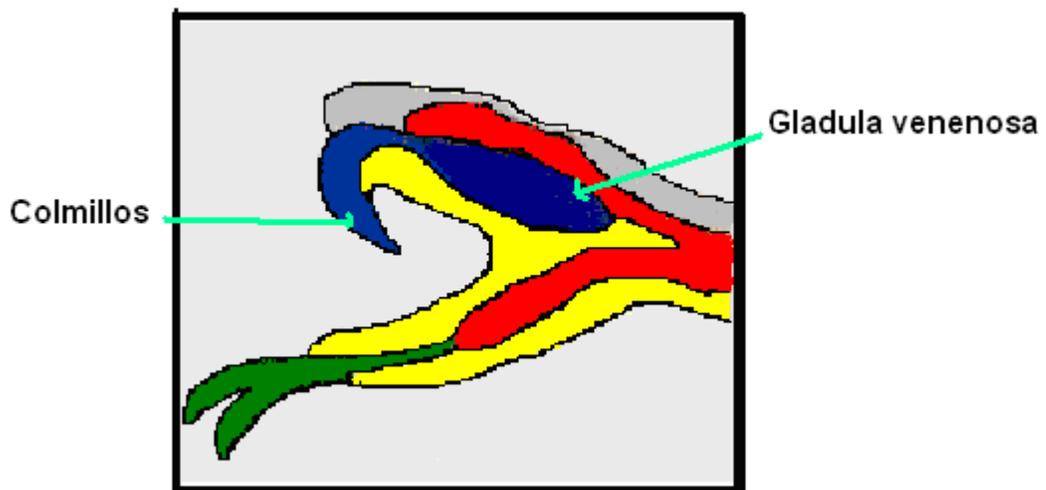


Figura 1. Cabeza de una serpiente donde se muestra el aparato venenoso (color azul) el cual está constituido por una glándula venenosa donde produce y almacena el veneno y los colmillos por los cuales inocular el veneno [27].

En el estudio de los mecanismos de acción de estos venenos, se han identificado varias fracciones que se presentan como responsables de estas alteraciones. Las fracciones más características son: (a) fracciones neurotóxicas; las cuales

interfieren con la transmisión sináptica a nivel de la placa neuromuscular, son letales cuando afectan el movimiento de los músculos de la respiración, (b) fracciones que afectan la coagulación sanguínea; las cuales provocan desfibrinación, coagulación intravascular diseminada y trombocitopenia, causando hemorragias subsecuentes, (c) fracciones citotóxicas y pro-inflamatorias; miotoxinas necrotizantes (d) fracciones proteolíticas; los cuales destruyen las proteínas, causando graves daños a varios tipos de tejidos, (e) fracciones hemolizantes y cardiotoxinas; destruyen los glóbulos rojos, afectando el transporte de oxígeno y pudiendo causar lesión renal. Algunas serpientes poseen en sus venenos más componentes neurotóxicos que hemolíticos, sin embargo, ningún veneno es completamente hemolítico o neurotóxico; todos los venenos son una compleja combinación de toxinas de las dos variedades [1,2,28].

Tabla 1. Componentes de los venenos de serpientes [29]

Componentes del veneno	Acción en la víctima
Glucoproteínas. Proteínas de alto peso molecular	Reacciones anafilácticas
Polipéptidos	Parálisis respiratoria
Neurotoxinas.	Depresión cardiovascular
Cardiotoxinas	Depresión cardiovascular
Enzimas	
Proteasas	Hipotensión arterial
Fosfolipasa A	Hipotensión arterial
Fosfomonoesterasa	Citolisis y hemólisis
Fosfodiesterasa	Citolisis y hemólisis
Exopeptidasa	Citolisis y hemólisis
L-aminoacidooxidasa	Citolisis y hemólisis
Nucleotidasa	Citolisis y hemólisis
Ribonucleasa	Citolisis y hemólisis
Desoxirribonucleasa	Citolisis y hemólisis
Adenosín-trifosfatasa	Citolisis y hemólisis
Nucleótido-pirofosfatasa	Citolisis y hemólisis
Acetilcolinesterasa	Citolisis y hemólisis
Hialuronidasa	Disgregación del tejido conectivo
Colagenasa	Disgregación del tejido conectivo
Elastasa	Disgregación del tejido conectivo

Algunas serpientes poseen en sus venenos más componentes neurotóxicos que hemolíticos, sin embargo, ningún veneno es completamente hemolítico o neurotóxico; todos los venenos son una compleja combinación de toxinas de las dos variedades. Actualmente se ha encontrado que los venenos de serpientes pueden llegar a contener hasta 25 enzimas diferentes, cada una con una función específica (ver Tabla 1). Entre estas enzimas se destacan la fosfolipasa A₂, la hemorragina, la 5-nucleotidasa, la DNAsa II, la RNAsa, la ATPasa, la nucleotido pirofosfatasa, la exopeptidasa, la hialuronidasa, la L-Aminoacidoxidasa, la disopropil flurofosfatasa y la batobobina. Con estructuras muy complejas de las cuales muy pocas han sido determinadas y se desconoce su secuencia de aminoácidos [27].

Los venenos de la familia *Viperidae* basan su acción en fracciones citotóxicas, en fracciones hemolizantes y cardiotoxicas y en aquellas que producen alteraciones de la coagulación. Estos venenos presentan enzimas pro-coagulantes, tales como la serina proteinasa y las metaloproteinasas que activan factores de la cascada de coagulación. Se han identificado también fosfolipasas A₂ que afectan los procesos de coagulación, alteran la agregación plaquetaria e inhiben la cascada de la coagulación y producen hemólisis. La necrosis de tejido muscular es uno de los efectos más característicos del veneno de la familia *Viperidae*. Cuando no hay inactivación por antivenenos, la miótoxicidad culmina en pérdida importante del tejido muscular, deficiente regeneración muscular y disfunción permanente. Las miotoxinas identificadas son fosfolipasas A₂ de la clase II, muy básicas y de acción rápida luego de la inyección del veneno [2,3,4].

De otro lado, las serpientes de la familia *Elapidae* se caracterizan por poseer el veneno más tóxico de todas las serpientes terrestres, la cual depende principalmente de su acción neurotóxica con manifestaciones paráliticas del tipo flácido. La causa de muerte por este tipo de envenenamiento es la insuficiencia

respiratoria. Las neurotoxinas presinápticas de la unión neuromuscular afectan el terminal axónico produciendo ruptura de las vesículas sinápticas, bloqueando completamente la transmisión neuromuscular. Las neurotoxinas postsinápticas se unen y bloquean el receptor de acetilcolina de la placa, produciendo una parálisis flácida. Son más comunes que las toxinas presinápticas, además son menos potentes, pero más rápidas en actividad y potencialmente más letales.

Se ha reportado que el veneno de los elápidos del género *Micrurus* no inducen miotoxicidad relevante desde el punto de vista clínico, sin embargo, se ha reportado que son muy miotóxicos en modelos experimentales de ratones [4]. Este efecto se debe a la acción de fosfolipasas A₂ de clase I, las cuales difieren en varios aspectos estructurales de las fosfolipasas de la familia *Viperidae*. La secuencia completa de una fosfolipasa A₂ miotóxica del veneno de la coral centroamericana *Micrurus nigrocinctus* ha sido determinada y utilizando análisis comparativo de secuencias, se ha identificado un grupo de residuos que están presentes en las fosfolipasas de clase I que presentan actividad miotóxica [5], los cuales son diferentes de los de la región miotóxica de las fosfolipasas A₂ de clase II de venenos de vipéridos [5].

Las especies del género *Micrurus* son las corales venenosas o verdaderas. En Colombia se han descrito 28 especies diferentes. La coral montañera o rabo de ají es un elárido del género *Micrurus*, cuyo nombre científico es *Micrurus mipartitus*. Es una serpiente de vida nocturna y subterránea que alimenta de lagartos y de otras serpientes. Se halla distribuida en Centro América y en el norte de Suramérica. En Colombia es la serpiente posiblemente más abundante en la cordillera de los Andes. Es común en zonas productoras de café y tiene gran penetración en zonas sub-urbanas. Por su alto poder tóxico y por su permanencia en la zona en que habita buena parte de la población colombiana, se considera importante el estudio de su veneno.

Hasta en momento solo se han reportado estudios del veneno entero de individuos de *Micrurus mipartitus* capturados en regiones de Antioquia y Chocó, fue estudiado desde el punto de vista farmacológico y enzimático ^[16]. En dicho estudio se realizaron pruebas para evaluar la actividad proteolítica del veneno entero, y además de su letalidad, actividad desfibrinante, actividad hemolítica indirecta, actividad edematizante, actividad hemorrágica y actividad mionecrótica ^[16]. Los resultados muestran que el veneno de *Micrurus mipartitus* presenta actividad mionecrótica a 10 U/mg ^[16] y actividad hemolítica indirecta a 0.7 µg ^[16], lo cual indica que este veneno fue más potente para estas actividades que la de los Vipéridos y Crótalos estudiados. Los niveles séricos de creatina kinasa observados en animales inyectados con este veneno fueron de 506 UI/L ^[16], indicando que la actividad miotóxica, a la dosis utilizada, es menos severa que la de los Vipéridos y Crótalos estudiados. La dosis letal de este veneno fue de 9 µg/ratón, la cual fue en promedio seis veces menor que la de los Vipéridos estudiados, pero 10 veces mayor que la de *Crotalus durissus terrificus* ^[16], confirmando que es un veneno muy tóxico. La letalidad, sin embargo depende en gran medida de su actividad neurotóxica. Pero se desconoce el efecto que puedan tener sus fracciones o componentes individuales.

La fosfolipasa A₂ juega un rol esencial en la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana celular, regulando de esta manera sus propiedades fisicoquímicas. Se ha descrito que la PLA₂ en el cerebro influye en la función receptora y en la transducción de las señales. En cuanto a las neuronas dopaminérgicas, los datos provenientes de los experimentos con animales sugieren que la activación de la PLA₂ reduce la neurotransmisión dopaminérgica ^[27,30]. Para el caso de la miotóxicidad se puede citar como molécula responsable a la fosfolipasa tipo II (PLA₂), haciendo parte de la batería de enzimas que es producida en la glándula venenosa (glándula salival modificada) de las serpientes ^[31].

Esta enzima-toxina hidroliza los fosfolípidos de la membrana celular, especialmente aquellos cargados negativamente. La hidrólisis rompe el enlace ester de la posición sn2 de los fosfolípidos y libera el ácido graso en la matriz hidrofóbica de la membrana (ver figura 2).

Experimentalmente se ha visto que esta actividad enzimática vuelve inestable la membrana y paulatinamente aumenta de la misma. En la célula esta actividad destruye la integridad de la membrana al permitir el paso de sustancias de un lado al otro como también al romperse membranas de organelos que pudieran liberar sustancias citotóxicas. Se puede decir que evolutivamente la PLA₂ cumple varios propósitos. Un propósito enzimático que les sirve a las serpientes para obtener un alimento predigerido a nivel de las grasas y destrucción del tejido. A su vez, la alta reactividad al compararla con otras PLA₂ (de otros organismos) asegura la muerte rápida de la presa (así se evita el gasto energético de la búsqueda de la presa o la lucha directa con esta) y finalmente sirve como arma química contra agresores potenciales (plano en el que terminamos los humanos en relación con el accidente ofídico) [32].

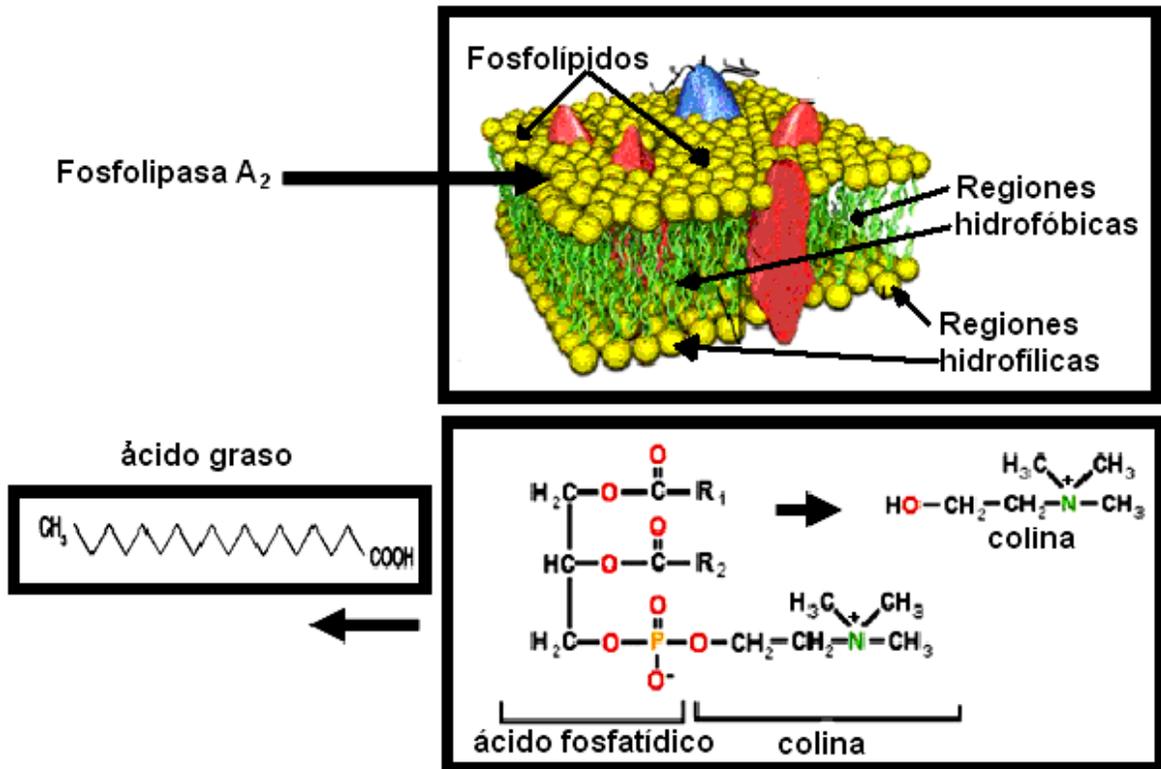


Figura 2. Mecanismo de acción de la enzima PLA₂ sobre la membrana celular, observándose como hidroliza glicerofosfolípidos en la posición *sn*-2 del glicerol, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres [32].

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) es una enzima fisiológicamente clave en el metabolismo de los fosfolípidos de los mamíferos. La PLA₂ extracelular es segregada también por el páncreas como enzima digestiva (tipo I) o es liberada en la sangre por las plaquetas activadas (tipo II). Se ha encontrado PLA₂ intracelular en todas las células investigadas hasta ahora: la enzima está aumentada en las membranas del cerebro, donde cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana para liberar ácidos grasos libres y otros productos como la lisofosfatidilcolina [33].

5.4. Envenenamiento por serpiente *Bothrops*



Figura 3. Serpiente *Bothrops asper* [28].

Los venenos de serpientes de la familia Viperidae inducen un complejo cuadro de alteraciones fisiopatológicas que incluyen tanto efectos locales, en el sitio de la mordedura, como sistémicos. La serpiente *Bothrops asper* (Figura 3), conocida popularmente como terciopelo, barba amarilla o nauyaca, es la que ocasiona el mayor número de accidentes en Centroamérica y Colombia. Su veneno provoca importantes efectos locales (hemorragia, edema y necrosis), así como diversas alteraciones sistémicas (coagulopatías, hemorragia, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda) [28].

5.4.1. Efectos locales [28]

Se caracterizan por presentarse en el sitio de la mordedura, teniendo una evolución rápida y caracterizándose por dolor severo, edema, hemorragia y necrosis.

5.4.1.1. Hemorragia:

El sangrado se produce como consecuencia de la acción de toxinas del veneno conocidas como "hemorraginas" sobre los vasos sanguíneos. Las hemorraginas son metaloproteasas dependientes de zinc, las cuales degradan los componentes de la lámina basal de los capilares y vénulas, ocasionando colapso de los capilares y extravasación. Puede haber necrosis muscular local a causa de la isquemia (por bloqueo de la irrigación sanguínea).

5.4.1.2. Edema:

El edema es un efecto multifactorial, que se desarrolla como parte de una respuesta inflamatoria aguda ocasionada por los envenenamientos de serpientes de la familia Viperidae.

5.4.1.3. Mionecrosis:

La necrosis se produce en el tejido muscular donde se inyecta el veneno, generalmente es de aparición rápida y se debe fundamentalmente a dos factores:

- 1) Por la acción directa de miotoxinas y fosfolipasas A₂ que lesionan directamente la membrana plasmática de las células musculares, ocasionando con esto una entrada masiva de calcio al citoplasma y por consecuencia, alteraciones intracelulares irreversibles.
- 2) Por isquemia causada por la hemorragia y el edema.

5.4.1.4. Infección:

Frecuentemente, estos accidentes cursan con infecciones, ya que se han encontrado venenos contaminados con bacterias, razón por la cual los abscesos son comunes en estas mordeduras.

5.4.2. Efectos sistémicos ^[23]

El veneno se difunde rápidamente y los efectos generalizados pueden aparecer al cabo de 2-3 horas después de la mordedura y en muchos casos de envenenamiento estos llevan a la muerte al individuo. Las alteraciones pueden ser:

5.4.2.1. Cuadro hemorrágico sistémico:

Un sangrado sistémico en órganos y mucosas que puede originar hipovolemia (disminución del volumen sanguíneo), y por ende un choque cardiovascular (síndrome debido a la insuficiente perfusión de sangre circulante a los tejidos). La hemorragia es ocasionada por las hemorraginas del veneno sobre los capilares y se manifiestan con equimosis (mancha en piel por extravasación de sangre), hemoptisis (expectoración de sangre) y gingivorragia (hemorragia de la mucosa gingival).

5.4.2.2. Coagulopatías:

La mayoría de los venenos de la familia Viperidae tienen una enzima "tipo trombina", que actúa sobre el fibrinógeno produciendo microtrombos (coágulos sanguíneos pequeños en el interior de un vaso) de fibrina. Además, algunos venenos activan el factor X de la coagulación.

5.4.2.3. Choque cardiovascular:

Es uno de los efectos principales como causa de muerte en individuos mordidos, sobre todo por serpientes del género *Bothrops*. El cual se caracteriza por presentar sangrado y exudación ocasionados tanto a nivel local como sistémico originan un cuadro hipovolémico que puede llegar hasta un choque cardiovascular.

5.4.2.4. Insuficiencia renal:

Puede presentarse a causa de la acción directa de toxinas en las células de los túbulos renales o de un problema de perfusión a nivel renal. En estos casos se observa oliguria (secreción escasa de orina) o anuria (supresión o disminución de la secreción urinaria) y se elevan las concentraciones séricas de urea y creatinina. Evaluaciones patológicas han demostrado nefrosis de nefrona distal, necrosis tubular aguda y necrosis cortical.



Figura 4. Una mordedura de serpiente *Bothrops* ocasiona en la víctima dolor, sangrado local, inflamación, alteraciones en la coagulación, y pérdida de tejido muscular, entre otros [34].

En resumen, podemos decir que los envenenamientos deben ser evaluados individualmente para un mejor tratamiento específico. Se recomienda realizar las siguientes pruebas de laboratorio: tiempo de protrombina (o tiempo de coagulación), determinación de fibrinógeno, productos de degradación de fibrina, hemoglobina y hematocrito, conteo de plaquetas y leucograma (conteo de leucocitos general), urea y creatinina, entre otros [35].

La caracterización bioquímica de los venenos y el conocimiento de las actividades enzimáticas permite aportar la información necesaria para desarrollar antivenenos. Los múltiples antivenenos que circulan en Colombia, muchos de ellos producidos en otros países con venenos no necesariamente idénticos a los de las serpientes de este país, no resultan tan eficaces como lo podrían ser los antivenenos desarrollados a partir de las especies nativas y capaces de neutralizar los venenos de diferentes regiones.

5.5 Envenenamiento por la serpiente *Micrurus*



Figura 5. Serpiente *Micrurus mipartitus*

Estas serpientes ocasionan una parálisis, debido a la presencia en el veneno de neurotoxinas que afectan el sistema nervioso periférico. Es importante recordar que los venenos de coral no producen ninguna lesión o daño en el sitio de la mordedura. De tal forma que, a nivel local no se observa un cuadro inflamatorio relevante, hemorragia ni necrosis seria, tal vez podría producirse un dolor leve a moderado y un ligero edema en el sitio de la inoculación del veneno.

Cuando la coral muerde, el veneno es depositado a nivel subcutáneo, luego se distribuye sistémicamente (vía linfática y hemática) hasta llegar a las uniones

neuromusculares. Aquí se produce un bloqueo sináptico característico de estos envenenamientos, ocasionado por las neurotoxinas.



Figura 6. Mordedura ocasionada por serpiente *Micrurus*, que por lo general se produce en las manos. Se caracteriza por no presentar necrosis, edema ni sangrado a nivel superficial, la sintomatología es más del tipo sistémico [28].

Se ha descrito también para el veneno de *Micrurus* una acción de tipo pre-sináptica, debido a la actividad farmacológica de fosfolipasas A₂. Las evidencias indican que las fosfolipasas inhiben la liberación del neurotransmisor al unirse a la membrana plasmática de la terminal nerviosa pre-sináptica. Los signos y síntomas desencadenados por la parálisis de varios músculos aparecen luego de varias horas, aunque podría haber casos donde estos se presenten más rápidamente. El primer signo de neurotoxicidad es la ptosis palpebral (caída del párpado) que aparece después de 2 a 6 horas del envenenamiento [26,33]

Posteriormente, el paciente puede tener una diplopia (visión doble), salivación, disnea (dificultad de respirar), y conforme avanza el envenenamiento se presentará una debilidad muscular progresiva que afectará, especialmente hacia

los músculos de la respiración, efecto que ocasionaría la muerte si no hay tratamiento oportuno del paciente [28].

5.6. BICAPAS LIPIDICAS

La técnica de las bicapas lipídicas es una herramienta ampliamente probada para el estudio del transporte de sustancias complejas o sustancias simples como los iones. La técnica brinda la posibilidad de reconstituir artificialmente membranas similares a las que presenta una membrana celular nativa, (manipulando los componentes lipídicos que la conforman) [36,37,38]. Una vez armada la membrana, esta se puede exponer a interacciones con el medio salino circundante como es la composición iónica o de otras moléculas disueltas o se le puede insertar moléculas transportadoras para medir su función de transporte.

Para el caso particular, en el laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, desde hace unos años, la técnica ha sido empleada para evaluar la capacidad que tienen algunos venenos o algunas toxinas para permeabilizar y romper membranas lipídicas.

5.6.1. Composición de las membranas biológicas

Para entender como pueden actuar la PLA₂ en las membranas, debe entenderse la fisiología y la composición de las membranas. Una membrana celular natural es una barrera que separa el medio extracelular del intracelular, siendo éstos básicamente dos medio acuosos que contienen iones y otras sustancias disueltas en diferentes concentraciones. Esta barrera, controla la salida y entrada de los diferentes tipos de moléculas necesarias para el funcionamiento de los procesos metabólicos. Los constituyentes principales de las membranas celulares son proteínas, y fosfolípidos dispuestos en forma de bicapa; estos últimos pueden ser

fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina en diferentes porcentajes, dependiendo del tejido en el que se encuentren. Como se observa en la figura 7. En el caso de las membranas musculares se tiene que estas poseen un 80% de fosfolípidos neutros: fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilcolina (FC) siendo la FE la más abundante en una proporción de 4:1. El 20% restante pertenece a los fosfolípidos cargados: fosfatidilserina (FS) ^[39].

En las membranas celulares los fosfolípidos juegan un papel muy importante, ya que controlan la transferencia de sustancias hacia el interior o exterior de la célula. Una de las características de los fosfolípidos es que una parte de su estructura es soluble en agua (hidrofílica), mientras que la otra, es soluble en lípidos (hidrofóbica). La parte hidrofílica es en la que se encuentra el aminoalcohol o base nitrogenada. Esta característica estructural hace posible que los fosfolípidos participen en el intercambio de sustancias entre un sistema acuoso y un sistema lipídico, separando y aislando a los dos sistemas, a la vez que los mantiene juntos.

En medios acuosos, los lípidos son incapaces de formar soluciones verdaderas; algunos tienen un grupo polar en algún extremo de la molécula, por lo que en medio acuosos pueden formar micelas, monocapas y bicapas que son grupos biomoleculares con gran cantidad de lípidos. Dichos agregados biomoleculares se asemejan notablemente a la disposición de los fosfolípidos en las membranas celulares.

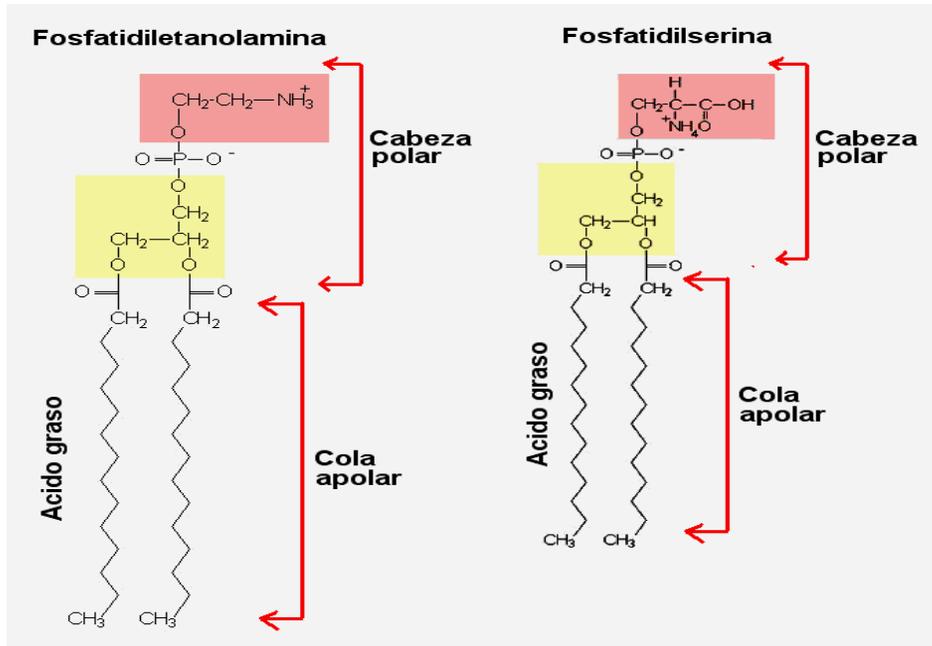


Figura 7. Principales clases de fosfolípidos de la membrana celular humana. Se caracterizan por tener una cabeza polar y dos cadenas de ácidos grasos. Cada tipo de fosfolípido se distingue por el componente unido al residuo de fosfato de la región de la cabeza. Este componente de la cabeza puede ser etanolamina, serina o colina [39].

