

## Carbohidratos del veneno de *Bothrops asper* de Costa Rica. Estudio cuantitativo\*

por

F. Aragón\*\*, R. Bolaños\*\*\* y Orietta Vargas\*\*\*

(Recibido para su publicación el 22 de marzo de 1977)

**Abstract:** The venom of the Central American *Bothrops asper*, previously classified as *B. atrox*, is very rich in carbohydrates, both in the free state and forming a part of glycoproteins. It also contains neutral sugars (hexoses), methylpentoses, hexosamines and sialic acid. There is a significant difference in the quantity of carbohydrates in the venom of *B. asper* as compared to that of the South American *B. atrox*, thus further documenting the different taxonomic position of these two species.

A pesar del intenso estudio que se ha hecho de la porción carbohidrato de innumerables proteínas tales como glicoproteínas del suero humano (Winzler, 1955), inmunoglobulinas (Davie & Osterland, 1964), enzimas (Omori, Iwanaga & Suzuki, 1964), hormonas (Spiro, 1965), es muy poca la atención que se ha puesto a esta porción en los venenos de serpientes y al papel que pudiera jugar en sus propiedades.

Nuestras observaciones muestran que de 12 fracciones electroforéticas del veneno de *Bothrops asper* en acetato de celulosa, no menos de 8 corresponden a glicoproteínas a juzgar por su coloración con el reactivo de Schiff.

En una reciente revisión bibliográfica sobre animales venenosos y sus venenos, que incluye extensas discusiones sobre la estructura química y bioquímica de venenos de ofidios procedentes de todos los continentes (Bücherl, Buckley & Deulofeu, 1968; Bücherl & Buckley, 1971), no se hace mención de la presencia de carbohidratos con relación a las proteínas constitutivas de estos venenos, ni tampoco a su posible papel en la toxicidad.

---

\* Parte de este trabajo fue presentado en la 53 Reunión Anual de la Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos (53rd Annual Meeting of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists). San José, Costa Rica, 24-30 Junio, 1973.

\*\* Ministerio de Salud, Costa Rica

\*\*\* Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica. Las solicitudes de separatas deben dirigirse a R. Bolaños.

La presencia de glicoproteínas en los venenos de las serpientes ha sido estudiada por investigadores de la Universidad de Osaka (**Omori, Iwanaga & Suzuki**, 1964; **Oshima, Iwanaga & Suzuki**, 1968; **Oshima & Iwanaga**, 1969) y en el más reciente de sus trabajos sobre la composición de carbohidratos en 15 venenos de diversa procedencia, éstos últimos encontraron en algunos de ellos galactosa, manosa, fucosa, glucosamina, ácido siálico y otros azúcares no identificados. Demostraron también una cierta correlación entre la cantidad total de carbohidratos y el grupo taxonómico al que pertenece la serpiente. En ese estudio se analizaron los venenos de seis especies de este continente, sin embargo ninguna pertenece a la fauna costarricense.

En el presente trabajo se presenta el análisis cuantitativo de los carbohidratos relacionados con las proteínas del veneno de *Bothrops asper*\*

### MATERIAL Y METODOS

**Veneno:** El veneno (lote No. 28) se obtuvo de la colección del Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica) y está constituido por la mezcla liofilizada de los venenos de un gran número de especímenes capturados en diferentes localidades del país, para disminuir así fluctuaciones atribuibles a diferente origen geográfico. Este veneno presenta una dosis letal 50% para el ratón blanco de 16 a 18 g de peso de  $18,8 \pm 3,2 \mu\text{g}$  por la vía endovenosa y  $62,5 \pm 7,5$  por la intraperitoneal (**Bolaños**, 1972).

**Análisis químico:** El ácido siálico fue determinado mediante el método del ácido 2-tiobarbitúrico de **Warren** (1959). La reacción se practicó tanto en veneno crudo para ácido siálico libre, como en hidrolizado en ácido sulfúrico 0,1N a 80 °C por una hora para ácido siálico total. El producto de la reacción fue identificado mediante el espectro de absorción entre 450 y 600  $\mu\text{m}$  y las concentraciones fueron calculadas mediante el empleo de coeficientes de extinción del ácido N-acetilneuramínico y de la 2-desoxirribosa a 549 y 532  $\mu\text{m}$ , respectivamente (**Warren**, 1959). La concentración de ácido siálico unido a la proteína se determinó por la diferencia entre el ácido siálico total y el ácido siálico libre.