5.6.2. La técnica de voltaje-clamp

La membrana celular es una barrera que separa dos medios acuosos que contiene iones y otras sustancias disueltas, cuando dos compartimentos acuosos son separados por una división en la cual hay una abertura, los fosfolípidos añadidos al sistema se agregan espontáneamente para formar una bicapa plana a través de esta, que se llama membrana lipídica plana o membrana artificial [39]

Las condiciones que adoptan estas membranas son muy similares a las membranas celulares naturales del hombre, por lo que se puede usar para el

estudio de membranas lipídicas planas, que se construyen sobre la abertura de la pared de una cámara hecha en material aislante. Los cambios en la conductancia de la membrana se pueden observar y cuantificar mediante la técnica de voltaje-clamp que consiste en aplicar un voltaje constante y registrar los cambios de estabilidad de la membrana, por medio de electrodos ubicados a cada lado de la membrana.

Diferentes tipos de investigaciones se han llevado a cabo mediante el uso de esta técnica para estudiar la interacción de los lípidos de membrana con sustancias tales como antibióticos, alcaloides o venenos, que se comportan como ionóforos, pequeñas moléculas hidrofóbicas que se disuelven en los lípidos aumentando la permeabilidad de estos a los iones ^[39]. El cambio de permeabilidad producido por estas sustancias se manifiesta como un cambio de conductancia eléctrica de la membrana. El “tamaño” del cambio de la conductancia es una medida del transporte iónico a través de la membrana y dichos poros pueden abrirse y cerrarse rápidamente o por el contrario permanecer abiertos por mucho tiempo ^[40]. El tamaño de los poros depende de muchos factores tales como el área de la membrana, concentración de la solución iónica, tipo de sal usada en la solución, voltaje aplicado, pH, y temperatura.

Castaño (1998), empleando la técnica electrofisiológica con bicapas artificiales, observó que al exponer veneno entero de viperido en medio acuoso que está en contacto con membranas de lípidos, se puede observar desestabilización de la membrana. En este trabajo se compararon y caracterizaron los poros (cambios discretos de conductancia) producidos por los venenos de viperidos en membranas bilípidicas planas, encontrando que los poros para tres especies de crotalinos en estudio (*B. asper*, *C. durissus* y *P. nasutum*) presentaban conductancias entre los 100 y 800 pS, con mayor abundancia de poros pequeños

que grandes para las tres especies pero mostrándose perforaciones mas grandes para los *Crotalus* y *Bothrops* que para *P. nasutum* [41].

En el 2001 Díaz, et al, usaron la misma técnica para probar la acción de la PLA₂ de *B. asper* y *C. godmani* en los fosfolípidos de membrana, encontrando que las células enriquecidas solo con fosfatidilcolina (Fosfolípidos neutros) permanecen resistentes a la actividad degradativa de la PLA₂, caso contrario a las células enriquecidas con fosfatidilserina (Fosfolípidos cargados) que presentan más susceptibilidad a ser dañadas por las toxinas, sugiriendo que los lípidos cargados constituyen sitios de unión de la PLA₂ [33].

5.6.3. CÁMARAS EXPERIMENTALES

Las cámaras pueden ser de diversas formas y dimensiones, pero siempre deben cumplir con la condición de tener dos compartimentos separados por la partición (película de teflón donde se arma la membrana) por lo que la mayoría son hechos de varias piezas y pueden desarmarse y ensamblarse fácilmente [36], permitiendo la limpieza exhaustiva de las partes. Cuando se ensamblan debe asegurarse la impermeabilización entre los compartimentos para evitar alteraciones en los resultados experimentales, lo cual se hace usando un compuesto inerte en las uniones (Dow corning high vacuum grease), que también mejora la adhesión entre las partes [37].

El material mas usado para este tipo de cámaras es el teflón, porque es un material inerte e insoluble en los solventes derivados de hidrocarburos, que son los que se deben utilizar para el lavado, pues logran barrer todos los residuos de grasas que pueden perturbar el funcionamiento de la bicapa

Para formar una bicapa se debe aplicar una mezcla de lípidos en un orificio de diámetro pequeño, entre 100 y 500 μm , hecho en una partición de teflón, que se coloca entre dos cámaras de igual volumen, cuya capacidad puede variar entre 2 y 10 milímetros ^[36,37], las cuales se llenan con una solución salina acuosa que depende del tipo de experimentos por realizar, según se esquematiza en la figura 8

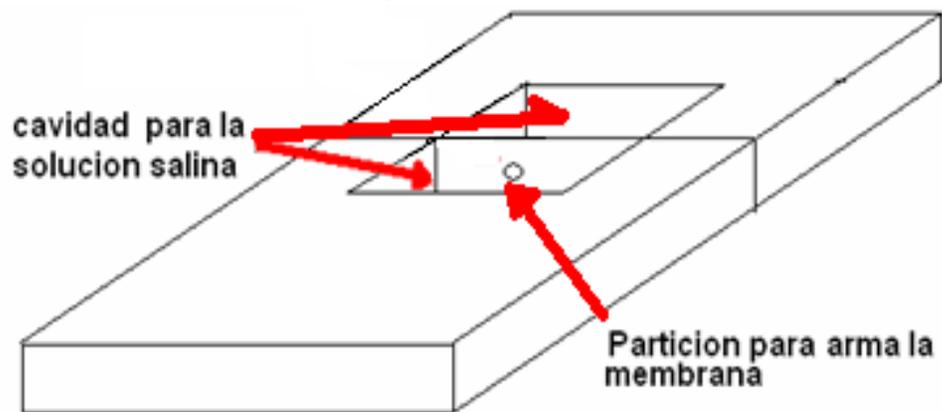


Figura 8: Cámara de teflón

El lavado puede ser una parte crítica de los experimentos porque cualquier contaminación, por mínima que sea, puede alterar significativamente los resultados ya que incrementan notablemente el ruido ^[36,42], razón por la cual debe tenerse una gran disciplina con la limpieza de todo el material que se use en la preparación de las soluciones, además de las cámaras y las particiones utilizadas en la en la fabricación de la bicapa

5.6.4. Propiedades eléctricas de las bicapas

Las bicapas fisiológicas separan dos soluciones salinas acuosas, los modelos eléctricos pretenden representar ese sistema y destacan dos tipos de hechos:

primero, una bicapa puede mirarse como la yuxtaposición de segmentos de bicapa, unos al lado de otros, de manera que sus fases hidrofobicas se unan , y segundo, las principales corrientes son perpendiculares a la superficie de la bicapa, de manera que el circuito equivalente eléctrico tiene por lo menos una resistencia en paralelo con un condensador, algunos modelos la descomponen en tres condensadores con su respectiva resistencia en paralelo, para separar el componente no polar central de los dos componentes polares en las superficies^[43], lo cual permite un estudio mas detallado del comportamiento de las cargas en las bicapas sometidas a diferencias de potencial.

6. METODOLOGIA

El trabajo se realizo con el apoyo científico, logístico y humano del Grupo de Biología Integrativa BINTE de la facultad de Salud de la Universidad del Valle (Línea de toxicología aplicada) y el grupo de Química de Productos Naturales (QPN) de la Facultad de Ciencias Naturales y de la Educación de la Universidad del Cauca.

Para el presente trabajo se partió de los venenos liofilizados los cuales fueron obtenidos de las especies *Bothrops asper* (1 individuo adulto 1,4 m de longitud capturado del corregimiento la Bocana-Bazán del Municipio de Buenaventura) y de la especie *Micrurus mipartitus* (1 individuo adulto de 75 cm de longitud, capturado en la zona rural del municipio de Santander de Quilichao). Suministrados por el Grupo de Biología Integrativa BINTE de la facultad de Salud de la Universidad del Valle. El veneno liofilizado se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS) y se le realizó un proceso de filtrado por microfiltros de 0.45 μ , el cual permitió la eliminación de cierto grado de contaminación bacteriana que haya adquirido el veneno después de su extracción. A la solución de veneno entero se le determinó la cantidad de proteína y acto seguido se procedió realizar el fraccionamiento para cada veneno (Para todos estos procesos se utilizaron sales y reactivos de grado analítico)

Para el aislamiento y purificación de la fracciones con actividad tipo fosfolipasa A₂ (PLA₂), se procedió con algunas modificaciones, con la técnica descrita por Vidal y Stoppani (1971)^[44]. Esta tecnica consta de tres etapas así: La primera consistió en una cromatografía de filtración molecular a través de una columna de Sephadex G-75 seguida por una segunda etapa cromatografía de filtración molecular a través de una columna de Sephadex G-25, posteriormente se realizo una

cromatografía de intercambio iónico. A cada una de las fracciones obtenidas durante estos procesos de separación se les realizaron pruebas de identificación por hemólisis de eritrocitos en geles de agarosa, igualmente electroforesis en gel. Finalmente las fracciones que presentaron la enzima con actividad tipo PLA₂ se someten a una purificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC. Una vez aislada la enzima tipo PLA₂ se determinó su actividad sobre membranas de fosfolípidos empleando la técnica de bicapas y posteriormente se comparó dicha actividad entre los dos venenos estudiados. Todas las fracciones obtenidas por los diferentes procesos de separación que no son utilizadas fueron liofilizadas para eliminarles el contenido de agua y alargar su vida Útil ^[22] para futuros estudios, almacenándolas a -20°C

A continuación se muestran los equipos y reactivos empleados en el desarrollo metodológico.

6.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

6.1.1. EQUIPOS

- Espectrofotómetro Ultravioleta – Visible. Shimadzu UV-1700 pharmaspec. Se utilizó para determinar la concentración proteica de los venenos crudos de las dos especies de serpientes estudiadas y las fracciones obtenidas a lo largo del proceso de separación por cromatografía.
- Centrífuga IEC centra MP4R. Con capacidad para controlar la temperatura. Se utilizo pera centrifugar el veneno y la yema de huevo para retirarles partículas sólidas. Igualmente fue sometida a este proceso sangre para retirar el plasma de los eritrocitos empleados en la prueba de actividad hemolítica.

- Centrifuga Universal 32R Hettich Zentrifugen. Para eppendorf el rotor tiene una capacidad para 30 tubos eppendorf de 1.5 mL se utilizó para centrifugar las fracciones de veneno obtenidas en los procesos de separación cromatográficos.
- Liofilizador utilizado para concentrar el veneno de las serpientes *Bothrops asper* y *Micrurus mipartitus* además de las fracciones obtenidas a lo largo del desarrollo experimental.
- Agitador vortex Maxi Mex II Type 37600. Utilizado para homogenizar las fracciones de veneno
- Autoclave Matachana 21E. Empleado en los procesos de esterilización de los materiales empleados en el desarrollo experimental.
- Campana de flujo laminar (Cabina extractora de gases y humos mes 90 C4), permitió mantener un medio estéril para evitar contaminación biológica de los implementos empleados en los procesos de identificación de PLA₂ en la prueba de actividad hemolítica.
- Incubadora Binder GMBH Bergstr 14D 78533 tuttlinger, utilizado para incubar a una temperatura constante de 37°C del agar sangre para la identificación de PLA₂ de las fracciones obtenidas de todos los procesos de separación
- Nevera freezer Isotemp Fisher scientific, empleada en la conservación del veneno liofilizado y fracciones de veneno obtenidos de los procesos cromatográficos.

- Cromatógrafo de líquidos HEWLETT PACKARD 1100, desgasificador G 1322A, bomba cuaternaria G 1311A, detector UV-Vis G 1314A, columna Hypersil ODS C₁₈ tamaño partícula 10um, 3.6 x 155 mm. Este equipo se emplea en la separación de PLA₂ de las fracciones que presenten mayor actividad hemolítica obtenidas de la separación por columna de DEAE celulosa del veneno de *Bothrops asper Micrurus mipartitus* .
- Montaje para estudio de bicapas lipídicas, que comprende un dispositivo de preamplificación HEADSTAGE (CV-4/100) unido a un amplificador AXOPATCH 1D (Axon Instruments), un filtro (Frequency Devices 900). Por último un osciloscopio (LEADER LBO5825) y simultáneamente es digitalizada (DigiData 1200 SERIES INTERFACE) conducida hasta un computador en el que la señal de la corriente se pueda graficar en tiempo real para ser observada y almacenada, empleando el software FETCHEX de Pclamp 6.0. Empleado en la identificación de PLA₂ de las fracciones obtenidas de las separaciones por HPLC

6.1.2. REACTIVOS

- Buffer fosfato salino PBS 0.5 mM pH 7.2
- Buffer fosfato salino PBS 1 mM pH 7.2
- Cloruro de calcio 10 mM
- Buffer de tris – HCl 5mM pH 7.4
- Hidroxido de sodio 0.25 M
- Acido clorhidrico 0.25 M
- Cloruro de sodio 0.5 M

- Solución salina : CaCl 0.2mM
HEPES 10mM
NaCl 200mM
MgCl₂ 0.1mM

- Solución salina : EGTA 0.05mM
HEPES 10mM
NaCl 200mM
MgCl₂ 0.1mM

- Solución fijadora: Metanol 50%
Ácido acético 12 %
Formaldehído 37%

- Solución de lavado: Etanol al 30%

- Solución de pretratamiento: Tiosulfato de sodio NaS₂O₃5H₂O 0.02 g / 100 mL de solución

- Solución de impregnación: Nitrato de plata 0.2g/100mL
Formaldehído 37 % (75 µL en 100mL)

- Solución reveladora : Carbonato de Sodio NaCO₃ 3 g / 100mL
Formaldehído 75 µL/ 100mL
Tiosulfato de sodio NaS₂O₃5H₂O 6 µg / 100 mL de solución

- Solución de parada: Metanol 50%
Ácido acético 12%

Solventes

- Acetonitrilo taponado con ácido trifluoroacético (TFA) 99.99%
- Metanol 99.98 %
- Etanol 30%
- Cloroformo

6.2. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Con base en las muestras de veneno obtenidas de cada una de las dos especies, se realizaron estudios preliminares para su caracterización bioquímica:

6.2.1 Determinación de la cantidad de proteína

Para determinar la concentración de proteica en cada veneno se realizó una dilución de los venenos con Buffer fosfato salino PBS 50 mM con NaCl 150 mM a un pH 7.2, se centrifugó a 3000 r.p.m para eliminar partículas sólidas y finalmente se determinó la concentración proteica por Espectrofotometría Ultravioleta a una longitud de onda de 280 – 260 nm ^[45].

La determinación de la concentración de proteína en una muestra se basa en que el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la cistina (Cys-Cys) absorben luz ultravioleta a $\lambda=280$ nm. También la fenilalanina (Phe) absorbe a esta longitud de onda, pero en mucha menor medida. Esta propiedad permite medir la concentración de proteínas midiendo la Absorbancia a 280 nm.

Para una mezcla de proteínas, la medida de la A_{280} brinda una aproximación bastante fiable, sobre todo cuando se comparan mezclas de composición similar. Frecuentemente se utiliza el valor de A_{280} para expresar la concentración de proteínas. El mayor inconveniente de este método es que la muestra contenga sustancias que absorban luz UV en esa longitud de onda. Y los principales contaminantes potenciales de las preparaciones de proteínas son los ácidos nucleicos, los cuales absorben fuertemente luz UV, con un máximo a alrededor de $\lambda = 254$ nm. Una fórmula empírica desarrollada por Warburg y Christian (1941) ^[45].

Permite estimar la concentración de proteínas aun en presencia de ácidos nucleicos. Para esto es necesario medir la A_{280} y A_{260} .

$$\text{Concentración proteica (mg)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

Se empleó este método por las siguientes ventajas buena sensibilidad (50-100 μg), la simplicidad y la rapidez de ejecución. Además, como la solución de proteínas no es sometida a ninguna reacción química, se puede recuperar la muestra si fuera necesario. Es particularmente útil para seguir la concentración de proteínas durante la elusión de una cromatografía

6.2.2 Cromatografía por exclusión molecular

La cromatografía por filtración en gel es un método de separación de sustancias macromoleculares de diferente masa molecular. Bastante utilizada para separar y purificar proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otros compuestos importantes de alto peso molecular presentes en el veneno de las dos serpientes empleadas en el trabajo. El único requisito es que la masa molecular de las sustancias que intervienen en el proceso difiera considerablemente una de otra. El veneno pasa a través de una columna cromatográfica; tiene un movimiento que depende del flujo del volumen de la fase móvil y del movimiento de las partículas del soluto.

Se empleó esta técnica como primer paso de purificación debido a su alta reproducibilidad, la baja pérdida de sustancias, el relativo poco tiempo involucrado en el proceso, no requiere de equipo costoso, es reproducible a micro escala y a escala técnica. La filtración en gel es un método flexible y por lo tanto permite que las sustancias muy inestables sean aisladas. Además facilita las

siguientes etapas de purificación ya que cada paso desarrollado va eliminando sustancias del veneno que no son de interés para el estudio

El veneno liofilizado de las dos especies estudiadas se les realizó una etapa de separación, que consta de dos partes una cromatografía empleando Sephadex G-75 y otra empleando Sephadex G-25 las cuales se describen a continuación.

6.2.2.1. Separación por columna G-75

Se pesó 1.5 g de sephadex G-75 (Este Sephadex posee un tamaño de poro de 40-120 μm el cual retiene moléculas entre 3000 a 70000 Daltons) y se diluyó en 30 mL de PBS. Obteniéndose una columna de 20 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro y se dejó por un periodo de 24 horas para su estabilización

Se partió de 50mg de veneno liofilizado de *B. asper*, y 25 mg de veneno de *M. mipartitus* el cual se diluyó en buffer de tris – HCl 5mM a pH de 7.2 y se pasó por la columna de sephadex G-75, eluyéndose con el mismo buffer, con un flujo de 1 mL/min controlado con una bomba peristáltica la cual permitió controlar el flujo de acuerdo a las condiciones requeridas, mejorando la elución evitando que la columna se rebosara de solvente permaneciendo el flujo constante

Se recolectaron 30 fracciones de 1.5 mL cada una. A cada fracción se le determinó la cantidad de proteína por espectrofotometría ultravioleta a una longitud de onda de 260-280 nm. Igualmente se les realizó la prueba de actividad hemolítica

6.2.2.2. Separación por columna G-25

Se tomaron 7 g de Sephadex G-25 (contienen un relleno con forma esférica con poros de un tamaño dado entre 20-50 μm . Este Sephadex, el cual retiene moléculas entre 1000 – 5000 D) y se diluyó en 30 mL de PBS. Obteniéndose una columna de 20 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro y se dejó por un periodo de 24 horas para su estabilización. Las fracciones obtenidas de G-75 que presenten mayor actividad hemolítica se mezclaran, concentrándose por medio de liofilización hasta obtener 2mL de solución de veneno, los cuales se hicieron eluir por la columna utilizando como fase móvil PBS.

Se obtuvieron 30 fracciones de 1.5 ml cada una. Las fracciones recolectadas se les determino la cantidad de proteína por espectrofotometría ultravioleta visible a una longitud de onda de 260-280 nm y se determino su actividad hemolítica.

6.2.3 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se fundamenta en que las proteínas tienen una carga neta determinada por los aminoácidos que la componen y por el pH del medio. Si el pH es superior al punto isoeléctrico ($pI=pH$ al que la proteína tiene carga neta igual a cero), la proteína estará cargada negativamente, y si el pH es inferior lo estará positivamente. Nosotros podemos elegir el pH de trabajo en la columna, separando así las proteínas deseadas para el mejor desarrollo del trabajo.

Para el proceso de separación por cromatografía de intercambio iónico se empleo una columna con una resina catiónica (DEAE-celulosa); esta resina está constituida por una matriz a la que va unido un radical dietil-amino-etil. El N del

radical está cargado positivamente, y será donde se unan las proteínas que posean carga positiva:

Las proteínas que estén cargadas positivamente se unirán, mientras que las que lo estén negativamente no se unirán tanto más fuertes cuanto mayor sea esa carga negativa. Además, para asegurarse de que la carga de las proteínas que se desea retener sea positiva, controlamos el pH del medio con un tampón de pH conocido. Posteriormente, para separar las proteínas de la resina, pasamos varios tampones con creciente concentración de una sal: el NaCl. Los iones Na compiten por la carga de la resina y con la proteína; se separarán primero las proteínas que estén unidas más débilmente a la resina, y al aumentar la fuerza iónica aumentando la concentración de electrolito se separarán las que estén unidas con más fuerza. Eluyendo en las primeras fracciones la enzima con actividad tipo PLA₂ ya que es parcialmente positiva siendo muy débilmente retenida por este tipo de resina.

6.2.3.1. Separación por columna de DEAE Celulosa [46].

Se partió de 4 g de DEAE-celulosa y se diluyo en buffer de tris- HCl 0.5 mM Obteniéndose una columna de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro, estabilizada con 15 mL solución de hidróxido de sodio 0.25 M seguida de un lavado con agua desionizada hasta que el pH fuera neutro (7) se procedió a realizar un segundo lavada con 15 mL de ácido clorhídrico 0.25 M, nuevamente se pasa agua hasta neutralidad finalmente se eluyo con el buffer de tris-HCl y se dejo por un periodo de 24 horas para su estabilización antes de su uso [35].

Las fracciones obtenidas de la columna G-25 que presentaron mayor actividad hemolítica se mezclaron y se concentraron por medio de liofilización obteniéndose 2 mL de solución de veneno que se hicieron pasar por la columna de celulosa

utilizando como fase móvil un gradiente de soluciones de cloruro de sodio a diferentes concentraciones. Para ello se empleo 10 mL de solución de NaCl empleando las siguientes concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0) M eluyendose en el mismo orden. Recolectando 30 fracciones de 1.5 mL cada una, se determina la cantidad de proteína por espectrofotometría visible a una longitud de onda de 260-280 nm. Igualmente a cada fracción se le realizó prueba de actividad hemolítica

6.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Esta técnica se empleó para la purificación de las fracciones que presentaron mayor grado de actividad hemolítico obtenidas de la separación con la columna de DEAE celulosa, para ello se empleo cromatografía de fase reversa con una columna de la Water μ Bondapak TM C₁₈, con una longitud de 12 cm de largo y 0.2 cm de ancho, tamaño de poro de partícula de 10 μ m, la elusión se realizo con un gradiente lineal de 1 ml/min durante 5 minutos. La fase móvil empleada fue agua grado HPLC taponada con TFA al 0.1% ^[14,15].

6.2.5 Electroforesis en gel ^[45,46].

Esta técnica proporcionó un parámetro de identificación de los diferentes compuestos del veneno por medio de la diferencia de los pesos moleculares comparándolos con sustancias de peso molecular conocido. Como se conocía el peso teórico de la enzima se comparó con sustancias de peso molecular similar, la similitud entre las bandas de los geles sirvió como referencia para identificar la posible existencia de la enzima en las fracciones analizadas ^[46]. Para la preparación de la electroforesis se emplea una cámara modelo P8DS. Rated: 0-600V, 0-200mA – Class II Owl separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA

6.2.5.1. Limpieza placa de vidrio

Se lavó con abundante agua destilada para retirar cualquier tipo de contaminación luego se adiciono jabón neutro y se dejó por un periodo de dos horas para retirar cualquier tipo de grasa, se lavó nuevamente con agua destilada y se dejó en etanol al 70% por dos horas finalmente se lavó con agua ultra pura (miliQ) una vez limpia se puso a secar a 50°C por 30 min

6.2.5.2. Preparación del gel

Para ello se tuvo en cuenta los datos del anexo No 3 sobre preparación de geles de corrida a diferentes concentraciones y proporciones de acuerdo a las necesidades de preparación de la muestra

Se tomo un gel de corrida de concentración del 15 %, ya que presenta una buena consistencia y facilito su manipulación a lo larga del procedimiento. El cual contiene acrilamida al 30% tris de HCl pH 8.8, agua ultra pura, duodesil sulfato de sodio (SDS) al 10 %, persulfato, N,N,N,N - tetrametiletilendiamina (TEMED). Se realizó un proceso de desgasificación para eliminar oxígeno que es un inhibidor de la polimerización del gel de acrilamida. Se procedió a adicionarlo en la placa de vidrio previamente sellada para evitar pérdida de la solución y se dejó por un periodo de dos horas para que se efectuó la polimerización, una vez terminado esta etapa se adicionó el gel de apilamiento que se empleo para concentrar la muestra en un sitio menor y por ende se mejoró la resolución de las bandas de corrida de cada muestra. Este consistió en una solución al 4 % que contenía acrilamida al 30% tris de HCl pH 8.8, agua ultra pura, duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %, persulfato, N,N,N,N - tetrametiletilendiamina (TEMED). Finalmente se dejó polimerizar por 30 minutos

6.2.5.3. Preparación de la muestra

La muestra se diluyó en una solución de carga en una relación 1:1 esta solución esta compuesta por SDS, Glicerol, Azul de bromofenol, tris de HCl pH 6.8 y agua

6.2.5.4. Montaje de la cámara electroforética

Se tomaron 10 μ L de muestra preparada e cada poso del gel y se le adicionó buffer de electrodo que contenía tris base, glicina y SDS, sometiéndose a las siguientes condiciones en la fuente de poder para el gel de corrida aplicándose 100 voltios, 15 miliamperios y 10 vatios por 45 minutos. Para el gel de muestra se aplico 300 voltios, 30 miliamperios y 20 vatios por 90 minutos. Se debe tener cuidado de que la corrida de las muestras no se salga de gel preferiblemente que quede a un centímetro del borde

Una vez terminado el proceso de corrida de la muestra se procedió a realizar la tinción con nitrato de plata para observar las bandas de interés.

6.2.5.5. Proceso de tinción con nitrato de plata

Corrido el gel se colocó en una bandeja con solución fijadora por 2 horas con agitación constante, se descartó la solución fijadora realizándole tres lavados con etanol al 30% durante 20 minutos cada uno. A continuación se agregó la solución de pre-tratamiento durante un minuto, quedando el gel totalmente sumergido. Se descartó la solución anterior y se lavó el gel con agua desionizada dos veces durante 20 segundos, se adicionó la solución de nitrato de plata al 0.2 % dejándolo durante 20 minutos con agitación constante. Se descartó la solución y rápidamente se lavó el gel con suficiente agua desionizada con el objeto de descartar todos los residuos de AgNO_3 que queden impregnados en la bandeja. Este lavado duro 7 segundos y se repitió tres veces.

Una vez el gel ha quedado bien lavado se le adicionó un poco de agua desionizada y lentamente con una pipeta pasteur se colocó la solución reveladora hasta que el gel empezó a tomar coloración negra, entonces se descartó la solución reveladora, se lavó el gel nuevamente con agua desionizada y se continuó agregando solución reveladora hasta que empezaron a aparecer las bandas. Cuando aparecieron las bandas se aplicó la solución de parada durante 10 minutos para detener la reacción de la solución reveladora. Finalmente se lavó el gel con agua desionizada y se dejó hasta el momento de tomar la fotografía.

6.2.6 Prueba de actividad hemolítica

Para determinar la presencia de la enzima con actividad tipo PLA₂ se realizó por hemólisis indirecta de fosfolípidos de glóbulos rojos presentes en el agar sangre, para ello se preparo el agar en presencia de buffer fosfato salino (PBS) 1 mM pH 7.2 y se adicionó sangre de mamífero, cloruro de calcio y yema de huevo teniendo en cuenta las condiciones siguientes^[47,48].

6.2.6.1. Tratamiento sangre de mamífero

La sangre se centrifugo a 3000 r.p.m por un periodo de 10 min desechando el sobrenadante (plasma). Se le realizaron cuatro lavados con solución salina centrifugando a 3000 r.p.m por un periodo de un minuto y se conservó en refrigeración hasta su uso, la cantidad que se tomo para la preparación del agar fue 2 mL de eritrocitos por cada 150 mL de agar.

6.2.6.2. Obtención de fosfolípidos

Se obtuvieron de la yema de huevo de gallina, para este procedimiento se tomó toda la yema y se diluyó en solución salina con una relación de 3:1 (solución salina: yema de huevo) y se procedió a centrifugar a 3000 r.p.m por un periodo de 3 minutos y se tomo el sobrenadante para los pruebas, el cual es almacenado en

un tubo ependorf de 1.5 mL a -20°C hasta su uso. La cantidad empleada para la preparación del agar es similar a la cantidad de sangre empleada (2mL).

6.2.6.3. Preparación del agar

Se partió de 1.2 g de agarosa y se diluyó en 150 mL de PBS, calentando la solución hasta que se disolvió totalmente y se tornó incolora, y se llevó a una temperatura entre 49-50 °C, este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar limpiada previamente con alcohol, que se sometió a esterilización con luz ultravioleta. Cuando alcanzó la temperatura (50 °C) se adicionó en orden 2 mL de cloruro de calcio seguido de 2mL de sangre agitando constantemente y por último 2 mL de yema de huevo, y finalmente vertiéndose sobre la caja de petri.

6.2.6.4. Tratamiento caja de petri

Para la adición del agar se empleo caja de Petri, previamente tratada con hipoclorito, alcohol, y se esterilizó por autoclave. Previa a su utilización se dejó atemperar a 37°C en incubadora, facilitando el proceso de adición del agar.

6.2.6.5. Adición de muestra (fracciones de veneno)

Una vez atemperada la caja de petri, se adicionó la solución de agar y se dejó solidificar. Luego se puso la placa de vidrio con el agar de consistencia semitransparente, sobre una cuadrícula (en papel) y se hicieron pequeños orificios en el gel, con distribución equidistante uno del otro, para sembrar en ellos un volumen de 20 µL de cada una de las fracciones obtenidas de cada veneno. Estas siembras se dejaron estabilizar por un periodo de 15 min y luego fueron incubadas por un periodo de 24 horas a 37°C que sirvieron para verificar en cada una de las fracciones la aparición de halos de hemólisis por enzimas tipo PLA₂. (En este tipo de prueba, el tamaño de cada halo da una medida proporcional a la concentración de la PLA₂ en cada fracción).

6.2.7. Técnica de bicapas para tamizaje e identificación de fracciones PLA₂

6.2.7.1. Montaje

Para verificar la acción fosfolipídica de la PLA₂ aislada por HPLC del veneno de *B. asper* y *M. mipartitus* se empleó la técnica de Bicapas lipídicas Planas como ya se ha hecho en otros trabajos ^[40]. Este montaje incluye una cámara de teflón doble que se monta dentro de una campana de Faraday y sobre una base libre de vibración.

Los dos compartimentos de la cámara de teflón se llenaron cada uno con 0.8 mL de solución salina. Estos compartimientos están separados por una pared que contiene una perforación en el centro, con un diámetro de 0.3mm, en donde se arma la bicapa.

En cada compartimiento se sumergen electrodos de Ag/AgCl, es necesario tener en cuenta que el Terminal negativo de la fuente es nombrado como lado trans el cual va conectado a tierra y el lado contrario es denominado cis el electrodo de medición con los cuales se aplican de forma simultanea las diferencias de potencial para medir la permeabilidad de la membrana. Estos electrodos forman un circuito con un sistema de amplificación operacional, que comprende un dispositivo de preamplificación HEADSTAGE (CV-4/100) unido a un amplificador AXOPATCH 1D (Axon Instruments) (figura 9).

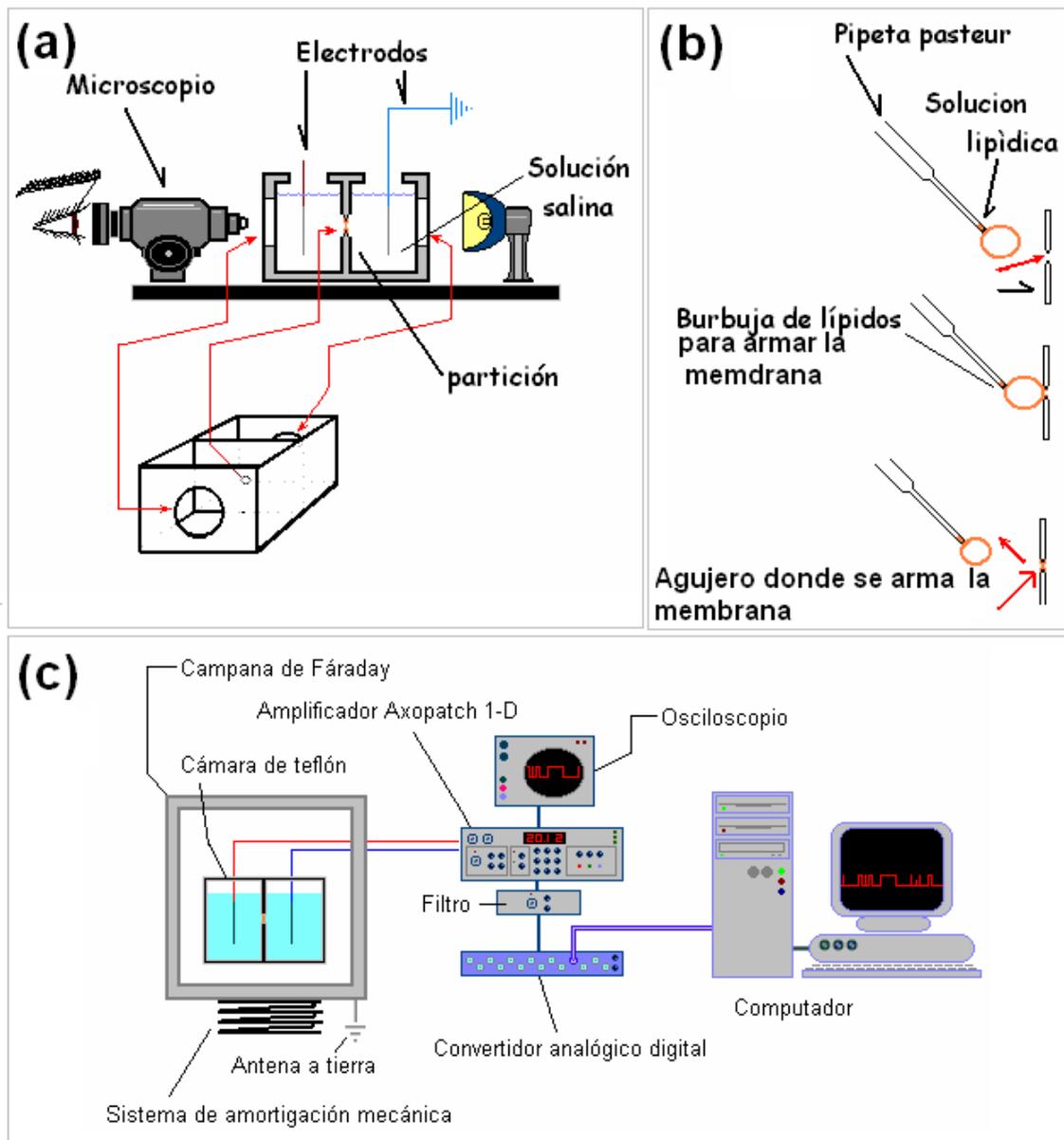


Figura 9. Montaje para el estudio de bicapas de fosfolípidos. **(a)** Montaje de la cámara y el microscopio óptico que enfoca el agujero a través de las paredes traslucidas (señaladas por flechas en rojo). **(b)** Procedimiento para armar la membrana de fosfolípidos en el agujero de la partición. **(c)** Diagrama de las conexiones de los equipos utilizados.

La señal de salida del axopatch, es decir las corrientes medidas y amplificadas, son filtradas a 50 Hz, por un filtro (Frequency Devices 900). Por último la señal analógica filtrada se proyecta en un osciloscopio (LEADER LBO5825) y simultáneamente es digitalizada (DigiData 1200 SERIES INTERFACE) para luego ser conducida hasta un computador en el que la señal de la corriente se pueda graficar en tiempo real para ser observada y almacenada, empleando el software FETCHEX de Pclamp 6.0. En este programa quedan consignados los parámetros del filtro, la amplificación, el tiempo de registro y lo correspondiente a la escala que se está utilizando para visualizar la corriente en el tiempo. Todos los componentes del montaje se conectan mediante salidas de cada aparato hacia una tierra común.

Al iniciar cada experimento se calibró el sistema empleando una célula electrónica (Patch 1U Model Cell. Axon Instruments) que simula las condiciones de capacitancia y resistencia de una membrana biológica. Con esta calibración se controla el estado del circuito del montaje, se detectan desplazamientos de la línea de base, se evalúa la relación señal-ruido, y finalmente se realizarán las correcciones necesarias para disminuir el ruido eléctrico o el mecánico.

En cada experimento, cada bicapa armada fue expuesta a una diferencia de potencial de -70 mV, (se eligió este voltaje para simular de forma aproximada, el potencial de reposo de una célula excitable).

6.2.7.2. Preparación de las soluciones

La composición de la solución salina que se agregó a lado y lado de la bicapa fue: NaCl 200 mM; EGTA 0.05 mM para quelar el calcio contaminante y evitar efecto alguno por la interacción de este sobre las toxinas activadas por calcio (e.j. PLA₂), y por último MgCl₂ 0.1 mM. Se adiciona la solución, y se ajustó el pH hasta 7.4

con HCl, valor que se mantuvo estable mediante la adición previa de Hepes (Sigma) 10mM como agente tampón.

La solución lipídica que se empleó para armar las bicapas estaba compuesta por una proporción de fosfolípidos 3:2:1 (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina), estos fosfolípidos se encuentran disueltos en cloroformo por lo que se desecan con nitrógeno gaseoso y se resuspenden en decano al 99.9% a una concentración final de fosfolípidos de 50 mg/ml en decano. La solución de veneno de las dos especies de serpientes que se usó en los experimentos tenía una concentración de 1µg de veneno seco disueltos en 1mL de solución salina y se empleó una concentración igual para la enzima con actividad tipo PLA₂ aislada de los dos venenos.

6.2.7.3 Adquisición y análisis de datos

Al armar la membrana se esperaba hasta que esta se estabilizara mostrando un valor de corriente constante y muy cercano a cero, debido a que las membranas de lípidos en estas condiciones no permiten el paso apreciable de iones a través de estas. Este fenómeno se puede observar durante minutos u horas hasta que se rompe la membrana. Una vez se ha verificado la estabilidad de la membrana en el tiempo, se decide adicionar cada una de las sustancias a experimentar (veneno y PLA₂) y grabar los registros de las corrientes resultantes con un voltaje de 20mV. Desde el inicio de cada experimento se almacena toda la información de corriente eléctrica en función del tiempo, empleando el programa Fetchex (de Pclamp 6.0), hasta el rompimiento de la membrana. Al romperse la membrana en cada experimento se inicia el proceso con lavado de la cámara y nuevamente se arma una nueva membrana siguiendo los pasos que se detallaron anteriormente.

6.2.7.4 Estadística

Se tomó como unidad de muestreo, el tiempo de duración (tiempo en milisegundos) de cada membrana desde que fue armada y sometida al tratamiento, hasta su ruptura. Se tomaron 10 tiempos de duración para cada uno de los 10 tratamientos. Dos tratamientos fueron hechos con membranas blanco (membranas control), las cuales no eran expuestas a solución con venenos o fracciones de veneno alguno. Uno de estos experimentos consistió en exponer las membranas a la solución salina con calcio disuelto a una concentración 0.2 mM. El otro consistió en exponer las membranas a una solución salina sin calcio y empleando EGTA como agente quelante del calcio que pudiera estar como contaminante en el agua MilliQ. En los otros ocho experimentos, las membranas eran expuestas a cada veneno o fracción del veneno de cada especie y a su vez eran sometidas a la presencia y ausencia de calcio 0.2 mM.

A los datos de duración de cada membrana (tiempo en segundos), se les calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada tratamiento (incluye los dos controles). Se les hizo una prueba de normalidad (Shapiro - Wilk) y posteriormente se hizo un análisis de varianza ($p < 0.05$) para verificar si existían diferencias entre tratamientos. Finalmente se hizo una prueba de Tukey para determinar que tratamientos fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). Para hacer estas pruebas, se empleo el programa OriginPro 7.03 (OriginLab Corp)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION PROTEICA

La concentración de proteína del veneno entero de las dos especies de serpientes estudiadas, se realizó de acuerdo a la metodología descrita anteriormente, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Los resultados (Tabla 2) se muestran a continuación:

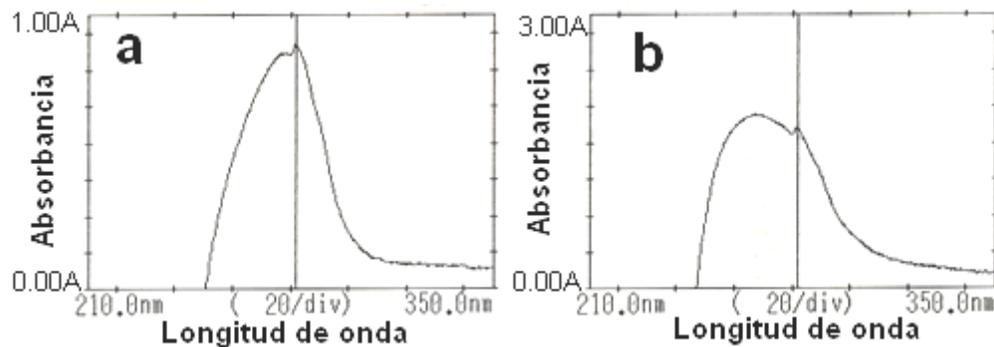
Tabla 2. Datos espectrofotométricos del veneno crudo

Serpiente	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280nm	Cantidad de proteína (mg)	Cantidad de proteína total (mg)
<i>Micrurus mipartitus</i>	0.634	0.786	0.737	2.211
<i>Bothrops asper</i>	2.181	2.241	1.816	5.448

Para el veneno de la serpiente *M. mipartitus* se obtuvo una concentración de proteína de 0.737 mg, como los volúmenes empleados son tan pequeños se realizó una dilución 1:4 veneno : PBS respectivamente, obteniéndose para los 25mg de partida de veneno liofilizado una concentración total de proteína de 2.211 mg. Igualmente se realizó para el veneno de la serpiente *B. asper* con una concentración inicial de 1.816 mg, con una concentración total de 5.448 mg de proteína para los 50 mg de veneno liofilizado de los cuales se partió. Los resultados difieren uno del otro ya que las proporciones de veneno empleado no fueron las mismas ya que no se contaba con mayor disponibilidad del veneno de *M. mipartitus*

Estos resultados son importantes ya que nos permitieron comprobar la concentración del veneno, ya que de estar degradado, no se hubiera logrado observar la absorbancia a las longitudes de onda escogidas, especialmente la

banda de absorción a 280 nm la cual es característica para absorbancia de proteínas con presencia de aminoácidos como Prolina Tirosina y Fenilalanina. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura para este tipo de determinaciones [46]. Los espectros obtenidos para cada veneno se muestran en la Gráfica N° 1.



Gráfica 1. Actividad del veneno. Barrido realizado en una longitud de onda entre 200 a 300 nm (eje X). En el eje Y se presentan unidades de absorbancia. Se observa la banda de absorción característica para este tipo de procedimientos, para las dos especies *M. mipartitus.* y *B. asper*

7.2. CROMATOGRAFÍA POR EXCLUSIÓN MOLECULAR

FRACCIONAMIENTO POR COLUMNA SEPHADEX G-75

El proceso de purificación de la enzima con actividad tipo PLA₂ del veneno entero de *B. asper* y *M. mipartitus*, se inicio con una cromatografía por exclusión molecular en Sephadex G-75 obteniéndose 30 fracciones de 1.5 mL cada una. La cantidad de proteína se determino por la medida de absorbancia a 260 y 280 nm. Los datos para cada fracción se muestran en la tabla 3 y 4

Tabla 3. Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por la separación con Sephadex G-75 *B. asper*

Fracción	Absorbancia 280 nm	Absorbancia 260 nm	Proteína total mg	Actividad total mm	Actividad específica mm/mg
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0,355	0,217	1,156	9	7,786
5	1,461	0,871	4,808	16	3,328
6	0,811	0,47	2,700	23	8,520
7	0,269	0,157	0,893	27	30,239
8	0,281	0,18	0,896	25	27,894
9	0,317	0,258	0,886	20	22,578
10	0,468	0,435	1,184	23	19,419
11	0,5	0,423	1,361	21	15,435
12	0,415	0,293	1,262	17	13,474
13	0,37	0,237	1,180	16	13,558
14	0,211	0,131	0,682	15	21,979
15	0,087	0,056	0,277	13	46,953
16	0,033	0,019	0,110	13	118,042
17	0,014	0,006	0,051	7	136,134
18	0,011	0,006	0,037	6	160,128
19	0,01	0,006	0,033	6	182,815
20	0,005	0,001	0,021	0	0,000
21	0,004	0,001	0,016	0	0,000
22	0,003	0	0,014	0	0,000
23	0,003	0	0,014	0	0,000
24	0	0	0,000	0	0,000
25	0,071	0,087	0,132	0	0,000
26	0,003	0	0,014	0	0,000
27	0,117	0,145	0,213	0	0,000
28	0,003	0,001	0,012	0	0,000
29	0,002	0	0,009	0	0,000
30	0,006	0,004	0,019	0	0,000

Tabla 4. Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por la separación con Sephadex G-75 *M. mipartitus*

Fracción	Absorbancia 280 nm	Absorbancia 260 nm	Proteína total mg	Actividad total mm	Actividad específica mm/mg
1	0,021	0,013	0,068	0	0
2	0,007	0	0,033	0	0
3	0,009	0	0,042	10	238,949
4	0,035	0,013	0,133	15	112,689
5	0,214	0,123	0,715	19	26,586
6	0,302	0,177	1,001	25	24,982
7	0,425	0,282	1,333	30	22,501
8	0,404	0,257	1,293	35	27,076
9	0,344	0,218	1,103	30	27,209
10	0,318	0,229	0,957	25	26,135
11	0,196	0,155	0,558	23	41,219
12	0,15	0,141	0,376	20	53,189
13	0,093	0,092	0,223	20	89,811
14	0,044	0,033	0,129	20	154,607
15	0,03	0,011	0,114	18	157,315
16	0,02	0,006	0,079	15	189,107
17	0,021	0,006	0,084	15	178,635
18	0,02	0,006	0,079	14	176,500
19	0,019	0,006	0,075	12	160,707
20	0,016	0,006	0,061	10	164,690
21	0,013	0,006	0,047	10	213,812
22	0,014	0,006	0,051	10	194,477
23	0,011	0,004	0,042	10	237,925
24	0,014	0,006	0,051	10	194,477
25	0,011	0,004	0,042	10	237,925
26	0,013	0,007	0,044	9	20,229
27	0,011	0,004	0,042	9	21,413
28	0,007	0	0,033	9	27,650
29	0,01	0,003	0,040	8	20,171
30	0,008	0	0,037	8	21,505

Cuantificación de las proteínas presentes en las fracciones del veneno entero de *B. asper* obtenidas por Sephadex G-75

Con base en los resultados de la tabla 3 se observó que las fracciones 1, 2 y 3 no se detectaron proteínas. En las fracciones 5 y 6 se presentó la mayor concentración de proteína (cada fracción presentó valores de 4.808 y 2.700 respectivamente). En la fracción número 4 y en las fracciones 7,8,9,10,11,12,13 y 14, se detectaron valores de absorbancia que corresponden al rango comprendido entre 0.682 y 1.361 mg de proteína. En las fracciones restantes (desde la fracción 15 hasta la fracción 30) la concentración fue inferior a 0.2 mg por presentar una cantidad tan baja de proteína no son tenidas en cuenta para el proceso de separación por Sephadex G-25.

Cuantificación de proteína presente en las fracciones del veneno entero de *M. mipartitus* obtenidas por Sephadex G-75

De acuerdo a los resultados de la tabla 4, se observó que las fracciones 1,2,3 y 4 el contenido de proteína es bajo con valores entre 0.068-0.133 mg, en las fracciones 5,6,7,8,9,10 y 11 fueron donde se presentaron la mayor cantidad de proteína con un promedio de 0.558 mg a 1.333 mg, las fracciones 12,13,14 y 15 presentaron valores variables en el rango de 0.376 mg a 0.114 mg de proteína. Desde la fracción 16 hasta la fracción 30 los niveles de concentración de proteína fueron relativamente bajos (con valores inferiores a 0.084 mg).

Identificación de las fracciones con actividad tipo PLA₂

Para determinar la presencia de enzimas con actividad tipo PLA₂ en cada una de las fracciones obtenidas por la separación por Sephadex G-75 se realizó la prueba de halo por hemólisis de eritrocitos en agar sangre. Las fracciones de los venenos de ambas especies formaron halos de lisis como se puede observar en la figura 10 (a) *B. asper* y (b) *M. mipartitus*.

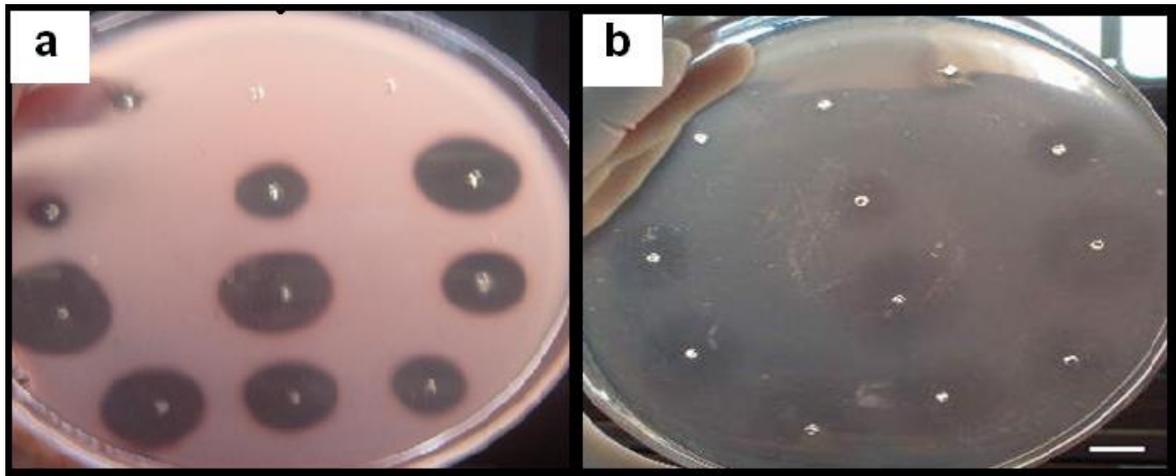


Figura 10. Caja de petri con agar-sangre. Nótese los puntos centrales de siembra y el halo semitransparente de la hemólisis inducida por fracciones que contienen la enzima con actividad tipo PLA₂ (obtenidas por la separación con Sephadex G-75 a partir de veneno entero) **(a)** *Bothrops asper* y **(b)** *Micrurus mipartitus*. El color rosado que circunda los halos se debe a los glóbulos rojos que permanecen intactos

Determinación de la actividad tipo PLA₂ para cada una de las fracciones del veneno de *B. asper* obtenidas por Sephadex G75

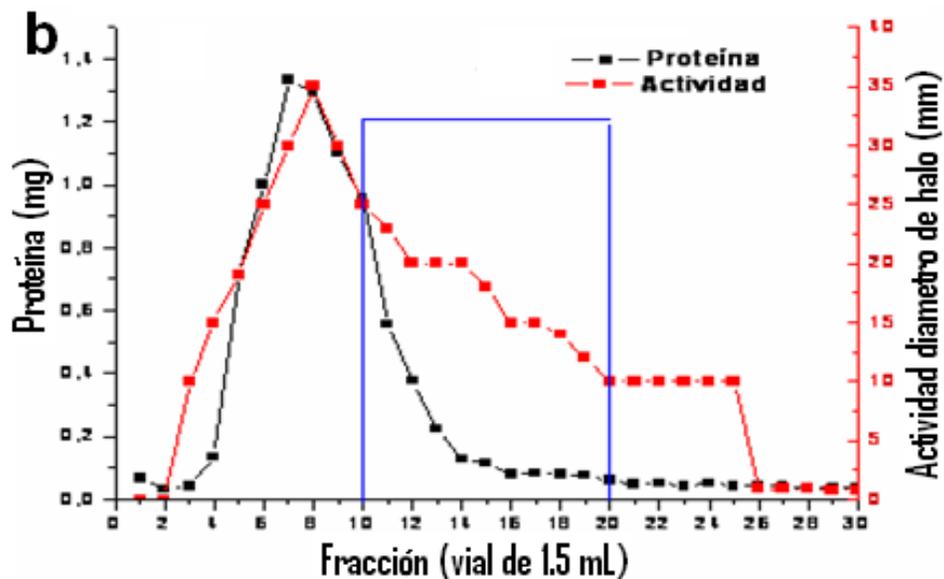
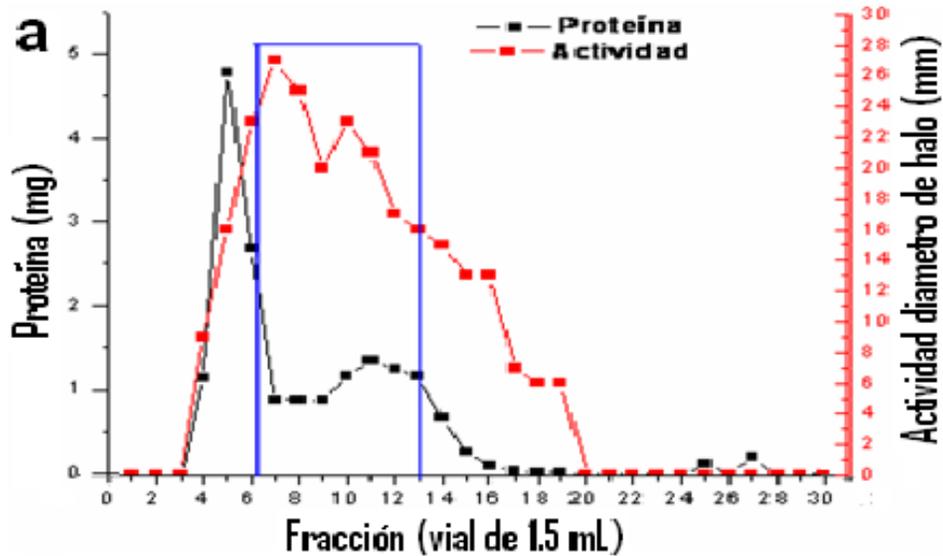
Los valores de la actividad (diámetro de halo), para cada fracción obtenida a partir del veneno de la serpiente *B. asper* se muestran en la tabla 2. De estos resultados se puede decir que las fracciones 1,2 y 3 no presentaron formación de halo, la fracción 4 presentó un halo de 9 mm de diámetro. Las fracción 5 y 6 presentaron halos cuyo diámetro fue de 16 y 23 mm (respectivamente), estos diámetros suponen poca actividad específica teniendo en cuenta la cantidad de proteína estimada. Con estos resultados se puede decir que un alto porcentaje de proteína presente en las fracciones 4 y 5 carecía de actividad hemolítica. En las fracciones 7,8,9,10,11,12,13,14,15 y 16 presentaron un tamaño de halo entre un rango de 13 mm a 27 mm evidenciando un elevada actividad hemolítica si se

compara con la producida por el veneno entero que presento un de halo de 30 mm, indicando la presencia significativa de la enzima con actividad tipo PLA₂. Las fracción 17 presento un halo de 7 mm mientras que las fracciones 18 y 19, ambas presentaron halo de 6 mm. Finalmente las fracciones de la 20 hasta la 30 no presentaron halo (lisis de eritrocitos) a pesar de la presencia de proteínas. Por lo cual no se tomaron en cuenta para los siguientes pasos de purificación.