Las hexosaminas fueron determinadas tanto en el veneno total como en una porción desnaturalizada con alcohol etílico y redisolto en NaOH 0,1N según técnica de **Winzler** (1955). Ambas muestras, en cantidad de 10 mg, se sometieron a hidrólisis ácida en HCl por 4 horas y se fraccionaron en columnas de intercambio iónico Dowex 50 W-X 8 (200-400 mallas) utilizando HCl 0,5N como eluyente según técnica de **Boas** (1953). La concentración de hexosaminas se investigó en los eluidos mediante la reacción de Elson Morgan modificada por **Boas** (1953), identificando el cromóforo mediante su espectro de absorción entre 450-610  $\mu\text{m}$ . La concentración de hexosaminas se calculó a 530  $\mu\text{m}$  usando glucosamina como patrón. Previamente se había demostrado que el tiempo óptimo de hidrólisis es de 4 horas (Cuadro 1).

\*

La serpiente que estamos considerando como *Bothrops asper* fue originalmente clasificada como *B. atrox*, conjuntamente con variedades similares de Sur América. Recientemente **Hoge** (1966) y **Peters & Orejas-Miranda** (1970), con base en diferencias morfológicas, dividieron al grupo *B. atrox* en dos, *B. atrox* de localización únicamente en Sur América y *B. asper* que se encuentra en Centro América y parte de Sur América. Esta clasificación ha sido aceptada por la mayoría de los herpetólogos del Continente Americano (**Savage**, 1973).

## CUADRO 1

*Tiempo de hidrólisis para la liberación máxima de hexosaminas del veneno de Bothrops asper en HCl 2N*

Material fraccionado con resina catiónica	Tiempo de hidrólisis	Absorbancia
10 mg		0,172
10 mg		0,172
	2 h	
10 mg		0,199
10 mg		0,195
	4 h	
10 mg		0,140
10 mg		0,140
	6 h	

Los azúcares neutros fueron determinados tanto en el veneno total como en su porción desnaturalizada con alcohol etílico y rediseuelto en NaOH 0,1N según técnica de **Winzler** (1955). La reacción de orcinol-ácido sulfúrico (**Winzler**, 1955) se practicó en 4 mg de ambos tipos de muestra. Se tomaron lecturas de densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 equipado con Roto-Cell y celda de 10 mm de paso de haz luminoso. La concentración de azúcares neutros se calculó utilizando una curva de calibración preparada con una mezcla de D-galactosa y D-Manosa en relación de 3/1 (**Oshima & Iwanaga**, 1969).

Las metilpentosas fueron determinadas en muestras de 3 y 4 mg, tanto del veneno total como en la porción desnaturalizada con alcohol etílico y rediseuelta en NaOH 0,1N mediante la reacción de ácido sulfúrico-cisteína, según técnica de **Dische** (**Dische & Shettles**, 1948). Las lecturas de densidad óptica se tomaron en un espectrofotómetro Spectronic 20 equipado con Roto-Cell y celda de 10 mm de haz luminoso. La concentración de metilpentosa se determinó a las dos horas de reacción a temperatura ambiente. Su concentración es directamente proporcional a la diferencia de la densidad óptica determinada a 396 nm y 425 nm expresando los resultados como fucosa. La identificación de metilpentosa se confirmó mediante la reducción de un 40% aproximadamente en la densidad óptica entre dos lecturas tomadas a las 2 y 4 horas de reacción a temperatura ambiente, previa dilución con agua destilada de la muestra leída a las 2 horas (**Dische & Shettles**, 1951).

## RESULTADOS

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la cuantificación de ácido siálico, glucosamina, metilpentosa y azúcares neutros unidos, libres y totales y en el Cuadro 3 la identificación de las metilpentosas.

En las Figuras 1 y 2, se ilustran los espectros de los cromóforos del ácido siálico y de la hexosamina en el veneno de *B. asper*, comparado con los obtenidos con patrones conocidos.

## DISCUSION

El estudio del Cuadro 2 y de las Figuras 1 y 2 nos permite asegurar que los carbohidratos presentes en el veneno de *B. asper* son azúcares neutros (hexosas), metilpentosas, hexosaminas y ácido siálico, que se encuentran unidos a la proteína

constituyendo glicoproteínas; también se encuentran en forma libre. Las metilpentosas se presentan formando parte de las glicoproteínas únicamente.