Determinación de la actividad tipo PLA₂ en cada una de las fracciones del veneno de *M. mipartitus* obtenidas por Sephadex G-75

Las fracciones obtenidas a partir de veneno entero de *M. mipartitus*, empleando columna con Sephadex G-75 se les realizó el mismo proceso de identificación donde los resultados se muestran tabla 4. De los datos obtenidos se puede decir que las fracciones 1 y 2 no presentaron actividad hemolítica, las fracciones 3 y 4 tuvieron un halo de 10 y 15 mm respectivamente. En las fracciones de 5,6,7,8,9,10,11,12,13 y 14 fueron las que presentaron mayor actividad, con halos que oscilaron entre 19 mm y 35 mm similar al del veneno entero que tuvo un tamaño de 40 mm. Las fracciones 15,16,17,18 y 19 presentaron un actividad menor con halos en un rango de 12 a 18 mm pero si se tiene en cuenta la concentración proteica de estas fracciones que es relativamente baja su actividad especifica es considerable. Por ultimo las fracciones que van de la 20 a la 30 presentaron un tamaño de halo entre un rango de 10 mm a 8 mm siendo una actividad moderada si se tiene en cuenta al concentración de proteína de estas fracciones que es relativamente baja por la que no se tienen en cuenta en los siguientes procesos de separación.

Se comparo la cantidad de proteína con la actividad para cada uno de los venenos por medio de las graficas 2(a) y 2(b) para tener un mejor criterio de selección de las fracciones que se emplearían el la separación por Sephadex G-25.



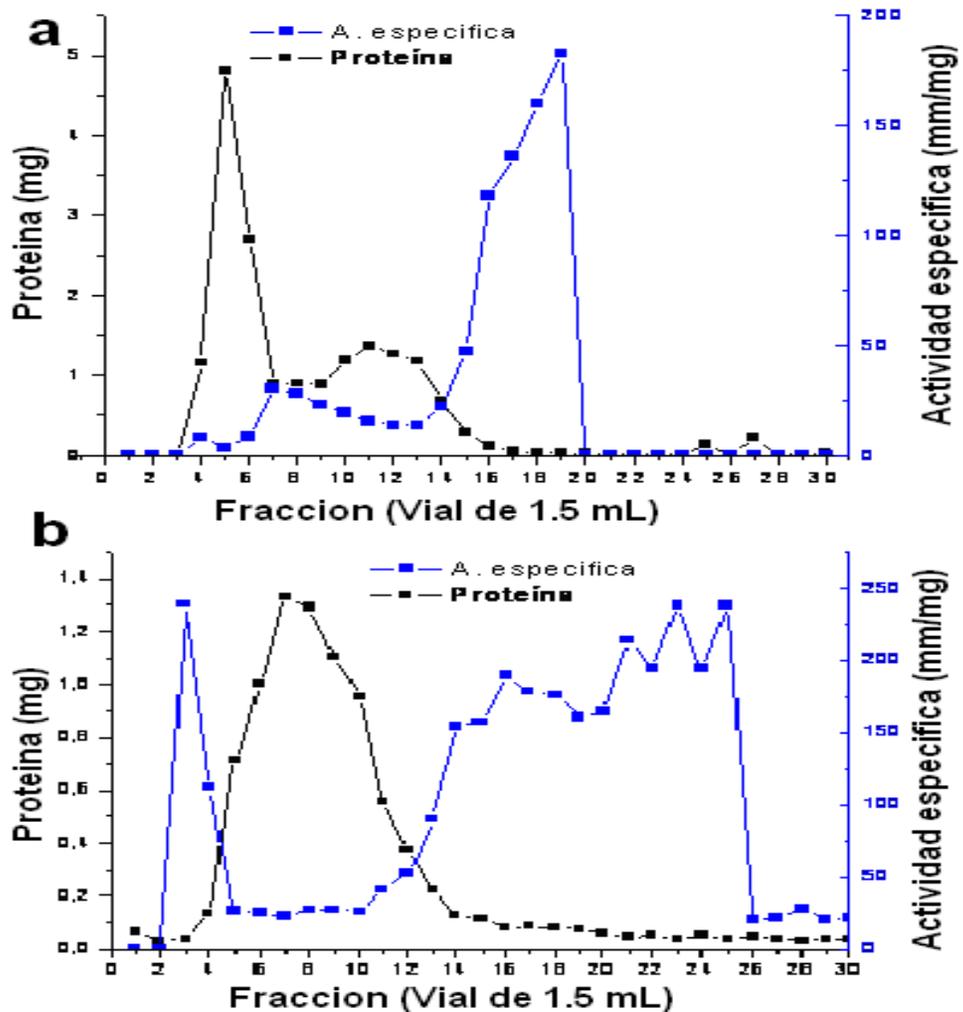
GRAFICA 2 Comparación de la actividad frente a la cantidad de proteína de las fracciones obtenidas por la separación a través de Shepadex G-75. En el eje Y (color negro) va la cantidad de proteína en cada fracción y en el eje Y (color rojo) se observa la actividad para cada fracción expresada por el tamaño del halo producido en la prueba de hemólisis para las dos especies **(a)** Veneno de *B. asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus*

Según la grafica 2(a), las fracciones 7,8,9,10,11,12 y la 13 se mezclaron y concentraron siendo escogidas como candidatas a fraccionar empleando una columna con Sephadex G-25, por presentar la mayor actividad con la menor cantidad de proteína. Este proceso de separación se hizo en los repotes de Vidal [45] Fracciones como la 4,5,6 y 7 por su alto contenido de proteína no se eligieron para los siguientes pasos de purificación pues aumentaría la interferencia por otras proteínas que no presentan actividad. Igualmente se descartaron las fracciones de la 14 a la 20 ya que la actividad fue mucho menor comparada con las fracciones seleccionadas.

Las fracciones del veneno de *M. mipartitus* se escogieron de acuerdo a la gráfica 2(b) las cuales fueron de la 10 a la 20 por presentar mayor grado de actividad y una cantidad proteica relativamente baja, las cuales se mezclaron y liofilizaron. No se eligieron las fracciones de la 5-10 por tener la mayor concentración de proteína lo cual incrementaría la interferencia en los siguientes procesos de separación.

Con base en los resultados obtenidos de cantidad de proteína y actividad se determino la actividad especifica que es el resultado de dividir la actividad con la cantidad de proteína los resultados se muestran en la tabla 3 y 4 se elaboró un grafica con estos datos y se compararon con la cantidad de proteína para los dos venenos estudiados ver la grafica 3 La cual contribuyó a reafirmar el criterio de selección de las fracciones que seguirán la segunda etapa de separación, en la grafica 3(a) se observa que las fracciones con mayor actividad especifica fueron de la 15 a la 19 sin embargo no se escogieron por tener una cantidad de proteína muy baja lo que ocasionaría que los porcentajes de recuperación de enzimas con actividad tipo PLA₂ fueran muy bajos en las siguientes etapas de purificación.

En la grafica 3(b) se observo que la mayor actividad especifica la presentaron las fracciones de la 11 a la 25 seleccionando las fracciones de la 11 a al 20 por tener una cantidad de proteína razonable.



GRAFICA 3. Comparación de actividad específica frente a la cantidad de proteína. Datos obtenidos por el proceso de separación a través de Shepadex G-75. En el eje Y (color azul) se presenta la actividad especifica y en el eje Y (color negro) se observa la cantidad de proteína para cada fracción, en el eje X el número de fracciones obtenidas en el proceso de separación **(a)** Veneno de *B. asper* y **(b)** Veneno *M. mipartitus*

FRACCIONAMIENTO DE LOS VENENOS POR COLUMNA SEPHADEX G-25

El liofilizado de las fracciones 7 a 13 de *B. asper* y el liofilizado de las fracciones 10 a 20 de *M. mipartitus* seleccionadas del proceso de separación por Sephadex G-75 se sometieron a una segunda etapa de purificación por cromatografía de Sephadex G-25, se recolectaron 30 fracciones de 1.5 mL a las cuales se les determinó la cantidad de proteína por espectrofotometría, los resultados se muestran en la tabla 5 y 6.

Tabla 5. Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por el proceso de separación con Sephadex G-25 *B. asper*

Fracción	Absorbancia 280 nm	Absorbancia 260 nm	Proteína total mg	Actividad total mm	Actividad específica mm/mg
1	0,05	0,04	0,141	14	99,080
2	0,06	0,06	0,142	13	91,421
3	0,03	0,03	0,071	12	168,776
4	0,02	0,02	0,047	11	232,068
5	0,02	0,03	0,025	6	243,902
6	0,134	0,09	0,418	24	57,430
7	0,174	0,122	0,531	26	48,970
8	0,049	0,036	0,146	20	137,202
9	0,084	0,055	0,265	12	45,249
10	0,083	0,056	0,258	8	30,975
11	0,03	0,025	0,083	14	169,697
12	0,237	0,253	0,525	15	28,560
13	0,28	0,279	0,666	5	7,509
14	0,304	0,218	0,917	5	5,455
15	0,152	0,111	0,454	0	0
16	0,06	0,054	0,156	0	0
17	0,622	0,613	1,495	0	0
18	0,019	0,022	0,038	0	0
19	0,013	0,014	0,029	0	0
20	0,011	0,013	0,022	0	0
21	0,016	0,018	0,033	0	0
22	0,008	0,01	0,014	0	0
23	0,006	0,007	0,012	0	0
24	0,008	0,009	0,017	0	0
25	0,008	0,01	0,014	0	0
26	0,022	0,025	0,045	0	0
27	0,09	0,09	0,213	0	0
28	0,013	0,013	0,031	0	0
29	0,009	0,007	0,026	0	0
30	0,009	0,008	0,024	0	0

Tabla 6. Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por la separación con G-25 *M. mipartitus*

Fracción	Absorbancia 280 nm	Absorbancia 260 nm	Proteína total mg	Actividad total mm	Actividad específica mm/mg
1	0,058	0,058	0,137	0	0
2	0,039	0,045	0,079	0	0
3	0,051	0,053	0,116	15	128,966
4	0,072	0,077	0,159	19	119,317
5	0,085	0,121	0,119	15	125,660
6	0,075	0,091	0,141	15	106,180
7	0,075	0,068	0,194	23	118,734
8	0,127	0,171	0,201	26	129,566
9	0,099	0,173	0,066	24	364,133
10	0,064	0,098	0,074	25	337,109
11	0,057	0,069	0,108	21	194,932
12	0,049	0,054	0,105	18	171,871
13	0,048	0,052	0,105	18	172,018
14	0,057	0,065	0,117	18	154,044
15	0,055	0,059	0,121	15	123,732
16	0,046	0,048	0,104	15	143,596
17	0,043	0,046	0,095	12	126,223
18	0,041	0,045	0,088	10	113,572
19	0,038	0,041	0,083	10	120,163
20	0,038	0,042	0,081	10	123,548
21	0,036	0,038	0,081	10	123,824
22	0,038	0,041	0,083	10	120,163
23	0,033	0,035	0,074	10	135,777
24	0,038	0,039	0,088	8	91,137
25	0,03	0,032	0,067	6	90,171
26	0,032	0,033	0,074	6	81,566
27	0,031	0,032	0,071	5	70,235
28	0,028	0,029	0,064	5	78,027
29	0,027	0,028	0,062	5	81,024
30	0,026	0,027	0,059	5	84,260

Cuantificación de proteína en cada una de las fracciones del veneno entero de *B. asper* obtenidas por Sephadex G25

Con base en los resultados obtenidos de la tabla 5. Se observó que las fracciones 1 y 2 presentaron una cantidad de proteína de 0.141 mg y 0.142 mg respectivamente. En las fracciones 3,4 y 5 dieron valores de proteína entre los rangos de 0.025 a 0.071 mg cantidades relativamente bajas en comparación con las primeras fracciones. En las fracciones 6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 y 16 la cantidad de proteína aumento considerablemente con valores que oscilan entre los rangos de 0.146 mg a 0.917 mg. En la fracción 17 se encontró la mayor cantidad de proteína 1.495 mg y finalmente las fracciones 18 a la 30 donde los resultados para la cantidad de proteína están en el rango de 0.012 mg a 0.045 mg.

Cuantificación de proteína en cada una de las fracciones del veneno entero de *M. mipartitus* obtenidas por Sephadex G-25

De acuerdo a los resultados de la tabla 6, las fracciones 1,2,3,4,5 y 6 presentaron valores altos de proteína los cuales oscilaron en un rango de 0.079 mg a 0.159 mg. En las fracciones 7 y 8 fue donde se concentro la mayor cantidad de proteína 0.194 mg y 0.201 mg respectivamente. Las fracciones 9 y 10 presentaron valores bajos de proteína 0.066 mg y 0.074 mg respectivamente. Las fracciones 11,12,13,14,15,16 y 17 presentaron resultados similares a los obtenidos en las primeras fracciones con valores de 0.095 mg a 0.121 mg. Finalmente las fracciones que van de 18 a la 30 con valores de proteína en un rango de 0.059 mg a 0.088 mg valores no tan bajos si se compara con las otras fracciones pero su actividad es baja por la que no se tienen en cuenta en la siguiente etapa de purificación.

Identificación de las fracciones con actividad tipo PLA₂

A cada fracción de los dos venenos estudiados se les realizó la prueba de lisis de eritrocitos (formación de halo) para identificar aquellas fracciones donde se

presento la enzima con actividad tipo PLA₂ como se observa en la figura 11, se realizo la medición del diámetro de halo. Los resaltados se presentan en la tabla 5 y 6

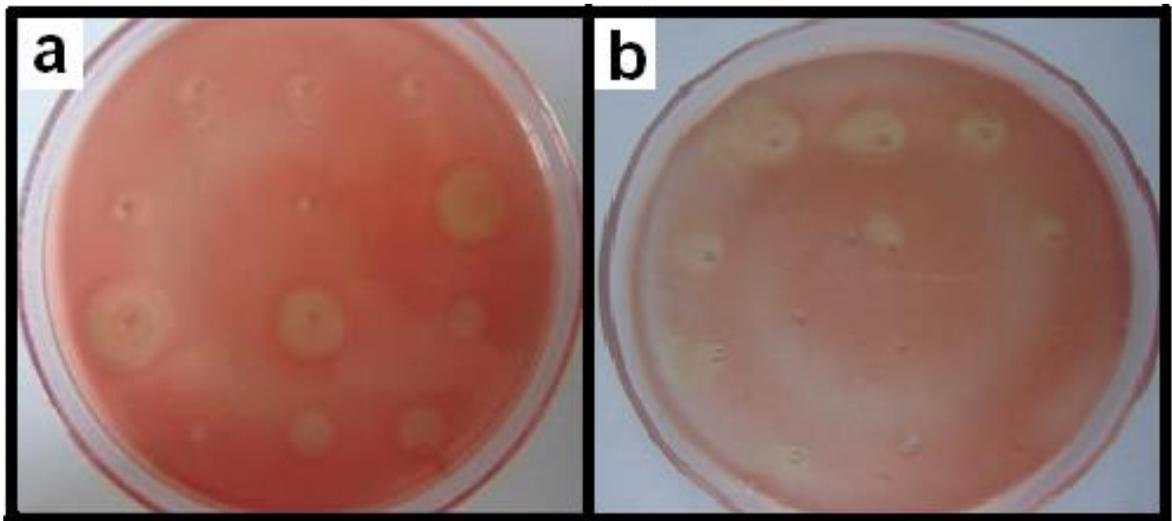


Figura 11. Identificación de fracciones con actividad tipo PLA₂ por hemólisis en agar sangre la cual se determino por su decoloración (formación de un halo semitransparente) para las fracciones obtenidas por el proceso de separación por la columna de Sephadex G-25 **(a)** Veneno de *B.asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus*

Determinación de la actividad tipo PLA₂ para las fracciones del veneno de *B. asper* obtenidas por Sephadex G-25

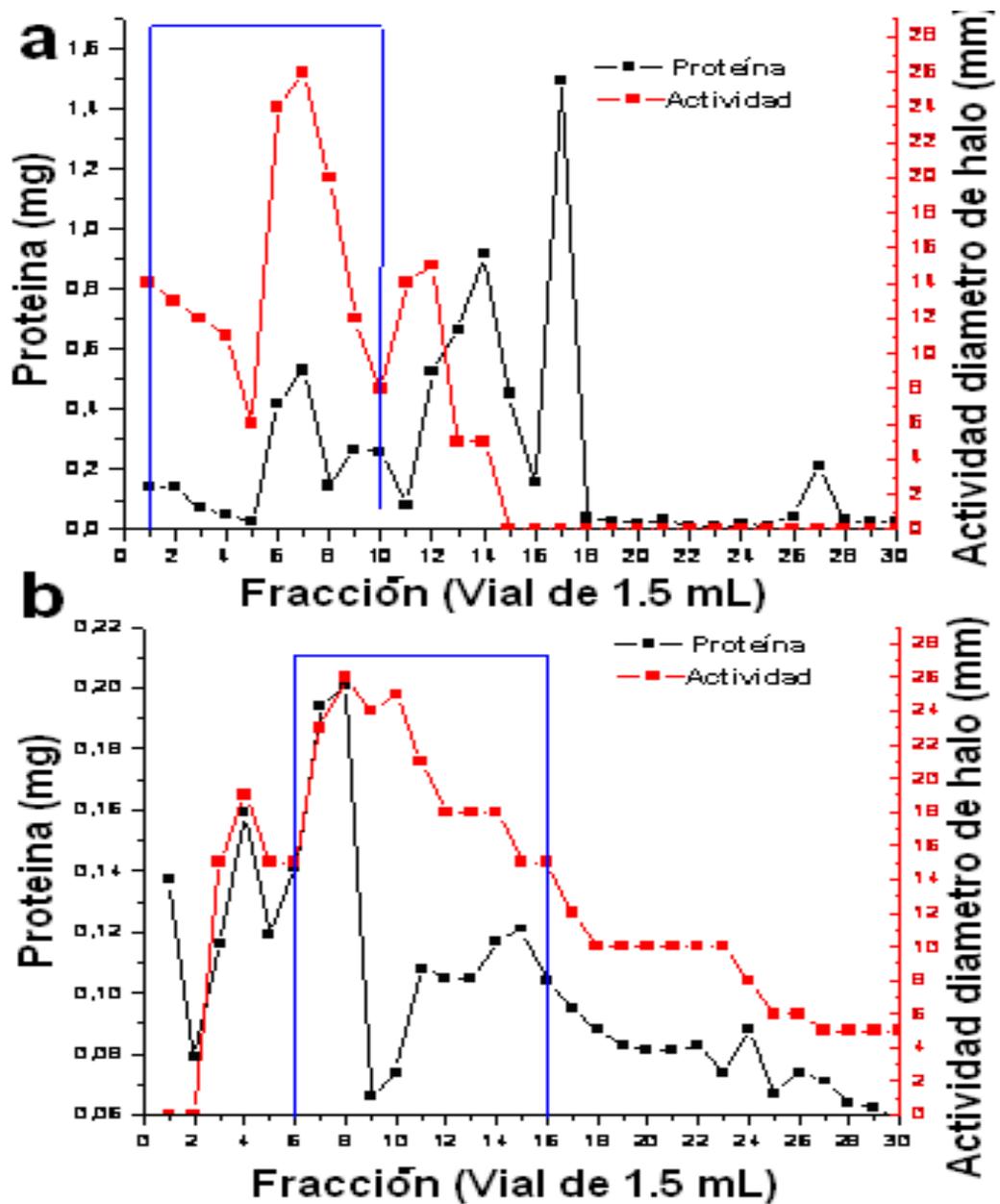
Con base en los datos obtenidos de la tabla 5, se observó que las fracciones 1,2,3 y 4 presentaron actividad con un halo de 11 mm a 14 mm los cuales son grandes si se tiene en cuenta la cantidad de proteína presente, sugiriendo este resultados la existencia de un gran porcentaje de la enzima con actividad tipo PLA₂. En la fracción 5 presentó actividad con un halo de 6 mm. Las fracciones 6,7 y 8 fueron las que presentaron la mayor actividad con diámetros de halo de 20 mm a 26 mm. En la fracciones 9 y 10 la actividad decayó con un halo de 8 mm y 12 mm respectivamente. Las fracciones 11 y 12 el tamaño del halo fue de 14 mm y 15

mm. Las fracciones 13 y 14 con diámetros de halo de 5 mm. Finalmente las fracciones que van de la 15 hasta la 30 no presentaron actividad a pesar de la presencia de proteína, estas fracciones no se tuvieron en cuenta para las etapas siguientes de purificación.

Determinación de la actividad tipo PLA₂ para cada una de las fracciones del veneno de *M. mipartitus*. por Sephadex G25

Según la grafica 4(b) (Anexo 4) las fracciones 1 y 2 no se observó actividad. En las fracciones 3,4,5 y 6 presentaron actividad con halos entre los rangos de 15 mm a 19 mm. Las fracciones 7,8,9,10 y 11 fue donde se presentó la mayor actividad con halos, y estos valores oscilaron entre 21 mm a 26 mm. Las fracciones 12,13,14,15 y 16 con una actividad de 15 mm a 18 mm el diámetro del halo fue grande si se considera la cantidad de proteína existente. Finalmente las fracciones de la 19 hasta la 30 tuvieron un diámetro de halo entre 5 mm y 12 mm estas fracciones se liofilizaron para su conservación y no se tuvieron en cuenta en el resto del trabajo.

Con base a los resultados obtenidos de cantidad de proteína y de actividad se realizó la grafica 4 con el propósito de comparar y seleccionar las fracciones candidatas para la siguiente etapa de purificación de los dos venenos empleados.



Grafica 4. Comparación de la cantidad de proteína frente a la actividad de las fracciones obtenidas por la columna con Sephadex G-25 **(a)** Veneno de *B. asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus*. Las fracciones que se encuentran resaltadas por la cuadrícula azul se emplearon para la separación por DEAE-celulosa

Con base en la grafica 4(a), se eligieron las fracciones 1 a la 9 para el caso de *B. asper* y para *M. mipartitus* grafica 4(b) se tomaron las fracciones de la 6 a la 16. Se escogieron estas fracciones para la siguiente etapa de purificación por intercambio iónico ya que presentaron la mayor actividad a demás su contenido de proteína es moderado permitiendo obtener mayores porcentajes de recuperación de PLA₂.

De acuerdo al grafica 4(a) fracciones como la 10 a la 17 no se tuvieron en cuenta por tener alta cantidad de proteína y una bajo actividad, igualmente no se seleccionaron las fracciones de la 18 hasta la 30 por no presentaron actividad

Con base en la grafica 4(d) las fracciones de la 1 a la 5 no se tuvieron en cuenta por tener alta cantidad de proteína y una bajo actividad, por la misma razón no se seleccionaron las fracciones de la 17 hasta la 30.

Con los datos obtenidos de cantidad de proteína y actividad se determinó la actividad especifica para cada una de las fracciones obtenidas en este proceso de separación; los resultados se muestran en las tabla 5 y 6 con los cuales se realizó la grafica 5 donde se comparó la actividad específica con la cantidad de proteína para cada fraccionamiento de cada uno de los dos venenos analizados. Verificando que las fracciones que fueron elegidas presentan una elevada actividad específica la cual es un parámetro para determinar el grado de purificación de las fracciones ya que en cuanto mayor sea la actividad específica menor será la cantidad de pretina por lo tanto un alto porcentaje del contenido total de proteína será de la enzima con actividad tipo PLA₂.

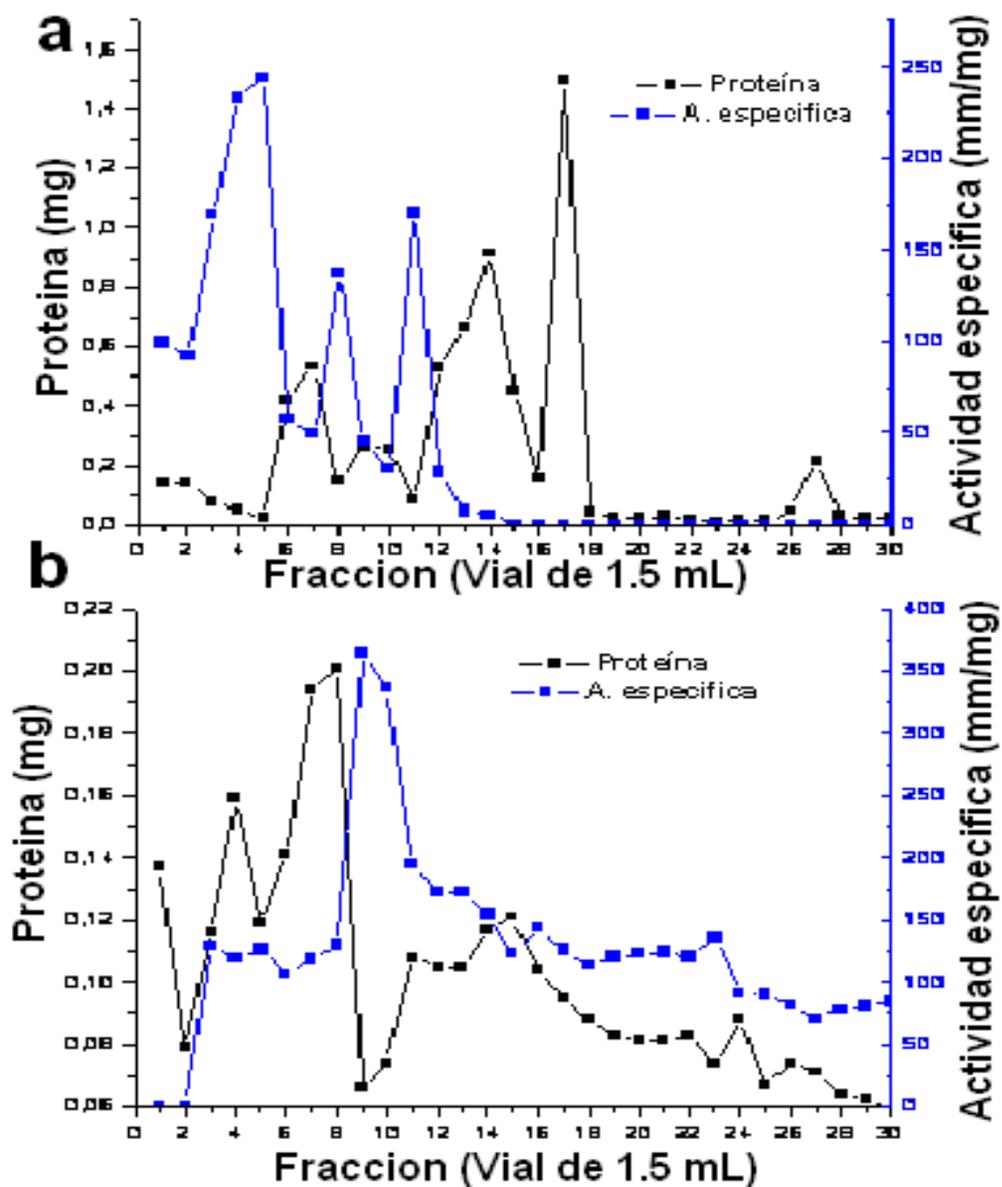


Grafico 5. Comparación de la cantidad de proteína frente a la actividad específica de las fracciones obtenidas por la columna con Sephadex G-25. En el eje Y (color azul) está determinado por la actividad específica y en el eje Y (color negro) está determinado por la cantidad de proteína y en el eje X el número de fracciones **(a)** Veneno de *B.asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus*

7.3 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

SEPARACIÓN POR COLUMNA DE DEAE CELULOSA

Con las fracciones liofilizadas de 1 a 9 para el veneno de *B. asper* y las fracciones liofilizadas de 6 a 16 para el veneno de *M. mipartitus* obtenidas por la separación de la columna en Sephadex G-25 se eluyeron por la columna en DEAE–celulosa, se colectaron 30 fracciones de 1.5 mL y a cada fracción se le determinó la cantidad de proteína por espectrometría, los datos se muestran en la tabla 7 y 8

Tabla 7. Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por DEAE celulosa *B. asper*

Fracción	Absorbancia 280 nm	Absorbancia 260 nm	Proteína total mg	Actividad total mm	Actividad específica mm/mg
1	0,016	0,01	0,052	0	0
2	0,08	0,05	0,258	0	0
3	0,017	0,015	0,045	0	0
4	0,054	0,05	0,137	5	36,470
5	0,046	0,042	0,118	8	67,716
6	0,029	0,027	0,073	10	136,444
7	0,016	0,012	0,047	16	340,136
8	0,02	0,015	0,059	17	289,116
9	0,023	0,019	0,064	15	235,738
10	0,025	0,017	0,077	14	180,668
11	0,011	0,009	0,031	21	685,602
12	0,01	0,009	0,026	19	731,332
13	0,009	0,006	0,028	12	425,985
14	0,007	0,005	0,021	10	472,813
15	0,003	0,002	0,009	7	745,474
16	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0

Tabla 8. Resultados para cada una de las fracciones obtenidas por DEAE celulosa *M. mipartitus*

Fracción	Absorbancia 280 nm	Absorbancia 260 nm	Proteína total mg	Actividad total mm	Actividad específica mm/mg
1	0,027	0,025	0,055	0	0
2	0,024	0,02	0,038	0	0
3	0,01	0,011	0,028	10	352,734
4	0,019	0,017	0,036	15	419,815
5	0,027	0,023	0,045	12	264,375
6	0,026	0,023	0,048	12	251,731
7	0,055	0,034	0,033	20	611,621
8	0,019	0,018	0,040	25	619,118
9	0,019	0,019	0,045	22	488,563
10	0,013	0,015	0,040	21	523,560
11	0,012	0,014	0,038	19	503,445
12	0,021	0,022	0,054	15	275,634
13	0,023	0,025	0,064	15	235,073
14	0,021	0,022	0,054	14	257,258
15	0,033	0,025	0,041	13	316,996
16	0,017	0,015	0,031	12	387,222
17	0,053	0,039	0,061	10	165,262
18	0,039	0,027	0,037	10	273,000
19	0,025	0,021	0,041	10	246,002
20	0,06	0,058	0,133	9	67,720
21	0,03	0,026	0,053	8	152,381
22	0,024	0,022	0,048	8	168,138
23	0,031	0,025	0,046	8	175,554
24	0,016	0,014	0,029	5	174,703
25	0,023	0,018	0,031	5	159,949
26	0,01	0,009	0,019	3	157,480
27	0,011	0,009	0,017	3	178,891
28	0,016	0,012	0,019	0	0
29	0,005	0,004	0,007	0	0
30	0,003	0,002	0,002	0	0

Cuantificación de proteína para cada una de las fracciones del veneno entero de *B. asper* obtenidas por DEAE–celulosa

De acuerdo a los resultados de la tabla 7, se observó que la fracción 1 presentó una cantidad de proteína de 0.052 mg. La fracción 2 fue donde se concentró la mayor cantidad de proteína con 0.258 mg. La fracción 3 la cantidad de proteína decayó nuevamente con un valor de 0.045 mg. Las fracciones 4 y 5 tuvieron valores intermedios de proteína si se compara con las otras fracciones con 0.137 mg y 0.118 mg respectivamente. Las fracciones 6,7,8,9,10,11,12,13 y 14 presentaron valores de cantidad de proteína entre los rangos de 0.021 mg a 0.077 mg. La fracción 15 tuvo un valor muy bajo de proteína de 0.009 mg, finalmente las fracciones que van desde la 16 hasta la fracción 30 no se detecto proteína por la técnica empleada.

Cuantificación de proteína para cada una de las fracciones del veneno entero de *M. mipartitus* obtenidas por DEAE–celulosa

Según los datos de la tabla 8, se observó una similitud en la cantidad de proteína en las fracciones que van de la 1 hasta la fracción 19 con valores promedio entre 0.028 mg a 0.064 mg. La fracción 20 fue donde se concentro la mayor cantidad de proteína 0.133 mg En las fracciones 21,22,23,24 y 25 la cantidad de proteína fue similar al de las primeras fracciones con un rango de 0.029 mg a 0.053 mg, finalmente las fracciones 26,27,28,29 y 30 con valores muy bajos de proteína con un promedio entre 0.002 mg a 0.019 mg las cuales no se tuvieron cuenta para la siguiente etapa.

Identificación de las fracciones con actividad tipo PLA₂

A cada fracción de los dos venenos estudiados se les realizó la prueba de lisis de eritrocitos (formación de halo) para identificar aquellas fracciones donde se presentó la enzima con actividad tipo PLA₂ como se observa en la figura 12, se realizo la medición del halo. Los resaltados se muestran en la tabla 7 y 8.

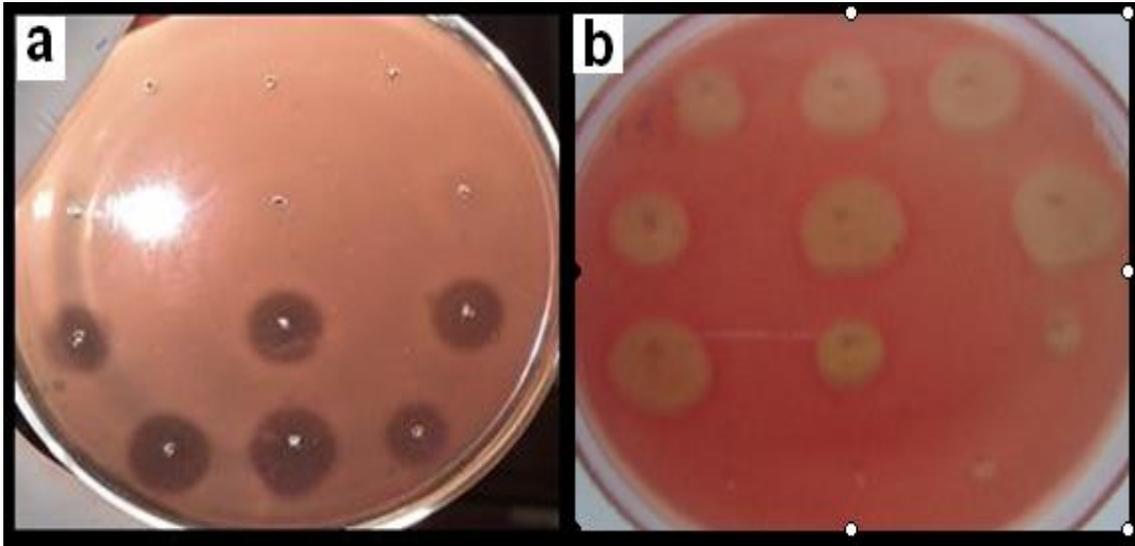


Figura 12. Actividad hemolítica de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico. La fracción decolorada del agar es donde se presenta hemólisis por la acción de la enzima con actividad tipo PLA₂ **(a)** Veneno *B. asper* **(b)** Veneno de *M mipartitus*

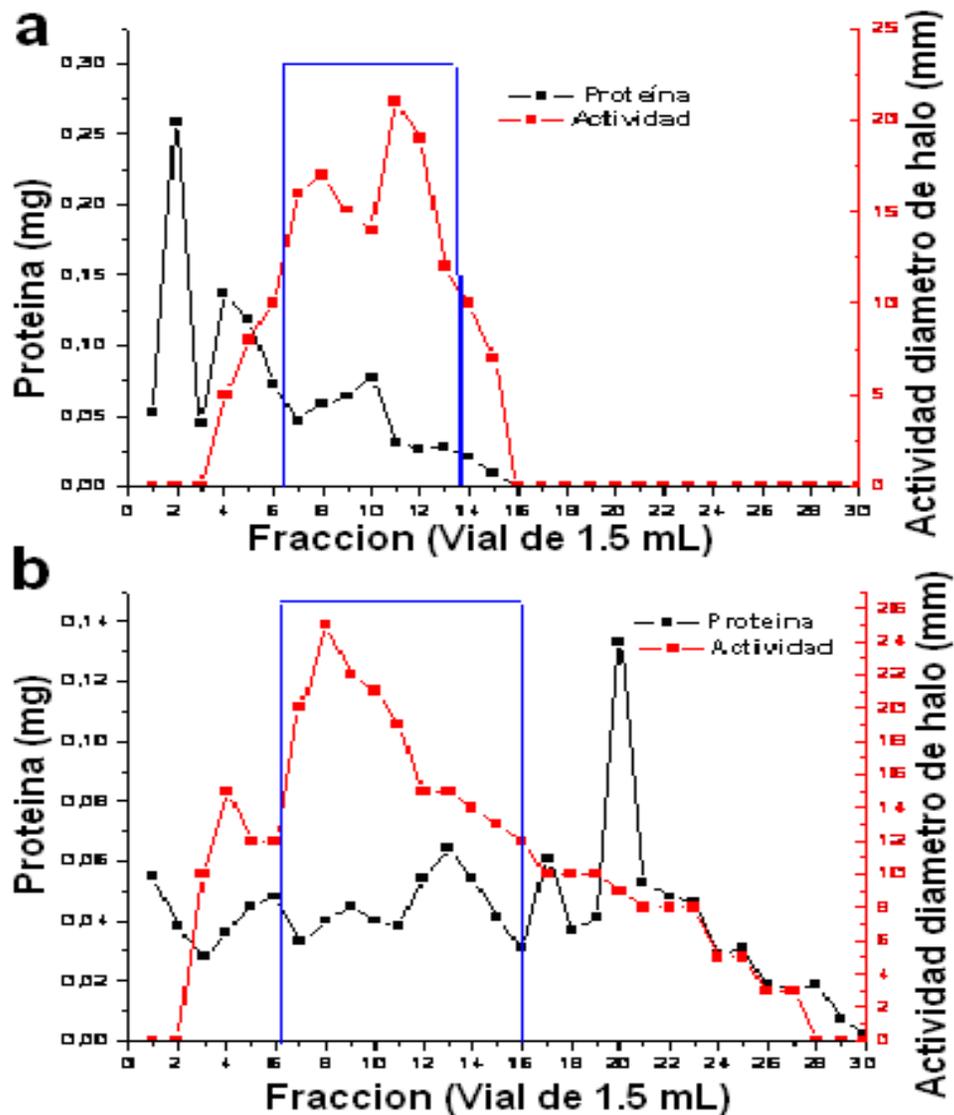
Determinación de la actividad tipo PLA₂ en las fracciones del veneno de *B. asper* obtenidas por DEAE–celulosa

Según los datos de la tabla 7, las fracciones 1,2, y 3 no presentaron actividad a pesar de la presencia de proteína. Las fracciones 4,5, y 6 tuvieron actividad con halos entre 5 mm a 10 mm siendo pequeños para la cantidad de proteína presente. Las fracciones 7,8,9,10,11 y 12 presentaron la mayor actividad con halos de 16 mm a 21 mm. Las fracciones 13,14 y 15 tuvieron poca actividad con halos de 7 mm a 12 mm finalmente las fracciones de la 16 hasta la 30 no presentaron actividad ya que no presentaban proteína por lo que no se tienen en cuenta en la siguiente etapa de purificación.

Determinación de la actividad de la tipo PLA₂ para cada fracción del veneno de *M. mipartitus* obtenidas por DEAE–celulosa

Según los datos de la tabla 8, se observó que las fracciones 1 y 2 las proteínas presentes no tenían actividad. Las fracciones 3,4,5 y 6 presentaron una moderada actividad con halos de 10 mm a 15 mm. Las fracciones 7,8,9,10 y 11 fueron las que presentaron mayor actividad con valores entre 19 mm a 25 mm esta actividad es alta si se tiene en cuenta que la baja cantidad de proteína existente, originando que estas fracciones presentaran una actividad especifica alta demostrando que un alto porcentajes del contenida total de proteína pertenecía a la enzima con actividad tipo PLA₂. Las fracciones 12,13,14,15,16,17,18 y 19 con una actividad moderada con halos de 10 mm a 15mm. Las fracciones 20,21,22,23,24,25,26 y 27 tuvieron una baja actividad comparada con fracciones anteriores con halos entre 3 mm y 9 mm. Finalmente la s fracciones 28,29 y 30 no presentaron actividad.

Con los resultados obtenidos de cantidad de proteína y de actividad se realizó una comparación a través de la grafica 6 permitiendo seleccionar las fracciones para la siguiente etapa de purificación de los dos venenos empleados.

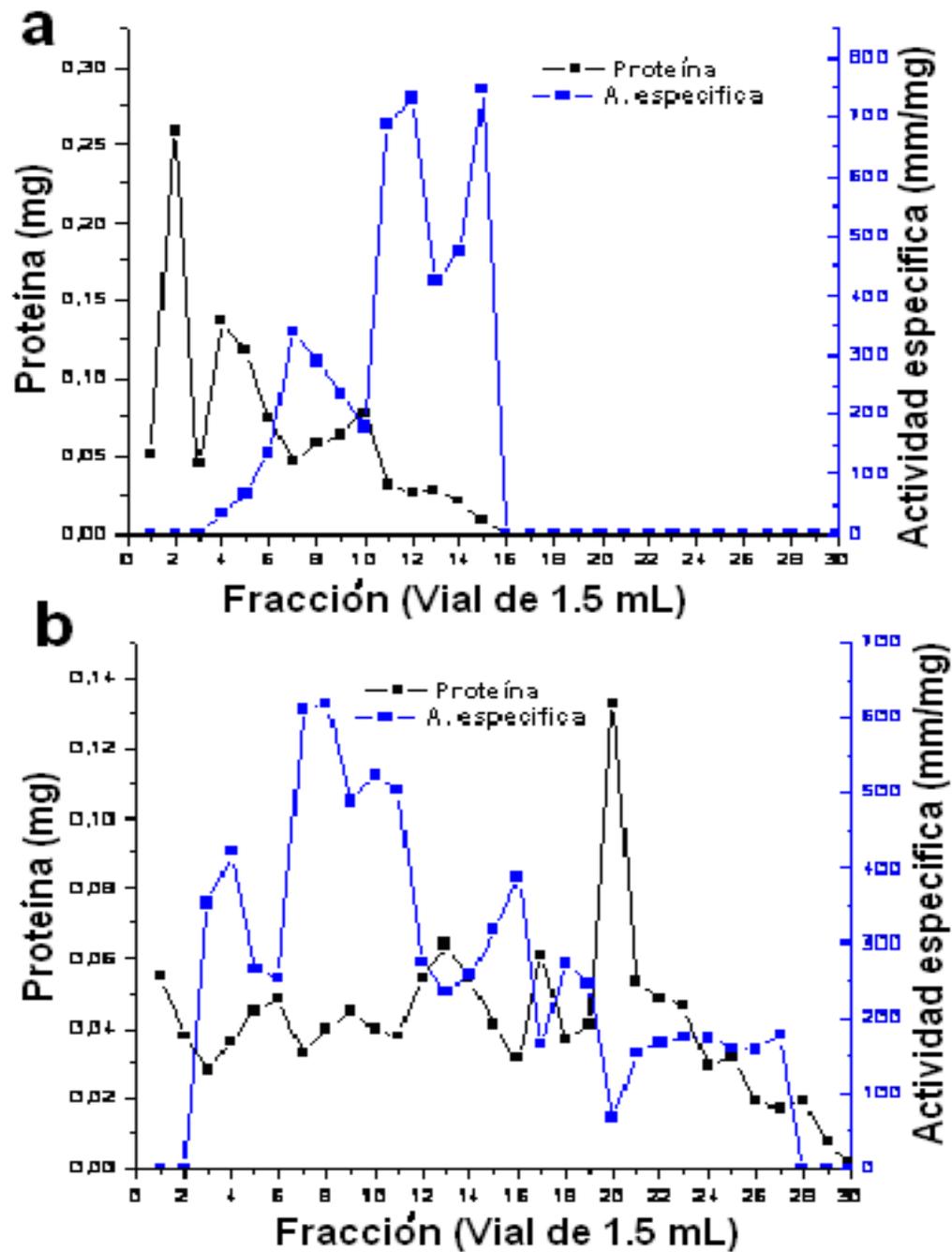


Grafica 6. Comparación de la cantidad de proteína frente a la actividad de cada una de las fracciones obtenidas a través de DEAE-Celulosa, la cual permitió seleccionar las fracciones para la siguiente etapa de purificación por HPLC resaltadas por la cuadrícula azul. En el eje Y (color rojo) determinado por la actividad y en el otro eje Y (color negro) por la cantidad de proteína, ambos comparados con el número de fracciones **(a)** Veneno de *B. asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus*

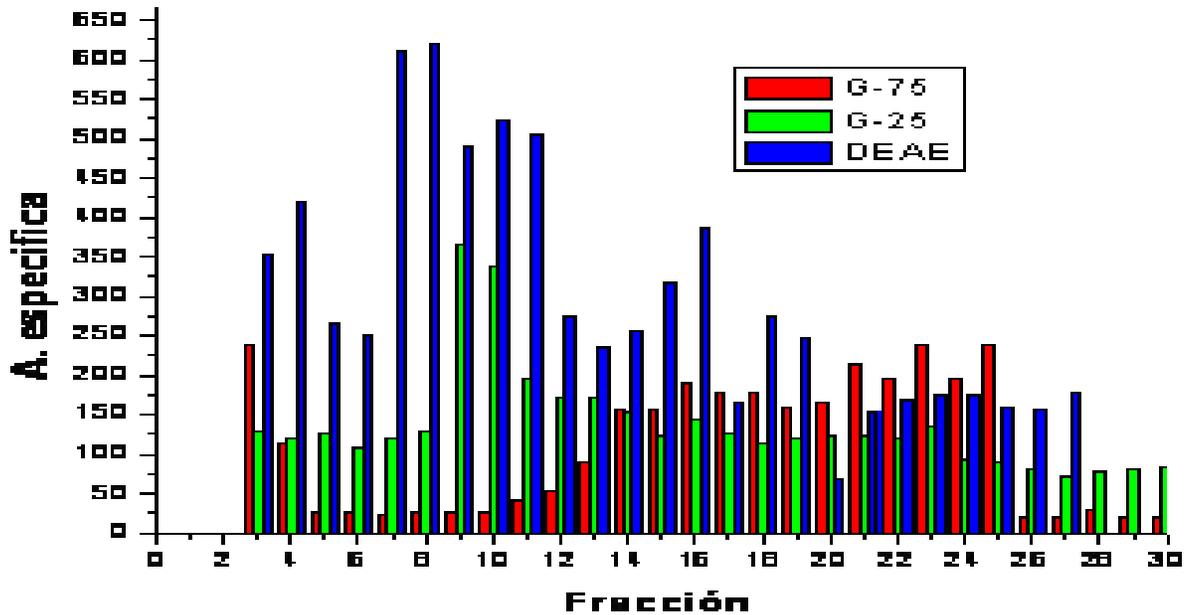
Según la grafica 6(a), las fracciones 7, 8, 9, 10, 11, 12 y la 13 fueron escogidas para la última etapa de purificación por HPLC, por presentar la mayor actividad con la menor cantidad de proteína. Fracciones como la 1, 2, 3, 4, 5 y 6 por su alto contenido de proteína no se eligieron para los siguientes pasos de purificación pues aumentaría la interferencia por otras proteínas. Igualmente se descartaron las fracciones de la 14 a la 30 ya que la actividad fue mucho menor comparada con las fracciones seleccionadas.

Las fracciones del veneno de *M. mipartitus* se escogieron de acuerdo a la grafica 6(b) las cuales fueron de la 7 a la 15 por presentar mayor grado de actividad y una cantidad proteica relativamente baja, las cuales se mezclaron y liofilizaron. No se eligieron las fracciones restantes por tener la mayor concentración de proteína lo cual incrementaría la interferencia en el último proceso de separación.

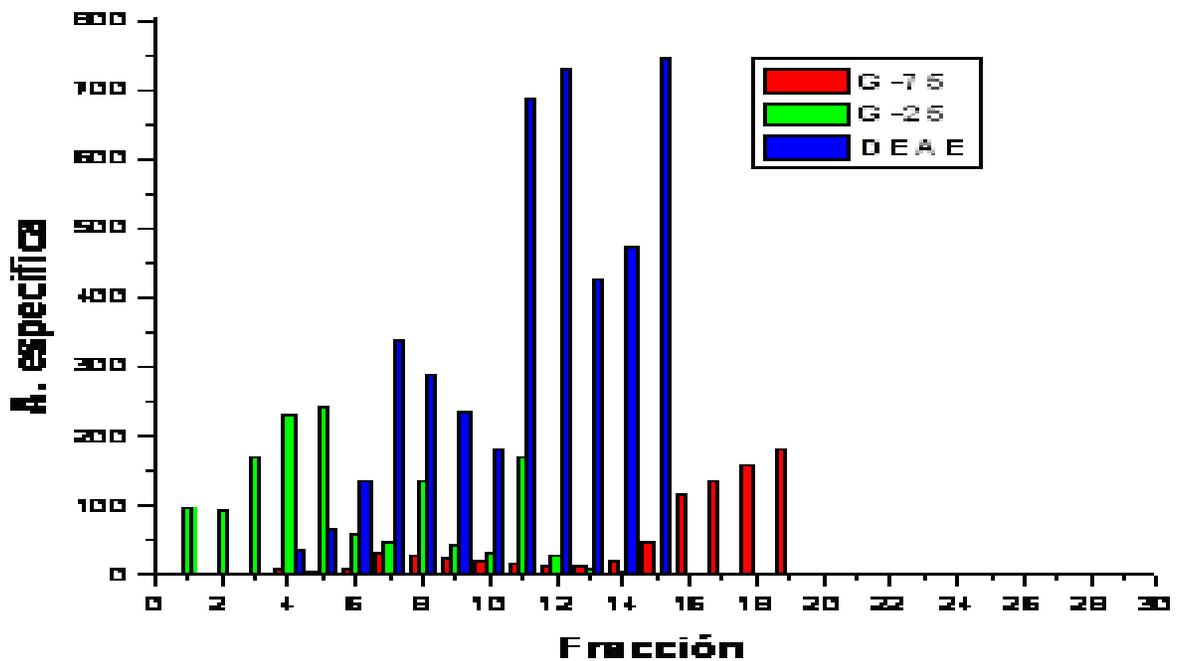
Con los datos obtenidos de la concentración y de la actividad, se determina la actividad específica los resultados se muestran en la tabla 7 y 8 los cuales permitieron realizar la grafica 7 donde se comparó la actividad específica con la cantidad de proteína para cada una de las fracciones obtenidas por este proceso de separación. Permite ver el grado de purificación de las diferentes fracciones ya que a menor proteína mayor será la actividad específica, lo que indica que la mayor concentración pertenece a la enzima con actividad tipo PLA₂, ratificando que las fracciones seleccionadas para la última etapa de purificación fueron las que mayor actividad específica tuvieron y por ello el grado de interferencia por otro tipo de proteína será mínimo.