## CUADRO 2

*Contenido de carbohidratos en el veneno de Bothrops asper (porcentaje en base seca)*

Carbohidratos	Unido	Libre	Total
D- galactosa 3/D-manosa 1	1,50	0,13	1,63
Hexosamina (Glucosamina)	2,04	0,04	2,08
Metilpentosa	0,18	0,00	0,18
Acido siálico (Ac-N-acetil neuramínico)	1,05	0,13	1,18

Aunque la absorción máxima a 520 nm para el cromóforo de la reacción de Elson Morgan (Boas, 1953) demuestra la presencia de hexosaminas, no es posible con estos datos demostrar cuál de ellas está presente en el veneno, debido a que los espectros del cromóforo de la glucosamina y de la galactosamina son idénticos (Kabat & Mayer, 1964). Los estudios de Oshima & Iwanaga (1969), con 15 venenos de serpientes de familias distintas procedentes de varios continentes, demuestran que la glucosamina es el amino-azúcar presente en todos ellos, por lo tanto es muy posible que esté presente también en el veneno de *B. asper*; sin embargo esta sugerencia debe confirmarse mediante la demostración específica del azúcar.

La presencia de metilpentosa en el veneno de *B. asper* queda claramente demostrada no sólo mediante la reacción de Dische sino también por la disminución en la absorción aproximadamente en un 40% después de una dilución y reacción a temperatura ambiente por 4 horas (Dische & Shettles, 1951).

Al estudiar en forma global la composición de carbohidratos del veneno de *B. asper* se nota que esta composición no difiere sustancialmente de la que ha sido encontrada por múltiples autores en otras glicoproteínas de origen animal como por ejemplo la del suero humano (Winzler, 1955).

## CUADRO 3

*Identificación de metilpentosas en el veneno de Bothrops asper mediante la destrucción del cromóforo en la reacción de ácido sulfúrico-cristeína previa dilución con agua destilada*

Muestra	Patrón interno µg de fucosa	Lectura a las 2 ½ horas			Lectura a las 4 horas después de diluir			% disminución $\frac{(\Delta 2\frac{1}{2}h - \Delta 4h)}{\Delta 2\frac{1}{2}h} \times 100$
		396	nm 427	Δ	396	nm 427	Δ	
1	0,0	0,30	0,145	0,155	0,12	0,02	0,10	35,4
2	0,0	0,31	0,150	0,160	0,12	0,02	0,10	37,5
3	10	0,53	0,155	0,38	0,24	0,14	0,10	47
4	10	0,56	0,160	0,40	0,29	0,06	0,23	42

Los estudios de **Oshima & Iwanaga** (1969) ponen de manifiesto una correlación entre la posición taxonómica de las serpientes por ellos estudiadas y el contenido de carbohidratos de su veneno y, a su vez, significativas diferencias entre las diferentes especies de una misma familia. Al comparar el contenido de carbohidratos del veneno de *B. asper* encontrado por nosotros con el de *B. atrox* reportado por Oshima e Iwanaga, se notan marcadas diferencias cuantitativas en todas las clases de azúcares (Cuadro 4).

#### CUADRO 4

*Cuadro comparativo del contenido de carbohidratos entre la especie Bothrops atrox y Bothrops asper (Porcentaje en base seca)*

Especie	Carbohidratos neutros	Amino-azúcar	Acido siálico	Carbohidratos totales
<i>Bothrops atrox</i> *	0,60	1,19	0,52	2,23
<i>Bothrops asper</i> **	1,50	2,04	1,05	4,59

\* Según **Oshima & Iwanaga** (1969).

\*\* Este estudio.

Existe una confusión en la literatura con respecto al uso del término *B. atrox* para denominar indistintamente serpientes muy similares tanto de origen centroamericano como sudamericano. Sin embargo, para **Peters & Orejas-Miranda** (1970) y **Hoge** (1966), son especies diferentes, proponiendo diferenciarlas como *B. asper* y *B. atrox*, respectivamente. Es muy posible que los autores que emplean indistintamente el nombre de *B. atrox* ignoran esta nueva clasificación. Las marcadas diferencias de carácter cuantitativo en el contenido de carbohidratos entre el veneno de *B. asper* estudiado por nosotros, y el de *B. atrox*, según **Oshima & Iwanaga**, vienen a aportar un elemento más de juicio en favor de la tesis que ambas serpientes no son iguales y por lo tanto debe emplearse una nomenclatura diferente para denominar a cada una de ellas.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias a los auspicios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y de la Universidad de Costa Rica. Los autores desean expresar su agradecimiento a la señora Hilda Herrera de Solera por su trabajo de mecanografía y al señor Manuel Chavarría por sus excelentes recomendaciones editoriales sobre el manuscrito.