Grafica 7. Comparación de la cantidad de proteína frente a la actividad específica de las diferentes fracciones obtenidas por DEAE-Celulosa **(a)** Veneno de *B. asper* **(b)** Veneno de *M. mipartitus*



Grafica 8. Comparación de la actividad específica de las diferentes etapas de purificación por Sephadex G-75, G-25 y DEAE-celulosa para el veneno de *M. mipartitus*



Grafica 9. Comparación de la actividad específica de las fracciones obtenidas por Sephadex G-75 y G-25 DEAE- celulosa, para el veneno de *B. asper*

Las graficas 8 y 9 permitieron ver como a pesar de que la cantidad de proteína va disminuyendo en las fracciones obtenidas a lo largo de los diferentes procesos de purificación de la enzima con actividad tipo PLA₂ no pierde su actividad específica. Como se pudo observar en las graficas 8 y 9, para el proceso de purificación por DEAE correspondiente a las barras azules presentaron la mayor actividad específica comparada con la actividad específica obtenida por los otros procesos de purificación donde la separación por Sephadex G 25 (barras verdes) presento valores intermedios y el proceso por Sephadex G75 (barras rojas) presento la menor actividad específica evidenciando la viabilidad de los procesos de separación y que las fracciones seleccionadas para la purificación por HPLC presentan la mayor concentración de PLA₂

7.4. ELECTROFORESIS EN GEL

Como parámetro de seguimiento de verificación y purificación de las fracciones obtenidas por los diferentes métodos de separación, se empleo la técnica de SDS – PAGE en la cual utiliza polímeros biológicos que presentan carga eléctrica. Estos venenos están constituidos en su gran mayoría por proteínas que pueden ser consideradas como polianfolitos débiles. Donde las cargas derivan de los aminoácidos con grupos laterales ionizables. Estos son los residuos básicos de asparagina, lisina e histidina y los residuos ácidos del ácido glutámico y aspártico. Las cadenas laterales de tirosina también contribuyen a la carga total de la proteína. Debido a que estos grupos presentan diferentes grados de ionización la carga neta de las proteínas es muy dependiente del pH del medio. Las modificaciones como fosforilación y glicosilación también le aportan carga a las proteínas.

A lo largo del proceso de separación se someten las moléculas cargadas a un campo eléctrico, producido por el paso de corriente eléctrica a través de la solución (Buffer del electrodo), éstas se desplazan a lo largo del gel. Dicho fenómeno se conoce como electroforesis. La velocidad de migración depende de la carga, tamaño y forma de las partículas (anexo 1). Esto permite separar componentes de una mezcla compleja, siempre y cuando, presenten velocidades de migración lo suficientemente diferentes.

En la realidad, la separación de macromoléculas ocurre en soluciones acuosas que contienen, además de la macromolécula de interés, los iones constituyentes de los buffers y sales. En este caso, no se estudia la macromolécula sola sino en presencia de otras especies cargadas que influenciarán el campo local además de interaccionar con la macromolécula generando una capa de contraiones y dificultando su análisis. En consecuencia, la definición de movilidad electroforética, deducida (anexo 2), para el caso ideal de una partícula cargada, en una solución diluida de un solvente no conductor, es solo una aproximación al comportamiento de una macromolécula en condiciones reales.

El gel empleado se obtiene mediante la polimerización de monómeros de acrilamida generando cadenas largas y el entrecruzamiento de éstas por compuestos bifuncionales como la N,N'-metilen bisacrilamida que reaccionan con los grupos funcionales libres en los extremos de las cadenas (ver figura 13). La reacción de polimerización de acrilamida es iniciada con persulfato de amonio y calor o riboflavina fotoactivada. La N,N, N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) actúa como catalizador de la reacción de polimerización.

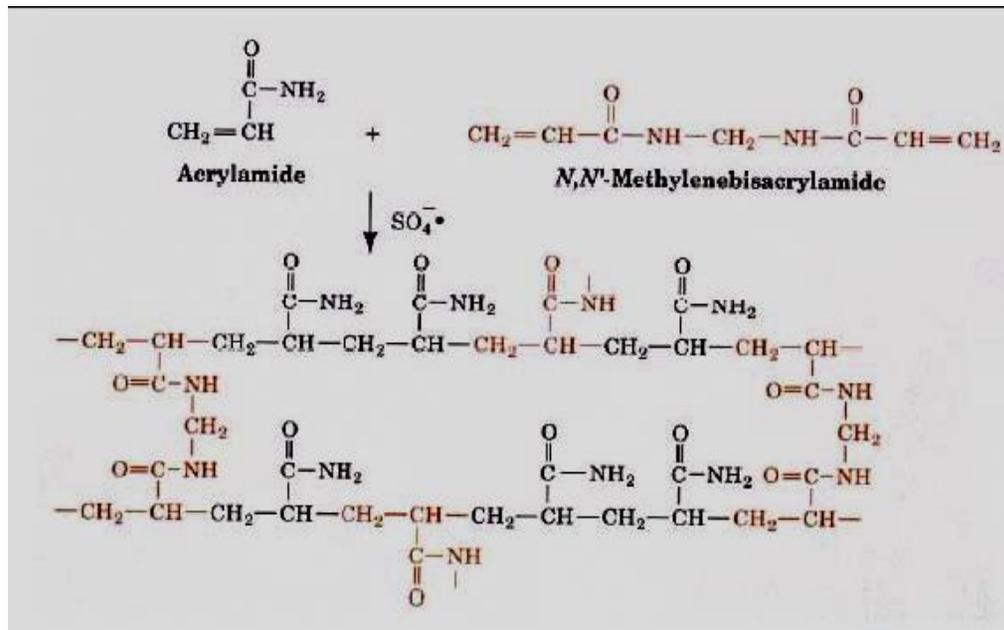


Figura 13. Reacción de copolimerización de monómeros de acrilamida y bisacrilamida para formar un gel poroso.

El-TEMED, cataliza la formación de radicales libres de persulfato y éste a su vez inicia la polimerización. El aumento de la concentración de TEMED y persulfato de amonio aumenta la velocidad de polimerización. El oxígeno inhibe la polimerización y por lo tanto la solución del gel generalmente se desairea antes de usar.

La solución de macromoléculas obtenidas en los diferentes procesos de separación cromatográficos se aplica como una capa fina en lo alto de los pocillos de la placa (ver figura 13). Generalmente, en los sistemas verticales, se incluye glicerol o sacarosa en el buffer de muestra para aumentar la densidad y facilitar la aplicación de la muestra (10 μL . La cantidad de muestra que se siembra depende en principio de la sensibilidad del método de detección y de la capacidad de separación del gel). Cuando se hace pasar corriente la capa de macromoléculas

migra. Si existen componentes de diferente movilidad se separarán durante la electroforesis. A la solución de macromoléculas se le adiciona un colorante de bajo PM y alta movilidad (marcador del frente de corrida) en una relación de 1:1. Que indica el progreso de la corrida, así como, el tiempo de parada de esta.

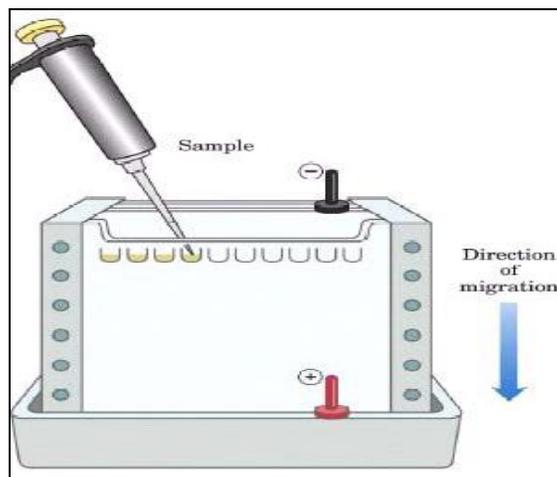


Figura 13. Equipo de electroforesis vertical en placas.

El tipo de electroforesis empleado fue no desnaturizante o nativa ya que al no desnaturizar la muestra, permite realizar ensayos biológicos posteriores a la separación. Lo cual es muy importante debido a que estos ensayos biológicos nos permitirán identificar la proteína de interés a demás de su actividad. La separación electroforética puede realizarse a cualquier pH entre 3 y 11. En el anexo 3, se describen algunos parámetros del sistema que pueden ser variados para optimizar la separación.

Con el fin de determinar el grado de purificación de las diferentes fracciones seleccionadas para cada proceso de purificación del veneno de la serpiente *B. asper* (mezcla de fracciones concentradas obtenidas por Sephadex G-75 y G-25) se realizo una electroforesis en gel (ver figura 15)

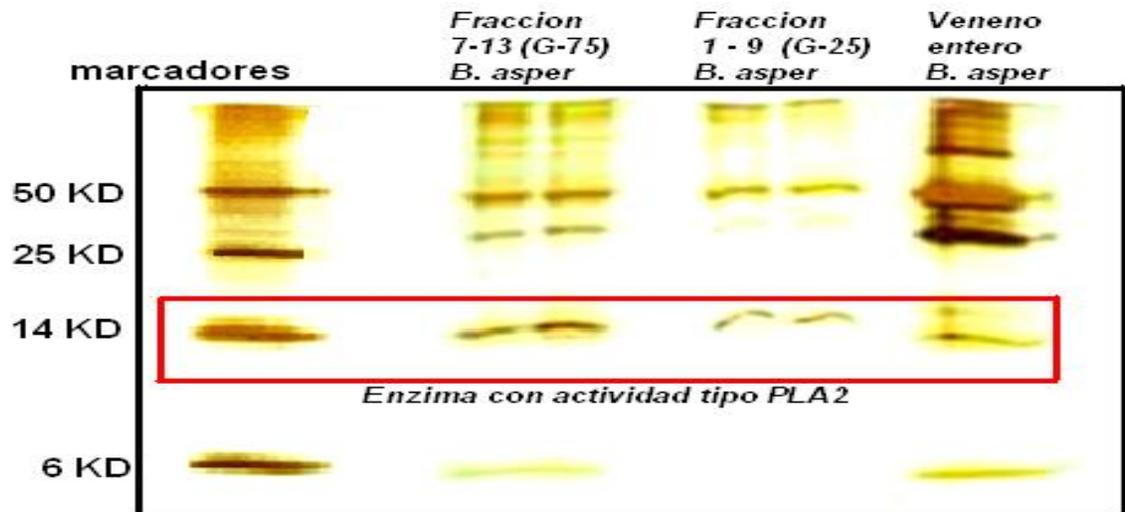


Figura 15. SDS-PAGE del veneno de *B. asper*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera línea se encuentran los marcadores de peso molecular y en su orden: la mezcla de las fracciones 7–13 obtenidas por la separación por Sephadex G-75, la mezcla de las fracciones 10-20 obtenidas por la separación por Sephadex G-25 y finalmente el veneno entero

Con base en la figura 15, se observó para el veneno entero la presencia de 5 bandas bien definidas que corresponden a proteínas de diferente peso molecular comparadas con los marcadores empleados, para la mezcla concentrada de las fracciones 7 a 13 obtenidas por el proceso de separación por Sephadex G-75 presentó 4 bandas y para la mezcla concentrada de las fracciones de 10 a 20 se observaron 3 bandas. De acuerdo a estos resultados se pudo observar que a medida que se avanza en el proceso de separación el número de bandas va disminuyendo indicando la buena separación de estas fracciones. En la cuadrícula roja se resaltan la posible presencia de la enzima con actividad tipo PLA₂ ya que esta posee un peso de aproximadamente 14 KD la cual aparece a igual distancia del marcador utilizado para su identificación que poseía un peso similar

Para la separación por la columna de DEAE-celulosa se realizó también un seguimiento por electroforesis para determinar el grado de purificación de las fracciones seleccionadas observándose solo dos bandas (ver figura 16) lo que demuestra que los tres procesos de purificación anteriores fueron eficientes ya que solo quedan dos bandas. Lo que pudo facilitar el proceso de separación por HPLC para la enzima con actividad tipo PLA₂ que se resalta su en la cuadrícula roja de acuerdo al criterio de comparación con un marcador de igual peso molecular. Ya que el número de proteínas es menor si se compara con el veneno entero

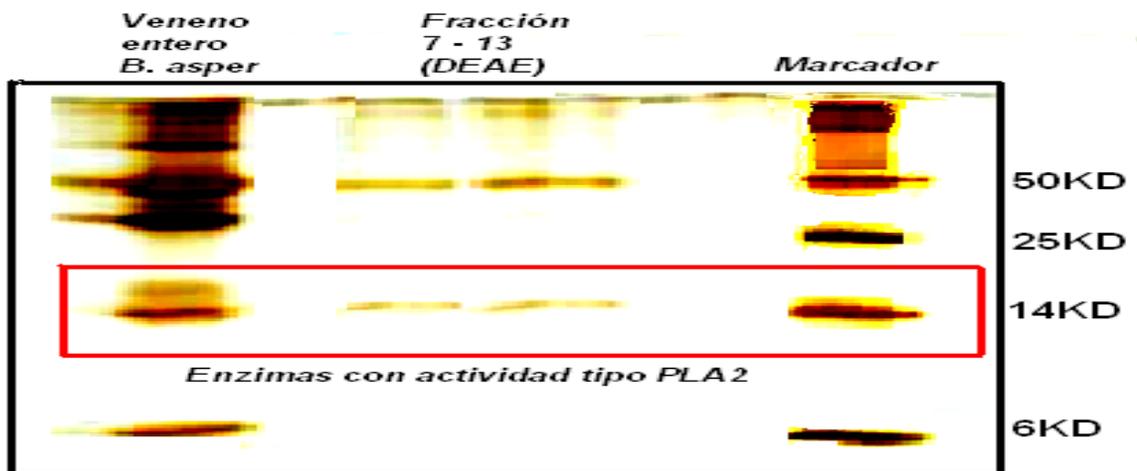


Figura 16. SDS-PAGE del veneno de *B. asper*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera línea se observa el veneno entero seguida de las fracciones 6-12 concentradas, obtenidas por DEAE-Celulosa y por último los marcadores

De igual manera para el veneno de *Micrurus mipartitus* se determino el grado de purificación de las fracciones seleccionadas para cada etapa de purificación en la figura 17 y 18 se observa la mezcla concentrada de las diferentes fracciones seleccionadas en cada etapa de separación observándose. Presentando el mismo comportamiento que para el veneno de *B. asper* donde en cada etapa se observa

que van disminuyendo el número de bandas ratificando la eficiencia del proceso y de que se conserva la presencia de la enzima con actividad tipo PLA₂ de acuerdo a la comparación con el marcador de igual peso molecular ya que las bandas aparecen a igual distancia resaltándose por la cuadrícula roja

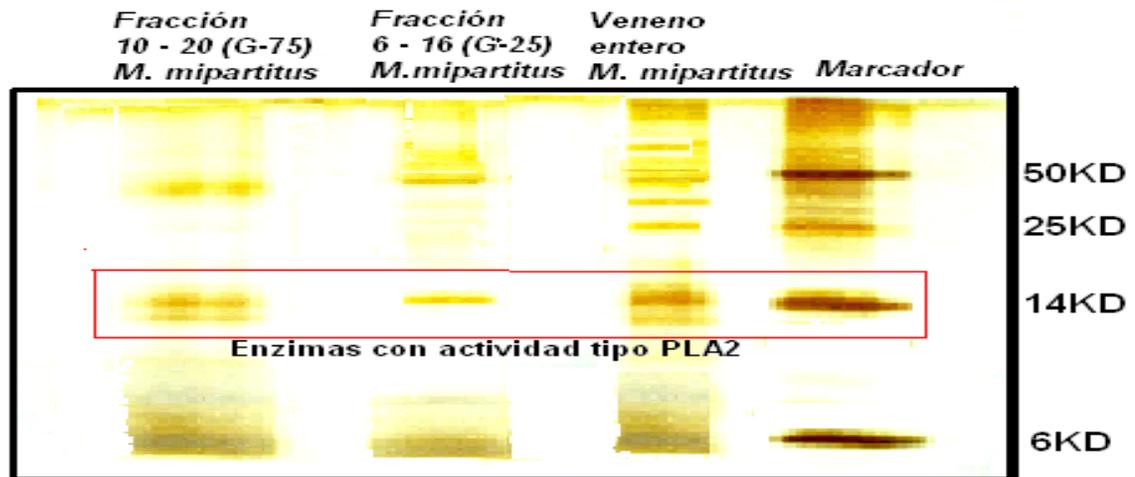


Figura 17. SDS-PAGE del veneno de *M. mipartitus*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera línea se observan las fracciones 6-12 concentradas obtenidas por la separación con Sephadex G-75, las fracciones 7-14 concentradas, obtenidas por la separación con Sephadex G-25, el veneno entero y finalmente los marcadores.

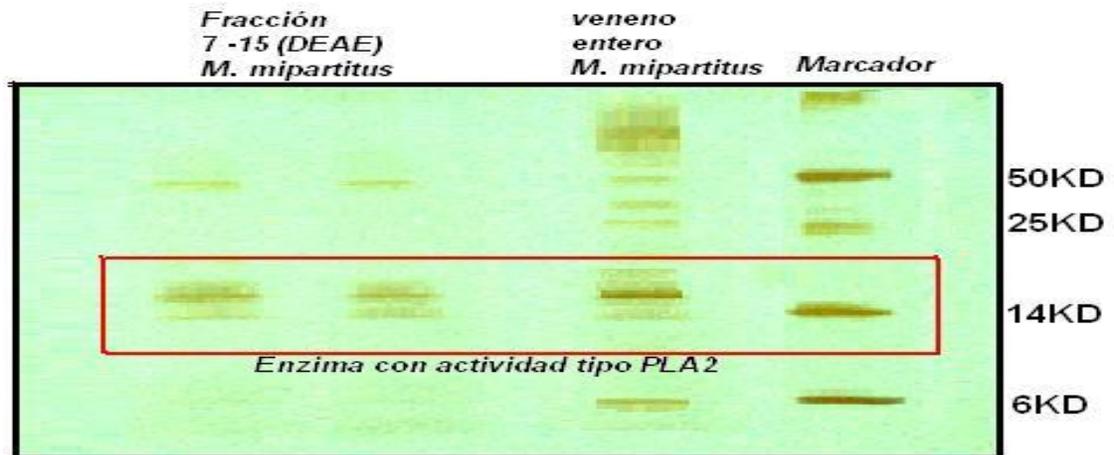


Figura 18. SDS-PAGE del veneno de *M. mipartitus*. Corrida de las fracciones concentradas para cada etapa de la purificación. En la primera parte se observan las fracciones 6-12 concentradas, obtenidas por la separación con DEAE-Celulosa, el veneno entero y finalmente los marcadores.

7.5. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION HPLC

Como ultima etapa de purificación para la enzima con actividad tipo PLA₂ se tomaron las fracciones que presentaron mayor actividad hemolítica del fraccionamiento por columna de DEAE las cuales fueron para el veneno de la serpiente *B. asper* las fracciones de 7-13 y para el veneno de la serpiente *M. mipartitus* las fracciones de la 7-15 las cuales se mezclaron y se concentraron por liofilización y se sometieron al proceso de purificación por HPLC

La elección de la fase móvil es uno de factores que afectan en gran parte la selectividad en un sistema cromatográfico, la selectividad de esta depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, bipolar, puentes de hidrógeno, entre otras, por lo que no solo la polaridad sino la suma de todas estas propiedades es la que define la afinidad de

la fase móvil por un analito dado a la mediana polaridad de la PLA₂ se evaluaron diferentes fases móviles para determinar cual de ellas permitía mejor resolución de las picos de interés, se relacionan varias combinaciones de solventes y el cromatograma correspondiente. Con respecto a los datos observados se seleccionó la mejor fase móvil Agua/Acetonitrilo (90/10) taponada con TFA al 0.1% que presentó la mejores características en cuanto a resolución, intensidad y simetría del pico de la enzima analizada dada su mediana polaridad permite una mayor afinidad entre la fase móvil y el analito. En la tabla 9 se muestran las condiciones cromatográficas seleccionadas en el proceso de separación de la enzima PLA₂ por HPLC

Tabla 9. Condiciones empleadas en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución HPLC

Parámetro	Características
Detección	Visible 280 nm
Elusión	Isocrática
Flujo	1 mL/min
Columna	Water μ Bondapak™ C ₁₈ (120 mm x 2 mm x 10 μ m)
Fase móvil	Agua/Acetonitrilo (90/10) taponada con TFA al 0.1%
Tiempo de retención (min)	PLA ₂ <i>B. asper</i> 1.490 y <i>M. mipartitus</i> 1.332

El proceso de separación por HPLC consistió en inyectar las fracciones seleccionadas de los procesos de separación por DEAE-celulosa y colectando manualmente cada uno de las bandas que aparecieron en los cromatogramas para cada especie analizada (ver figuras 19 y 20). Como no se cuenta con patrones ya que esta enzima no se encuentra aislada de ninguna de las dos especies estudiadas. La única fosfolipasa que se venden en el mercado pertenece a otros géneros como crotalidae y otras especies de Bothrops, las cuales pueden tener ciertas diferencias a la hora de compararla con las dos especies estudiadas ya que esta enzima se ven afectadas por el medio donde se desarrollen

Si bien es cierto que existen estudios para la especie *B. asper* en el aislamiento de PLA₂ no se tienen las mismas condiciones para separación ya que la mayoría son de otros países, por tal motivo se abordó el proceso de separación y evaluación de las fracciones con actividad tipo PLA₂ del veneno de *B. asper* de la cual se ha comprobado al existencia de esta enzima. Una vez se realizo todo el proceso de separación para este veneno y se obtuvo la enzima con actividad tipo PLA₂ se repitió la misma metodología para la especie *M. mipartitus* de la cual no se encuentra reportes de separación de este tipo de enzimas

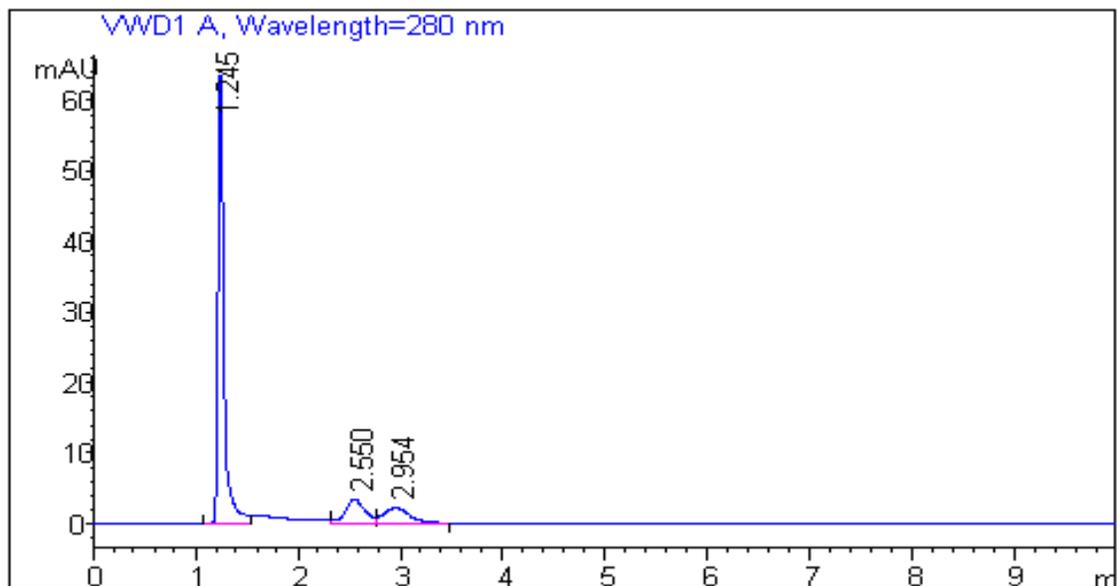


Figura 19. Cromatograma de las fracciones obtenidas por la separación por DEAE-celulosa veneno de *B. asper*

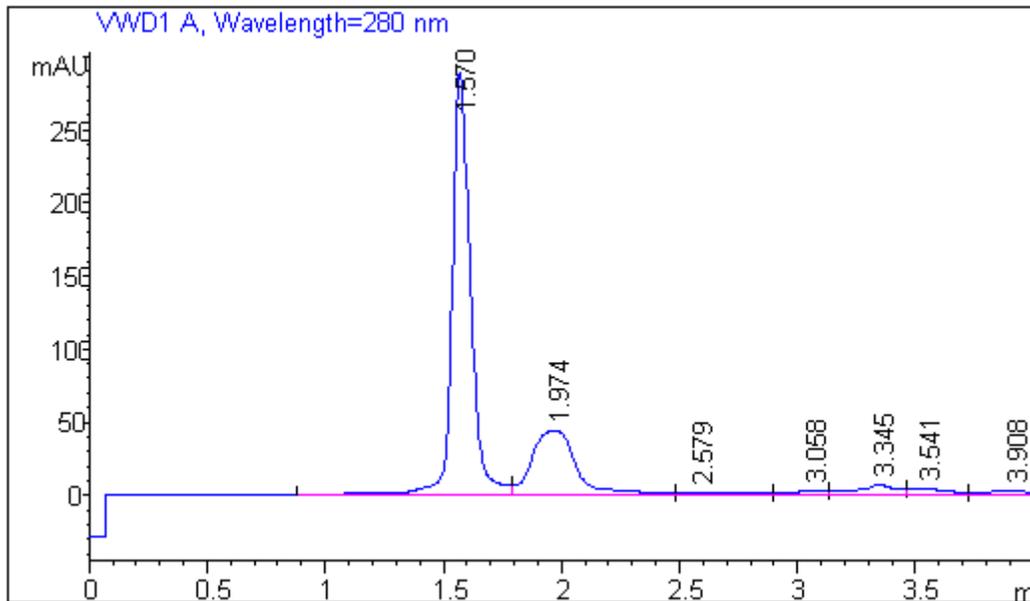


Figura 20. Cromatograma de las fracciones obtenidas por la separación por DEAE-celulosa veneno de *M.mipartitus*

Las Figuras 19 y 20 muestran los cromatogramas para las fracciones obtenidas por DEAE-celulosa para las dos especies analizadas observándose tres y siete bandas respectivamente resaltando en los dos casos la primera banda la cual presenta una mayor concentración en comparación con las bandas restantes con un tiempo de retención de 1.2 y 1.5 minutos

Como no se sabe cual de las bandas presentes en los cromatogramas es la PLA₂ se recogen en viales cada una evitando que hayan mezclas entre estas y se les realiza la prueba de actividad hemolítica, la cual nos permitió identificar en cual de las bandas recogidas se encuentra la enzima con actividad tipo PLA₂ debido a que esta es responsable de este tipo de actividad. Todos los resultados indicaron que en ambos casos es la primera banda. El resto de las bandas no presentaron ninguna actividad lo que se refleja en la no decoloración del agar (ver figura 21).

Por lo que se asume que los resultados positivos corresponden con la enzima con actividad tipo PLA₂

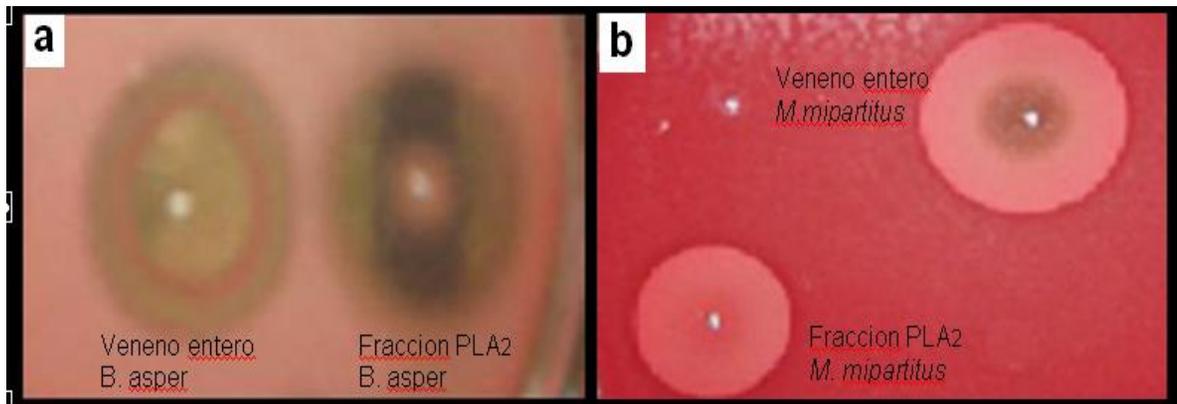


Figura 21. Determinación de la actividad hemolítica para las fracciones obtenidas por HPLC. Se observó para la primera banda presencia de actividad reflejada en la lisis de los eritrocitos presentes en la sangre por acción de la enzima con actividad tipo PLA₂, actividad similar a la del veneno entero **(a)** Veneno *B. asper* **(b)** Veneno *M. mipartitus*

De acuerdo al a figura 21(a) se observó que la fracción recolectada por HPLC que corresponde a la primera banda que se observa en el cromatograma de la figura 18 presento actividad con un halo de 25 mm muy similar si se compara con la actividad del veneno entero con un halo de 30 mm comprobando la potencia y acción para inducir hemólisis de la PLA₂ aislada.

En la figura 21(b) se observó que la primera fracción colectada por la separación por HPLC que corresponde a la primera banda del cromatograma de la figura 20, la cual presentó actividad con un halo 30 mm que fue similar a la actividad del veneno entero con un halo de 40 mm ratificando la capacidad de esta enzima para producir lisis en los eritrocitos, lo cual es muy importante ya que para este tipo de veneno no se había encontrado reporte alguno de este efecto tanto en vivo como

in Vitro. El único reporte es de Otero ^[17] que realizó pruebas de actividad hemolítica para el veneno entero.

De acuerdo a las figuras 18 y 19. La banda que presenta mayor concentración (tiempo de retención de 1.3 y 1.5) pertenece a la enzima con actividad tipo PLA₂ lo que ratifica la viabilidad de las separaciones anteriores además el tiempo de elusión entre bandas es razonable para poder recolectar la fracción deseada en este caso la que eluye primero sin que se presenten mezclas.

Una vez comprobada la presencia de la enzima con actividad tipo PLA₂ en las fracciones obtenidas por la técnica de HPLC se inyectó nuevamente esta fracción para comprobar que no se hayan presentado mezcla cuando se recolectó lo que se observa en la figura 22 y 23, donde se observó una sola banda comprobando que el proceso de recolección fue eficiente y no se presentaron mezclas de bandas

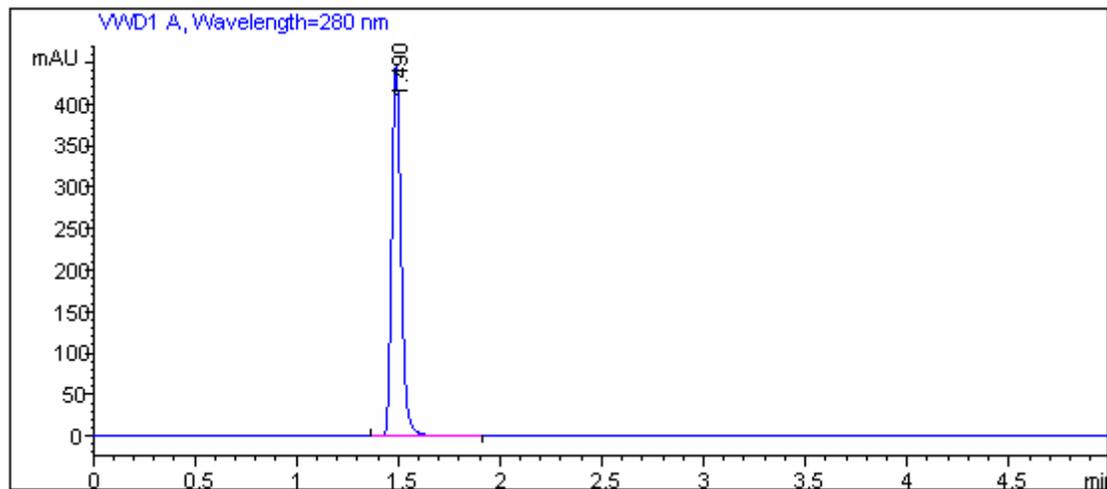


Figura 22. Cromatograma veneno *B asper* PLA₂ recolectada de la fracción obtenida por DEAE

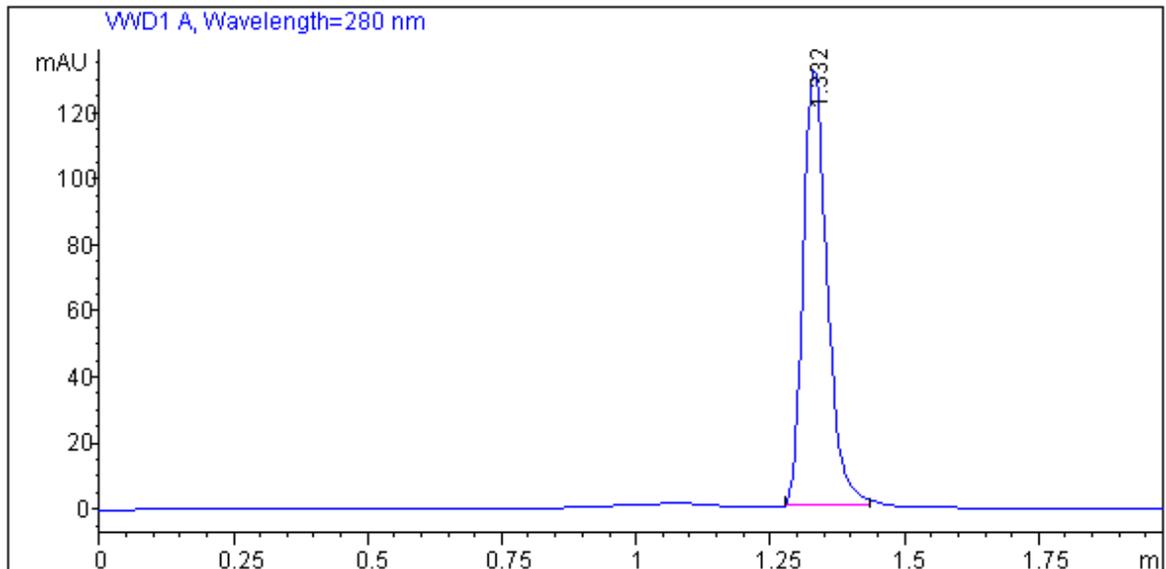


Figura 23. Cromatograma veneno *M.mipartitus* PLA₂ recolectada de la fracción obtenida por DEAE

7.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPIDICA EN MEMBRANAS ARTIFICIALES

Una vez terminado el proceso de purificación por HPLC e identificada la enzima con actividad tipo PLA₂ de las dos serpientes estudiadas, se procedió a determinar el tiempo de ruptura de esta enzima sobre membranas de fosfolípidos. Para ello se empleó un montaje que se describe en la metodología que consta de un dispositivo de preamplificación HEADSTAGE, a un amplificador AXOPATCH, filtro (Frequency Devices 900), osciloscopio (LEADER LBO5825), interfase (DigiData 1200 SERIES INTERFASE) y finalmente un computador en el que la señal de la corriente se pueda graficar en tiempo real para ser observada y almacenada, empleando el software FETCHEX de Pclamp 6.0 (Figura 9).

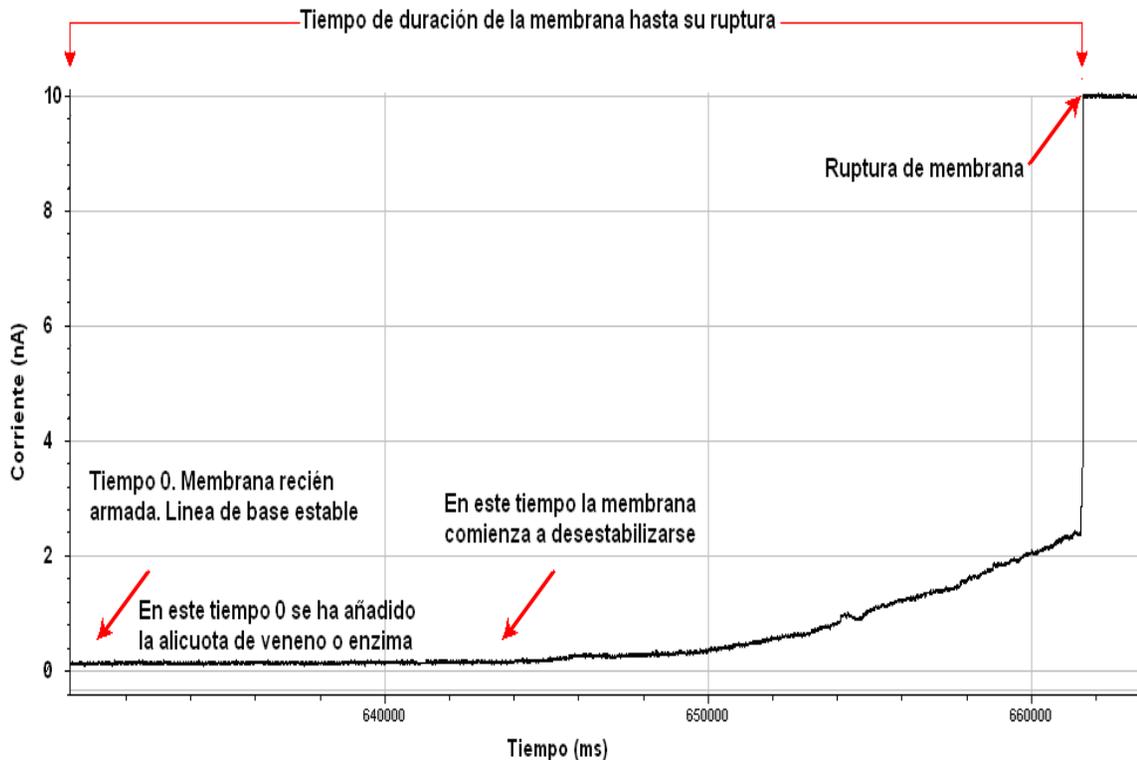
Antes de empezar el experimento se calibró el montaje. Se verificó que los instrumentos midieran apropiadamente la corriente proveniente de la cámara donde se adiciona la muestra, mediante el uso de una célula electrónica Axon Instruments (PATCH-1U MODEL CELL), que esta constituida de tal forma que simula el comportamiento eléctrico de una membrana biológica; con un circuito R-C cuya resistencia es de 10Ω . Esta célula se conectó a los electrodos del montaje para cerrar el circuito, calibrando el Axopatch y el respectivo cabezal (headstage), a bajos niveles de ruido. Esto se repitió con cada uno de los experimentos.

El ruido puede alterar el registro de datos al interferir con la estabilidad de la membrana y alterar el registro de corrientes tan pequeñas como las que se registran en el experimento ^[47]. Para corregir este factor se utilizan filtros de paso bajo, que modifican la señal dependiendo de la magnitud del experimento. Debido a esto el sistema debe estar aislado de las fuentes de ruido, para aislar el sistema del ruido electromagnético se uso una campana de Faraday en la cual se encuentra la cámara y el soporte del montaje; para aislar este sistema de las vibraciones mecánicas del medio externo, todo el montaje se instaló sobre una lámina de mármol que a su vez esta sobre un neumático inflado el cual esta en contacto con una superficie de arena que cumple la función de las mesas antivibratorias empleadas para este tipo de montaje. Todos los aparatos usados en el experimento están conectados a una tierra común para disminuir el efecto de artefactos eléctricos sobre las señales provenientes de la preparación.

En el experimento se emplearon dos soluciones salinas, una con cloruro de calcio que en presencia de proteínas del veneno aumenta su actividad y otra deficiente de esta empleando un agente quelante como el EGTA aun pH de 7.2. Las cuales van a ir en las cavidades de la cámara donde sirvieron como medio de difusión de los diferentes venenos analizados y de la enzima con actividad tipo PLA₂. La solución esta separada por una membrana de fosfolípidos, para lograr

características parecidas a la de las membranas biológicas, se debe usar mezcla de lípidos anfipáticos que tomen la conformación de bicapas cuando se les maneje para elaborar la membrana en el agujero de la partición. Lo ideal sería obtener mezclas idénticas a las de las membranas que se quieren estudiar, pero lograr estas condiciones es muy difícil debido a la diversidad de lípidos que la componen, más glicolípidos, proteínas y colesterol ^[30]. La falta de estos compuestos provoca que a la hora de armar la membrana en la partición de la cámara esta no quede con la misma consistencia que una membrana biológica. Lo cual hace que esta técnica nos proporcione datos aproximados del tiempo de desestabilización de la membrana por acción de los venenos enteros y sus fracciones con actividad tipo PLA₂ para las dos especies estudiadas.

Una vez estabilizado el equipo se realizaron experimentos para determinar el tiempo de desestabilización de la bicapa artificial de fosfolípidos tanto para los venenos enteros como para la enzima con actividad tipo de PLA₂ comparando su acción con las dos soluciones determinando que tanto influye la presencia o ausencia de calcio en esta, se tomaron diez datos por cada experimento los resultados se muestran en la Tabla 10 y se le realizó un análisis estadístico diferencial por los métodos de Anova y Tukey. En la grafica 10 se observa el transcurso de un experimento donde se puede determinar el tiempo de desestabilización de la membrana por el cambio de corriente registrado en la grafica.



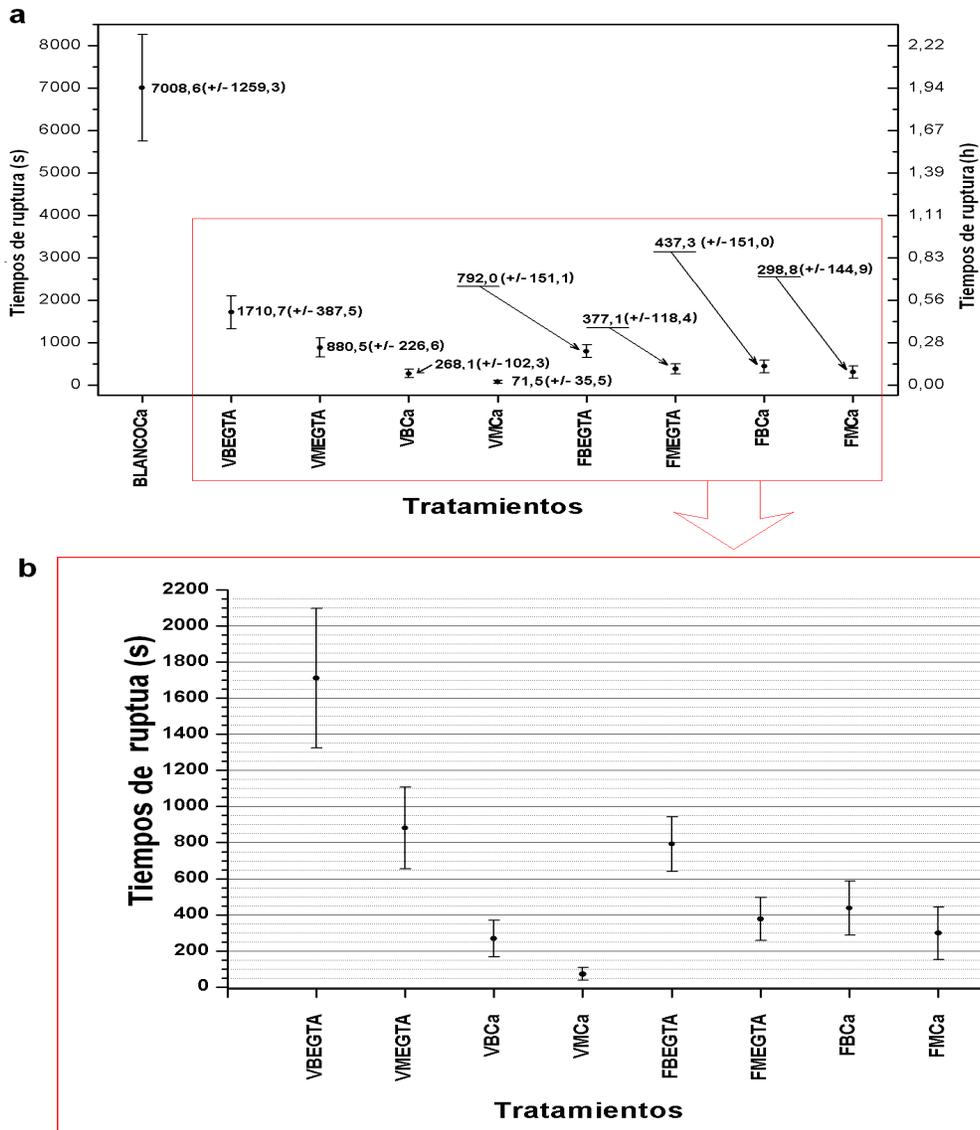
Grafica 10: Registro de corriente para determinar el comportamiento de la bicapa de fosfolípidos en el proceso de ruptura por acción de la enzima con actividad tipo PLA₂. En el eje Y se observa la corriente en nanoamperios y en el eje X el tiempo en milisegundos. La línea negra representa los cambios de estabilidad de la bicapa. Al inicio la línea base se encuentra estable pero a medida que transcurre el tiempo esta se va desestabilizando por acción de las enzimas con actividad tipo PLA₂ hasta que la corriente eléctrica empieza incrementarse lentamente. La bicapa se rompe cuando se alcanza un valor de corriente de 10 nA

Tabla 10. Tiempos de ruptura de membrana en segundos

BEGTA	BCa	VBEGTA	VMEGTA	VBCa	VMCa	FBEGTA	FMEGTA	FBCa	FMCa
14465,4	6205,47	1423,16	819,57	237,95	51,69	552,96	392,85	555,88	113,69
20309,4	7231,88	2179,38	595,89	151,45	83,64	610,09	444,91	503,86	537,26
11425,6	9210,59	2223,26	587,37	328,91	45,43	1076,34	450,93	290,66	191,26
18381,6	5634,28	1419,16	724,31	374,09	94,37	886,97	490,31	680,06	319,12
15061,3	7251,71	2129,83	1239,01	243,34	150,21	692,79	212,88	229,85	211,02
14451,3	7402,68	1649,62	949,36	152,21	94,14	801,51	333,91	424,32	408,65
14487,8	8829,64	1744,15	1075,53	223,67	34,66	737,81	585,54	318,61	167,51
14475,9	5691,84	1074,09	727,86	162,26	43,57	834,51	238,71	511,97	463,43
14454,7	6866,82	1860,06	1142,88	422,42	43,41	847,37	271,97	281,71	392,47
14462,6	5761,35	1405,14	943,81	385,26	73,91	879,78	349,28	576,28	184,06

Tabla 11: Parámetros estadísticos

TRATAMIENTOS	MEDIA ARITMÉTICA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
BLANCOEGTA solución de EGTA 0.05 mM,	15197,560	2443,239
BLANCOCa solución de Calcio 0.2 mM	7008,626	1259,301
VBEGTA Veneno entero de <i>B. asper</i> en solución de EGTA 0.05 mM	1710,785	387,516
VMEGTA Veneno entero de <i>M. mipartitus</i> en solución de EGTA 0.05 mM	880,559	226,689
VBCa Veneno entero de <i>B. asper</i> en solución de Calcio 0.2 mM,	268,156	102,311
VMCa Veneno entero de <i>M. mipartitus</i> en solución de Calcio 0.2 mM	71,503	35,562
FBEGTA fracción de PLA ₂ de <i>B. asper</i> en solución de EGTA 0.05 mM	792,013	151,124
FMEGTA fracción de PLA ₂ de <i>M. mipartitus</i> en solución de EGTA 0.05 mM	377,129	118,496
FBCa fracción de PLA ₂ de <i>B. asper</i> en solución de Calcio 0.2 mM	437,320	151,040
FMCa fracción de PLA ₂ de <i>M. mipartitus</i> en solución de Calcio 0.2 mM	298,847	144,974



Gráfica 11: (a) Tiempos de duración de ruptura de la bicapa por la acción del veneno de las serpientes *M. mipartitus* y *B. asper* (eje izquierdo en segundos y derecho en horas). **(b)** Ampliación de los tratamientos excluyendo el blanco, donde se observa que las diferentes muestras ejercen una acción diferente sobre la bicapa de fosfolípidos. BLANCO-Ca: solución salina con CaCl_2 sin veneno o enzima, VB-EGTA: veneno entero de *B. asper* en solución de EGTA 0.05 mM, VM-EGTA: veneno entero de *M. mipartitus* en solución de EGTA 0.05 mM, VB-Ca: veneno entero de *B. asper* en solución de calcio 0.2 mM, VM-Ca: veneno entero de *M. mipartitus* en solución de calcio 0.2 mM, FB-EGTA: fracción de PLA_2 de *B. asper* en solución de EGTA 0.05 mM, FM-EGTA: fracción de PLA_2 de *M. mipartitus* en solución de EGTA 0.05 mM, FB-Ca: fracción de PLA_2 de *B. asper* en solución de calcio 0.2 mM, FM-Ca: fracción de PLA_2 de *M. mipartitus* en solución de calcio 0.2 mM..

Como se mencionó en la metodología, todos los experimentos se controló el pH a 7.2, la temperatura de experimentación fue de 20 °C, para la elaboración de la membrana se empleó una mezcla de los siguientes fosfolípidos. Fosfatidilcolina (PC): Fosfatidiletanolamina (PE): Fosfatidilserina (PS), las concentraciones siempre se mantuvieron en las proporciones (3:2:1) respectivamente. Siendo las mejores proporciones que simulan las características de una membrana biológica. Previamente a cada experimento se lavó la cámara tres veces con cada uno de los solventes orgánicos de grado analítico como son cloroformo, metanol, etanol y finalmente con agua desionizada, para asegurar la limpieza de la cámara y la partición. Una vez realizada la limpieza, se deposita solución salina a cada lado de la membrana, se aplicaba una diferencia de potencial de -70 mV (mas negativo el interior con respecto al exterior para simular el potencial de reposo de una célula excitable) y se media los cambios de potencial de la membrana. Finalmente cuando se rompía la membrana, se iniciaba nuevamente el proceso de lavado.

Las corrientes medidas, mostraban una línea de base estable y cercana a cero (como debía esperarse), que solo se alteraban en el momento de la ruptura de la membrana artificial. Al comparar los tiempos de duración de las dos membranas con soluciones salinas en presencia de calcio 0.2 mM (BLANCOCa) y en ausencia de calcio (BLONCOEGTA), se puede evidenciar que una membrana es mas estable sin el calcio presente en las vecindades lipídicas, ya que en los diez experimentos, 9 experimentos tuvieron duraciones mayores a 12000 segundos (s) y la membrana que menos duró presento un tiempo de 11425 s que en horas representa 3 horas y 10 minutos) ver tabla 10. Las membranas que duraban más de 12000 s fueron destruidas intencionalmente y de forma manual (se rompieron intencionalmente por sus largos periodos de duración por enzima de 3 h), por tanto se toma como referencia que los valores de duración de estas membranas son mayores a 12000 segundos y por este motivo no se tienen en cuenta para el análisis estadístico ya que no presentaron una distribución normal.

El tratamiento consistente en exponer membranas a la solución con calcio 0.2 mM presentó un promedio de duración de 7008.6 s (\pm 1259.3 s) (ver tablas 11 donde se indica el promedio de los tratamientos y su respectiva desviación estándar) que es prácticamente la mitad de la duración del valor más bajo que presentó uno de los experimentos de membranas en ausencia de calcio. La única explicación que se le puede dar a este proceso de reducción de la estabilidad de las membranas en presencia de calcio, puede estar atribuida al aumento en la dinámica de las membranas en su reorganización de los fosfolípidos por especies moleculares, ya que se ha reportado que en presencia de calcio, las membranas sufren transiciones de fase lateral que inducen reagrupamientos de fosfolípidos de un mismo tipo y carga, los cuales forman islotes que en algunas publicaciones son nombrados como “rafts” lipídicos ^[48]. Estas transiciones pueden presentarse por otros cambios en el ambiente salino que está en contacto con la membrana lipídica como es el pH, la temperatura, o la concentración de iones divalentes, especialmente el calcio, pero a excepción de la concentración de calcio las otras variables se mantuvieron constantes.