#### RESUMEN

El veneno de la serpiente centroamericana *Bothrops asper*, anteriormente clasificada como *B. atrox*, es altamente rico en carbohidratos, presentándose éstos tanto libres como formando parte de glicoproteínas. En el presente trabajo se demostró la presencia de azúcares neutros (hexosas), metilpentosas, hexosaminas y ácido siálico. Además se puso de manifiesto diferencias significativas en la cantidad

de carbohidratos en el veneno de *B. asper* con relación al de la especie sudamericana, *B. atrox*, aportando así nuevos elementos de juicio para confirmar la diferente posición taxonómica de ambas especies.

#### ADDENDA:

En el transcurso del trabajo de impresión de este estudio tuvimos oportunidad de investigar el contenido de carbohidratos neutros en serpientes de este grupo, procedentes de Costa Rica, Colombia y Venezuela.

Los resultados se muestran a continuación:

Procedencia	Especie	Carbohidratos neutros % en base seca
Costa Rica (Atlántico)	<i>B. asper</i>	1,65
Costa Rica (Pacífico)	<i>B. asper</i>	1,30
Colombia (Armero)	<i>B. atrox</i>	2,00
Colombia (Villavicencio)	<i>B. colombiensis</i>	1,00
Venezuela (Caracas)	<i>B. venezuelae</i>	1,38

Estos datos ponen en duda la veracidad de la tesis antes esbozada sobre el uso del análisis de glicoproteínas en aspectos taxonómicos, dadas las variaciones encontradas aún en una misma región.

#### REFERENCIAS

**Boas, F.N.**

1953. Method for the determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.*, 204: 553-563.

**Bolaños, R.**

1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 21: 360-363.

**Bücherl, W., E. Buckley, & V. Deulofeu**

1968. *Venomous Animals and Their Venoms, Vol. I: Venomous Vertebrates*. Academic Press, New York.

Fig. 1. Espectro de absorción del cromóforo para el ácido siálico

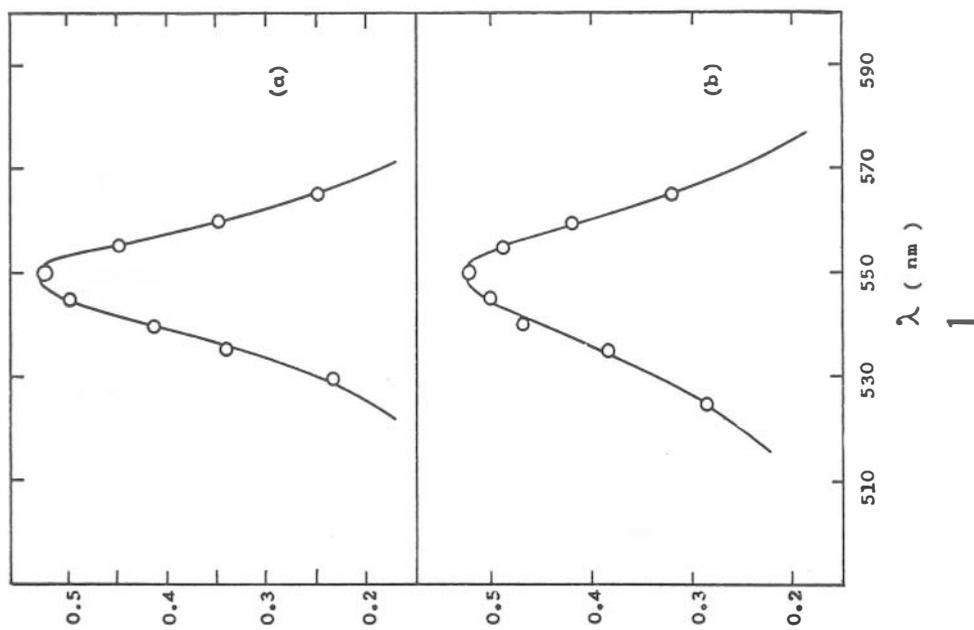
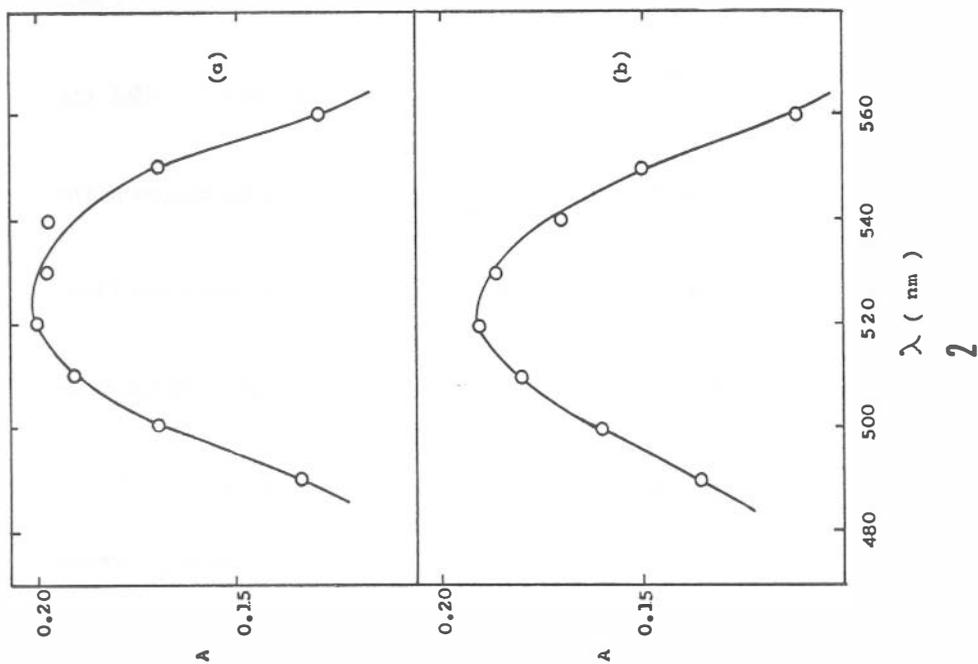
(a) Patrón