Como se puede observar en la gráfica 11 (a y b) y Tabla 11, al promediar los valores de las membranas con solo calcio 0.2 mM en el ambiente salino (correspondiente al tratamiento con nombre BLANCOCa) la media presenta un valor de 7008.6 s (\pm 1259.3 s), mientras los otros tratamientos en los cuales están presentes los venenos de las dos especies de serpientes o las fracciones tipo fosfolipasa de cada una, presentaron en promedio duraciones menores a 1710.7 s (\pm 387.5 s) como es el caso de las membranas expuestas al tratamiento (VBEGTA) con veneno entero de *Bothrops asper* en un ambiente sin calcio (quelado con EGTA). Las membranas que presentaron más inestabilidad fueron las del tratamiento (VMCa) de membranas expuestas al veneno entero de *Micrurus mipartitus* en presencia de calcio 0.2 mM, cuyo valor promedio fue de 71,5 s (\pm 35,5 s).

Tabla 12. Determinación de la distribución normal por el método de Shapiro Wilk para cada uno de los tratamientos realizados por la técnica de bicapas

[25/01/2007 16:06 "/Data1" (2454125)]

Normality Test (Shapiro-Wilk)

Dataset	N	W	P Value	Decision
DATA1_BLANCOCA	10	0,90050	0,21169	Normal at 0,05 level
DATA1_VBEGTA	10	0,93758	0,50989	Normal at 0,05 level
DATA1_VMEGTA	10	0,94922	0,64363	Normal at 0,05 level
DATA1_VBCA	10	0,90189	0,21926	Normal at 0,05 level
DATA1_VMCA	10	0,86942	0,09412	Normal at 0,05 level
DATA1_FBEGTA	10	0,96797	0,86180	Normal at 0,05 level
DATA1_FMEGTA	10	0,97309	0,91076	Normal at 0,05 level
DATA1_FBCA	10	0,94173	0,55593	Normal at 0,05 level
DATA1_FMCA	10	0,92494	0,38469	Normal at 0,05 level

Tabla 13. Análisis paramétrico de cada uno de los tratamientos realizados por la técnica de bicapas para determinar si estos son estadísticamente diferentes

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Data1_BLANCOCa	10	7008,626	1259,30168	398,22616
Data1_UBEGTA	10	1710,785	387,51641	122,54345
Data1_UMEGTA	10	880,559	226,68971	71,68558
Data1_UBCa	10	268,156	102,31148	32,35373
Data1_UMCa	10	71,503	35,56287	11,24597
Data1_FBEGTA	10	792,013	151,1246	47,78979
Data1_FMEGTA	10	377,129	118,49637	37,47184
Data1_FBCa	10	437,32	151,04001	47,76304
Data1_FMCa	10	298,847	144,97448	45,84496

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal
Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	8	383609245	47951155,6	229,57282	0
Error	81	16918568,8	208871,219		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Tabla 14. Comparación por el método de Tukey de los tratamientos realizados por la técnica de bicapas para ver la diferencias significativas entre cada uno de ellos

Means Comparison using Tukey Test					
Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals		Signific at 0,05 Level
			Lower Limit	Upper Limit	
Data1_BLANCOca	7008,626				
Data1_UBEGTA	1710,785	5297,841	4646,41574	5949,26626	Yes
Data1_UMEGTA	880,559	6128,067	5476,64174	6779,49226	Yes
Data1_UBCa	268,156	6740,47	6089,04474	7391,89526	Yes
Data1_UMCa	71,503	6937,123	6285,69774	7588,54826	Yes
Data1_FBEGTA	792,013	6216,613	5565,18774	6868,03826	Yes
Data1_FMEGTA	377,129	6631,497	5980,07174	7282,92226	Yes
Data1_FBCa	437,32	6571,306	5919,88074	7222,73126	Yes
Data1_FMCa	298,847	6709,779	6058,35374	7361,20426	Yes
Data1_UBEGTA	1710,785				
Data1_UMEGTA	880,559	830,226	178,80074	1481,65126	Yes
Data1_UBCa	268,156	1442,629	791,20374	2094,05426	Yes
Data1_UMCa	71,503	1639,282	987,85674	2290,70726	Yes
Data1_FBEGTA	792,013	918,772	267,34674	1570,19726	Yes
Data1_FMEGTA	377,129	1333,656	682,23074	1985,08126	Yes
Data1_FBCa	437,32	1273,465	622,03974	1924,89026	Yes
Data1_FMCa	298,847	1411,938	760,51274	2063,36326	Yes
Data1_UMEGTA	880,559				
Data1_UBCa	268,156	612,403	-39,02226	1263,82826	No
Data1_UMCa	71,503	809,056	157,63074	1460,48126	Yes
Data1_FBEGTA	792,013	88,546	-562,87926	739,97126	No
Data1_FMEGTA	377,129	503,43	-147,99526	1154,85526	No
Data1_FBCa	437,32	443,239	-208,18626	1094,66426	No
Data1_FMCa	298,847	581,712	-69,71326	1233,13726	No

Data1_UBCa	268,156				
Data1_UMCa	71,503	196,653	-454,77226	848,07826	No
Data1_FBEGTA	792,013	-523,857	-1175,28226	127,56826	No
Data1_FMEGTA	377,129	-108,973	-760,39826	542,45226	No
Data1_FBCa	437,32	-169,164	-820,58926	482,26126	No
Data1_FMCa	298,847	-30,691	-682,11626	620,73426	No
Data1_UMCa	71,503				
Data1_FBEGTA	792,013	-720,51	-1371,93526	-69,08474	Yes
Data1_FMEGTA	377,129	-305,626	-957,05126	345,79926	No
Data1_FBCa	437,32	-365,817	-1017,24226	285,60826	No
Data1_FMCa	298,847	-227,344	-878,76926	424,08126	No
Data1_FBEGTA	792,013				
Data1_FMEGTA	377,129	414,884	-236,54126	1066,30926	No
Data1_FBCa	437,32	354,693	-296,73226	1006,11826	No
Data1_FMCa	298,847	493,166	-158,25926	1144,59126	No
Data1_FMEGTA	377,129				
Data1_FBCa	437,32	-60,191	-711,61626	591,23426	No
Data1_FMCa	298,847	78,282	-573,14326	729,70726	No
Data1_FBCa	437,32				
Data1_FMCa	298,847	138,473	-512,95226	789,89826	No

Todos los datos de cada tratamiento, se distribuyeron normalmente ($p < 0,05$), esto se determinó mediante una prueba de Shapiro-Wilks, (ver tabla 12). Posteriormente se hizo un análisis de varianza, cuyo resultado dice que uno o más de los tratamientos es diferente ($p < 0,05$), (ver tabla 13). Como era necesario determinar cuales tratamientos son diferentes, entonces se acudió a una prueba estadística de Tukey, soportada en la tabla 14, de la cual se sintetiza a continuación en los párrafos numerados:

1. La duración promedio de las membranas (BLANCOCa) en solución salina con calcio 0,2 mM, que no están expuestas a ningún veneno ni a fracción de veneno es significativamente diferente al resto de tratamientos con veneno esto reafirma lo que se dijo anteriormente, en cuanto que el veneno o las fracciones si presentan un efecto que altera la estabilidad de la membrana y por ende reduce el tiempo de duración de una membrana estable. Comprobando la potencia del veneno y de las fracciones que producen desestabilización de la membrana en corto tiempo en comparación al BLANCOCa

De los tratamientos con veneno entero se puede decir:

2. Las membranas expuestas al veneno entero (VBEGTA) de *Bothrops asper*, en ambiente libre de calcio (quelado con EGTA), presentan duraciones mayores y significativamente diferentes al resto de tratamientos en los cuales esta presente el veneno (VMEGTA, VBCa, VMCa) o en los que están presentes las fracciones con actividad tipo PLA₂ (FBEGTA, FMEGTA, FBCa, FMCa). Si se compara este tratamiento con los experimentos de membranas solas, con (BLANCOCa) y sin calcio (BLANCOEGTA) donde este es mucho menor, se puede deducir que este tratamiento es menos potente que los otros tratamientos con veneno o enzima. (ver grafica 11)

3. Los tiempos promedio de las membranas en ambiente salino sin calcio, expuestas a veneno entero de *Micrurus mipartitus* (VMEGTA), no se diferencia con los tiempos de duración del resto de tratamientos (VBCa, FBEGTA, FMEGTA, FBCa, FMCa), sin embargo, si se presenta una diferencia significativa con el mismo veneno de *Micrurus mipartitus*, en presencia de calcio 0.2 mM (VMCa), lo que dice que el veneno se potencia en presencia del ion.
4. El veneno de *Bothrops asper* (VBCa) con calcio presenta la misma potencia que el veneno de *Micrurus mipartitus* con calcio (VMCa) y que las fracciones de veneno de ambas especies con (FBCa, FMCa) y sin calcio (FBEGTA, FMEGTA).
5. Es posible observar tanto en la grafica 11 como en el análisis de Tukey, la diferencia entre la potencia de el veneno entero de *Micrurus* en presencia de calcio (VMCa) y cuando esta ausente este ion por efecto de la solución (VMEGTA). Sin embargo no se observan diferencias en la actividad de la fracción de veneno de *Micrurus* en presencia de calcio (FMCa) y en ausencia de calcio (FMEGTA). Este resultado se puede expresar de dos maneras, una de ellas seria que la fracción es insensible al calcio, y lo otra es que la fracción requiera para aumentar su actividad desestabilizante de membrana, la presencia de uno o mas cofactores presentes en el veneno entero tales como (no abordas en este estudio)
6. En la grafica 11 se puede observar que las medias para los experimentos de las fracciones con calcio tanto de *Micrurus* (FMCa) como las de *Bothrops* (FBCa) presentaron aparentemente tiempos menores de ruptura de la membrana, comparadas con la fracción de cada especie pero en ausencia de este ion. En esta misma grafica 11 se puede verificar que la

diferencia de las medias de los experimentos con (FMCa) y sin calcio (FMEGTA) para *Micrurus*, son más pequeños que la diferencia de las medias que se observan para los experimentos con las fracciones de *Bothrops* con calcio (FBCa) y sin calcio (FBEGTA). No obstante la prueba estadística de Tukey dice que estas diferencias no son significativas al nivel de 0.05, ya que el veneno entero de *Micrurus mipartitus* en presencia de calcio (VMCa), no se diferencia de la potencia de la fracción del mismo veneno en ausencia (FMEGTA) o presencia de calcio (FMCa). Evidenciando en cierta forma la insensibilidad de la fracción con actividad tipo PLA₂ al calcio para ejercer su efecto desestabilizante. La misma insensibilidad al calcio se puede deducir al comparar estadísticamente los experimentos de membranas expuestas a la fracción de *Bothrops asper* con calcio (VBCa), con los experimentos con la fracción de *Bothrops* sin calcio (FBEGTA).

7. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre las fracciones con actividad tipo PLA₂ para las dos especies analizadas tanto en presencia de calcio como en ausencia de este, lo cual muestra que estas fracciones no presentaron una dependencia a este ion. Para aumentar su acción desestabilizante. Una de las razones por la cual se puede explicar esto es que teóricamente se ha reportado que la fosfolipasa A₂ según su composición de aminoácidos se divide en dos clases una de ellas presenta aspartato en el residuo 49 (Asp49) y la otra presenta una lisina en el mismo residuo (Lis49). El residuo de la posición 49 tiene implicaciones determinantes en la acción enzimática, debido a que el aspartato tiene afinidad por el calcio, cuya unión es requisito para estabilizar el intermediario tetraédrico que favorece la reacción. La sustitución por lisina elimina la afinidad por el calcio, por lo cual se pierde la actividad enzimática de la proteína. Este grupo de fosfolipasas tipo Lis49 pese a no tener

actividad enzimática, aun poseen una gran actividad miotóxica, lo cual sugiere que la actividad de hidrólisis de fosfolípidos no es estrictamente necesaria para desestabilizar la membrana plasmática de las fibras musculares, indicando que otras regiones diferentes del sitio catalítico serían las responsables del efecto miotóxico. Por tal motivo se cree que la fracción con actividad tipo PLA₂ para los dos venenos esta constituida por la PLA₂ que contiene lisina

8. CONCLUSIONES

La metodología (adaptación de otras metodologías citadas por otros autores) de separación de proteínas, empleando columnas con matrices de tipo G75, G25, DEAE- celulosa y HPLC, permitieron el aislamiento de fracciones proteicas, tanto del veneno entero de *Bothrops Asper* como del veneno entero de *Micrurus mipartitus*.

Los análisis hechos a partir de los resultados con el sistema de bicapas, confirman la capacidad tipo PLA₂ que presentan tanto el veneno de *Micrurus mipartitus* como su fracción activa. Esta actividad es comparable con la actividad de la PLA₂ de *Bothrops* (o del veneno entero). Estos resultados son concordantes con las pruebas de hemólisis hechas inicialmente y representan la primera evidencia in vitro de potencia y actividad de PLA₂ aislada del veneno *Micrurus mipartitus*.

Tanto los venenos enteros de cada especie, como las fracciones de cada veneno, lograron desestabilizar y romper las membranas artificiales. La estandarización de este tipo de experimento permitió comparar la potencia de cada veneno o fracción, empleando pruebas estadísticas de carácter paramétrico.

Con base en los resultados obtenidos por la técnica de bicapas se pudo determinar que el veneno entero de la serpiente *Micrurus* es mas potente que el veneno entero de la serpiente *Bothrops* tanto en presencia como en ausencia de calcio. Evidenciando que la actividad desestabilizante de membrana de esta especie es mas eficaz.

Empleando la técnica de bicapas, se pudo verificar el papel del calcio en cuanto a la potenciación tanto del veneno entero de Bothrops como el Micrurus. Sin embargo el calcio deja de jugar un papel protagónico cuando los experimentos son hechos solo con las fracciones tipo PLA₂ aisladas de cada veneno, dejando entrever que aunque la fracción PLA₂ depende del ion divalente, también es necesaria la presencia de otros cofactores químicos presentes en el veneno entero para que la fracción pueda realizar su función de ruptura de membrana

Los procesos de separación por columna tanto de exclusión molecular como la de intercambio iónico permitieron mejorar el proceso de purificación por HPLC de la enzima con actividad tipo PLA₂ ya que se redujo en forma considerable el número de bandas en comparación con el veneno entero facilitando el proceso de colecta de esta fracción para las demás pruebas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Saldarriaga M.M., Otero R., Núñez V., Toro M.F., Díaz A. y Gutiérrez J.M. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* (42): Pp. 405–411.
2. Ogawa, T, Nakashima, K.I., Nobuhisa, I., Deshimaru M., Shimohigashi Y., Fukumaki Y. Sakaki, Y. Hattori, S. and Ohno, M. (1996). Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂, isozymes for acquisition of diverse physiological functions. *Toxicon* (34): Pp. 1229-1236.
3. Ohno, M., Chijiwaa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa T., Hattori S. (2003) Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. *Toxicon* (42): Pp. 841–854.
4. Chioato, L., Ward, R.J. (2003). Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon* (42): Pp. 869–883.
5. Francischetti, I.M., Gombarovits M.E., Valenzuela J.G., Carlini C.R. and Guimaraes J.A. (2000). Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comparative Biochemical Physiology* (127C): Pp. 23-36.
6. Warrell DA (1992) The global problem of snake bite: its prevention and treatment. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK, editors. *Recent advances in toxinology research*. Singapore: National University of Singapore.
7. Swaroop S, Grab B (1954) Snakebite mortality in the world. *Bull WHO* 10: 35-76.
8. Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E (2003) Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41: 541-557.
9. Chippaux JP (1998) Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull WHO* 76: 515-524.
10. Gutiérrez JM, Rucavado A (2000) Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850.

11. Gutiérrez JM, Ownby CL (2003) Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42: 915-931.
12. Warrell DA (1996) Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bon C, Goyffon M, editors. *Envenomings and their treatments*. Lyon: Foundation Marcel Mérieux.
13. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Citado 20/09/05. redactado 2004. Accidentes ofídicos
URL <http://www.ins.gov.co/ver_noticias.php?seccion=8&id=3>
14. OWNBY C, COLBERG T and WHITE S. (1996). Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A₂ myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus durissus viridis*). Received 20 November. *Toxicon*. Vol. 35. No. 1, Pp. 111
15. MORA, R. VALVERDE, B. AZ, D. LOMONTE. B, MARIA. J, (2005) A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line *Toxicon* V: 45 Pp 650-610
16. OTERO, R. R.G. OSORIO, R. VALDERRAMA y C. GIRALDO. (1992). Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). *Toxicon* Pp. 30, 611-620.
17. SIGALA R, J.J. y J.P. VASQUEZ. (1996). Serpientes venenosas de Aguas Calientes. Cuaderno de trabajo. *Agricultura y Recursos naturales*. No 56. Pp. 20
18. RUEDA, J.V. (1999). Anfibios y reptiles amenazados de extinción en Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 23(suplemento especial): Pp. 475-498.
19. ALFAGEME. MICHAVILLA. BARRANCO. RUIZ F (2004) principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. Capítulo 10. 12. Intoxicaciones y picaduras de animales
20. AYERBE, S (2002) Ofidismo en Colombia. Enfoque, diagnóstico y tratamiento. En Ordoñez, CA, M. Ferrada y R Buitrago. (Eds). 2002. *Cuidado intensivo y trauma*. Capítulo 52. Pp 757-768.

21. SANCHEZ E.F. FREYTAS T. V, FERREIRA- ALVEZ D.L, VELARDE D.T, DINIZ M.R, CORDEIRO M.N, AGOSTINI – COTTA G. y DINIZ. C. R (1992) Biological activities of venoms from south American Snakes. *Toxicon* 30, Pp 95-103.
22. Da SILVA Jr. N. J. y. AIRD. S (2000). prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms *Comparative. Biochemistry. Physiol. Part C* 1288(2000), Pp 424-458.
23. FÁTIMA PEREIRA, C., FERNÁNDEZ, C., PAVAN, Z., & S. ZAMUNER .(2005) Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100 (Suppl. I): Pp. 181-184*
24. OHSAKA, A., (1979). Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. *Snake venoms, Springer, Berlin, Pp. 480-546.*
25. GREENE, H. W. (1997). *Snakes: the evolution of mystery in nature.* London, University of California Press, Ltd. Pp. 78,89,90.
26. MEBS, D., OWNBY, C.L., (1990). Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmac. Ther.* Pp.48, 223–236.
27. SEÑO,(1999) manejo de inventarios y tratamientos del accidente ofídico. *Memorias del curso taller, Pp 2-41*
28. PINTO A, ANGULO Y, JIMÉNEZ R.Y LOMONTE B (2003) Aislamiento del bothrasperin, un disintegrin con actividad inhibitoria de la agregación potente de la plaqueta, del veneno del asper de Bothrops de la serpiente *Revista de Biología Tropical v.51*
29. ROJAS G. (1999). Los agricultores y los menores de edad son las principales víctimas de las mordeduras de serpientes en nuestro país, director del Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica (UCR). www.odi.ucr.ac.cr/crisol/agriyserp.html
30. LIZANO, S., G. DOMONT & J. PERALES. (2003). Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* 42: Pp. 963-977.

31. IANZER D, KONNO k, MARQUES-PORTO R, PORTARO V, (2004) Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography Center for Applied Toxinology CAT-CEPID, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Sao Paulo, SP 05503-900, Brazil. Pp. 1085–1092
32. OWNBY C, COLBERG T and WHITE S. (1996). isolation, characterization and crystallization of a phospholipase a, myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). Received 20 November. *J. Biol. Chem.* Vol. 35. No. 1, Pp. 111
33. DIAZ, C., LEON, G., RUCAVADO, A., ROJAS, NORMAN., SCHROIT, A., & GUTIERREZ, J. (2001). Modulation of the Susceptibility of Human Erythrocytes to Snake Venom Myotoxic Phospholipases A₂: Role of Negatively Charged Phospholipids as Potential Membrane Binding Sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 391 (1): Pp. 56-64.
34. CASTRO O, GUTIÉRREZ J.M, BARRIOS M, CASTRO I, ROMERO M Y UMAÑA E set. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*. v.47 n.3 San José
35. RONG Z, QIANG X, XIAO-XIA S, KE-YI W AND QI-CHANG X. (1999) Characterization and analysis of a novel glycoprotein from snake venom using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and Edman degradation Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, China *Eur. J. Biochem* Pp. 266, 352-358
36. Erlich B.E. (1992) incorporation of ion channels in planar lipid bilayers: how to make bilayers work for you. In the heart and cardiovascular system, Second Edition. Raven Press Ltda, new York. Pp. 551-560
37. Hanke w, Schlue W.r (1993) planar Bilayers, methods and Applications. *Biological Techniques Series*. Academic Press, Londres. Pp. 1-92
38. HILLE B. (1991) *Ionic Channels of Excitable Membrane*. Sinauer Associates Inc. Sunderland. Pp. 58-71, 423-444, 472-502
39. AVERS, J. (1991). *Biología Celular*. Primera edición. México D.F., Grupo Editorial Iberoamericana. Pp. 748 - 758.

40. DIAZ, E., CASTAÑO, S., MATA LLANA, E. (1997). Corrientes eléctricas producidas por veneno de *Bothrops atrox* en membranas lipídicas. *Revista Colombiana de Física*.
41. CASTAÑO S. (1998). estudio comparativa de los canales iónicos producidos por venenos de algunos crotalidos (serpentes: viperidae) en membranas bilipídicas planas. Tesis de pregrado. Cali Colombia, Universidad del Valle, facultad de Ciencias. Pp. 1-20
42. ALVAREZ O. (1986) How to set up a bilayer system. In *Ion Channel reconstitution by Miller C.*. Plenum Press, New York Pp. 115-130.
43. DIAZ E, SANDBOM J. (1982) Displacement currents in lipid bilayer membranes. *Upsala Journal of Medical Sciences*. V.87: Pp. 33-42.
44. Vidal, J. C. y Stoppani, A O (1971). Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (145): Pp. 543-556.
45. HARRIS v, ANGALS S (1998). *Protein Purification. Methods a practical approach*. Ed. IRL Press Pp. 10-50
46. OWNBY C, COLBERG T and WHITE S. (1996). isolation, characterization and crystallization of a phospholipase a, myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). Received 20 November. *i-owon*. Vol. 35. No. 1, Pp. 1-11.
47. WONDERLIN W. FINKEL A, FRENCH R, (1990) Optimizing planar lipid bilayer single-channel recording for high resolution with rapid voltage. *Biophysical Journal*. V 58: Pp. 289-297.
48. LABARCA P, LATORRE R. (1992) Insertion of Ion channels into planar bilayers by vesicle fusion. En *Methods in Enzymology*, vol. 20.. Academic press, Inc , New York Pp. 447-463.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Migración electroforética.

Para poder entender la teoría de electroforesis se analizará el desplazamiento de una partícula cargada aislada en un campo eléctrico. En el momento que se aplica el campo eléctrico, E (volts/cm), la acción de la fuerza eléctrica (F_e) hará que la partícula se acelere. Esta fuerza depende de la fuerza del campo y de la carga (q) de la partícula: **$F_e = qE$**

Tan pronto como la partícula empieza a moverse por la acción de la fuerza eléctrica, se manifiesta una fuerza que se opone al movimiento, F_v , generada por la fricción del medio. **$F_v = -fv$**

f = coeficiente de fricción; v = velocidad de la partícula. Si se asume que la partícula es esférica se puede aplicar la Ley de Stokes y entonces el coeficiente de fricción se define como: **$f = 6\pi\eta r$** siendo r el radio de la partícula y η la viscosidad del medio. Entonces: **$F_v = 6\pi\eta r v$**

Debido a que la fuerza de fricción o fuerza viscosa es proporcional a la velocidad de migración de la partícula ésta se acelerará hasta que la fuerza viscosa se iguale con la fuerza eléctrica. A partir de ese momento la fuerza neta sobre la partícula será nula y se alcanzará un estado estacionario en el que la partícula moverá a velocidad constante. **$6\pi\eta r v = qE$**

Rearreglando esta ecuación se puede definir la movilidad electroforética (μ) como:
 $v/E = q / 6\pi\eta r = \mu$

Dado que la viscosidad está dada por el medio, la movilidad electroforética depende de la relación q/r que presente cada partícula. Partículas con diferente relación q/r podrán moverse con diferente velocidad durante la corrida electroforética y, si esta diferencia es suficiente, se separarán.

ANEXO 2. Parámetros a variar para optimizar la separación electroforética.

Dependientes del campo eléctrico

a. Voltaje

El gradiente de potencial es V/d si la separación de los electrodos es d (cm) y la diferencia de potencial entre ellos es V (volts). La fuerza sobre un ión que tiene una carga q es por tanto Vq/d y por tanto la velocidad de migración es proporcional a Vq/d . Un aumento en el gradiente de potencial aumenta proporcionalmente la velocidad de migración.

b. Corriente

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos, se genera una corriente (medida en Coulombs segundos o Ampere). La magnitud de ésta corriente está determinada por la resistencia del medio y es proporcional al voltaje. La corriente es conducida en la solución entre los electrodos, principalmente, por los iones del buffer y en una pequeña proporción por los iones de la muestra. El aumento del voltaje aumentara la carga total / segundo Que converge al electrodo. La distancia migrada por los iones será proporcional a la corriente aplicada y al tiempo.

2. Dependientes de la muestra

Carga. La velocidad de migración aumenta al aumentar la carga neta. La magnitud de la carga es en general dependiente del pH y por tanto dependiente del sistema de buffers utilizado.

2. Dependientes del soporte

Tamiz molecular Este efecto se presenta en geles de almidón, agarosa y poliacrilamida. El movimiento de las moléculas es frenado al tener que pasar a través de los poros. Dependiendo del radio de las proteínas a separar se debe seleccionar el tipo de gel y tamaño de poro adecuado para que exista un efecto tamiz del soporte.

ANEXO 3. Parámetros para la preparación de geles de poliacrilamida [42].

TABLE A8-9 Solutions for Preparing Resolving Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

↓ COMPONENTS / GEL VOLUME ⇒	VOLUME (ml) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUMES AND CONCENTRATIONS							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6% gel								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix <!>	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <!>	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% gel								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix <!>	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <!>	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% gel								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix <!>	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <!>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% gel								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix <!>	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <!>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% gel								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix <!>	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <!>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Modified from Harlow and Lane (1988).

TABLE A8-10 Solutions for Preparing 5% Stacking Gels for Tris-glycine SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis

↓ COMPONENTS / GEL VOLUME ⇒	VOLUME (ml) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUMES							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix <!>	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate <!>	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED <!>	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Modified from Harlow and Lane (1988).