(b) Veneno de *B. asper*

Fig. 2. Espectro de absorción del cromóforo para la glucosamina

(a) Patrón

(b) Veneno de *B. asper*



**Bücherl, W., & E. Buckley**

1971. *Venomous Animal and Their Venoms. Vol. II. Venomous Vertebrates*. Academic Press, New York.

**Davie, M. J., & C. K. Osterland**

1964. Chemical characterization of glycopeptides from human M-globulins. *J. Exp. Med.*, 128: 699-713.

**Dische, Z., & L. B. Shettles**

1948. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, 175: 595-603.

**Dische, Z., & L. B. Shettles**

1951. A new spectrophotometric test for the determination of methylpentose. *J. Biol. Chem.*, 192: 579-582.

**Hoge, A.R.**

1966. Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). *Mem. Inst. Butantan*, 32: 109-184.

**Kabat E. A., & M. M. Mayer**

1964. *Experimental Immunochemistry*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.

**Omori, T., S. Iwanaga, & T. Suzuki**

1964. The relationship between the hemorrhagic and lethal activities of Japanese Mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffii*) venom. *Toxicon*, 2: 1-4.

**Oshima, G., S. Iwanaga, & T. Suzuki**

1968. Studies on snake venoms. XIX. Purification and some physicochemical properties of proteinases a and c from the venoms of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *J. Biochem., Tokyo*, 64: 227-238.

**Oshima, G., & S. Iwanaga**

1969. Occurrence of glycoproteins in various snake venoms. *Toxicon*, 7: 235-238.

**Peters, J. A., & B. Orejas-Miranda**

1970. *Catalogue of the Neotropical Squamata. I. Snakes*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.

**Picado, C.**

1931. *Serpientes Venenosas de Costa Rica. Sus Venenos. Seroterapia Antiofídica*. Imprenta Alsina, San José, Costa Rica.

**Sato, T., S. Iwanaga, Y. Mizushima, & T. Suzuki**

1965. Studies on snake venoms. XV. Separation of arginine ester hydrolase of *Agkistrodon halys blomhoffii* venom into three enzymatic entities. Bradykinin releasing, clotting, and permeability increasing. *J. Biochem., Tokyo*, 57: 380-391.

**Savage, J. M.**

1973. *A preliminary handlist of the herpetofauna of Costa Rica*. University Graphics, Los Angeles, California.

**Spiro, R. G.**

1965. The carbohydrate unit of thyroglobulin. *J. Biol. Chem.*, 240: 1603-1608.

**Warren, L.**

1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.*, 234: 1971-1975.

**Winzler, R. J.**

1955. Determination of Serum Glycoprotein, p. 279-311. In D. Glick (ed.), *Methods of Biochemical Analysis*, Vol II.