

ORIGINAL RESEARCH

Comparative enzymatic study of venoms of the rattlesnakes *Crotalus aquilus* and *Crotalus ravus exiguus*

Estudio enzimático comparativo de los venenos de las serpientes de cascabel *Crotalus aquilus* y *Crotalus ravus exiguus*

José Benito Godoy-Godoy¹, Karina Pérez-Guzman¹, Juan Miguel Borja-Jiménez^{1,2}, David Lazcano³, Jesús Morlett¹, Crystel Aleyvick Sierra-Rivera⁴, Ana Cecilia Cepeda-Nieto⁵, Yolanda Garza-García¹, Alejandro Zugasti-Cruz^{1,4*}

¹Facultad de Ciencias Químicas, Posgrado en Biotecnología, UAdeC. Saltillo, Coah. ²F. de Ciencias Biológicas, UJED. Gómez Palacio, Dgo. ³F. de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Herpetología, UANL. Monterrey, N.L. ⁴F. de Ciencias Químicas, Laboratorio de Inmunología, UAdeC. Saltillo, Coah. ⁵F. de Medicina, Laboratorio de Investigación, UAdeC. Saltillo, Coah. *alejandro_zugasti@uadec.edu.mx

ABSTRACT

In this study we compared the phospholipase A₂ and proteolytic activities (on casein), and the presence and molecular weight of proteins in venoms of the mountain rattlesnakes *Crotalus aquilus* and *Crotalus ravus exiguus*, endemic species from Mexico; information about biological activities and their venom composition are scarce. Phospholipase type 2 (PLA₂) and caseinolytic activities produced by total venom from each species were determined by spectrophotometry. Also, separation of snake venom proteins was performed in 11% acrylamide gel under reducing conditions. PLA₂ and caseinolytic activities from *C.r.exiguus* venom were higher than venom from *C. aquilus*. The electrophoretic profile from venom of *C. aquilus* showed bands with a molecular weight of ~14 to ~84 kDa, while *C.r.exiguus* exhibited bands in the range of ~14 to ~70 kDa. This is the first report about the biochemical properties of *C.r.exiguus* venom, and venom properties of *C. aquilus* are scarce.

Keywords: *Crotalus aquilus*, *Crotalus ravus exiguus*, phospholipases A₂, proteolytic activity, rattlesnakes, Viperidae.

RESUMEN

Crotalus ravus exiguus y *Crotalus aquilus* son serpientes de cascabel de montaña endémicas del país, y se conoce muy poco sobre las actividades biológicas y la composición de sus venenos. Se evaluaron cuantitativamente las actividades de fosfolipasas A₂ (PLA₂) y la actividad proteolítica en caseína de los venenos totales por espectrofotometría. Además, las proteínas de los venenos fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE al 11 % en condiciones reductoras. El veneno de *C.r. exiguus* mostró una mayor actividad por PLA₂ y caseinolítica que la del veneno de *C. aquilus*. El perfil electroforético del veneno de *C. aquilus* evidenció bandas con un intervalo de masas

moleculares de ~14 a ~84 kDa, mientras que el veneno de *C.r. exiguus* mostró bandas de ~14 a ~70 kDa. Este es el primer reporte acerca de algunas propiedades bioquímicas del veneno de *C.r. exiguus*; además, del veneno de *C. aquilus* también se conoce muy poca información.

Palabras clave: actividad proteolítica, *Crotalus aquilus*, *Crotalus ravus exiguus*, fosfolipasas A₂, serpientes de cascabel, Viperidae.

1. INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes son mezclas únicas de péptidos y proteínas que actúan en los sistemas vitales de la presa o depredador (Calvete *et al.*, 2009; Ménez *et al.*, 2006). El veneno es de interés para los seres humanos por diversas razones. El conocimiento de las propiedades bioquímicas y biológicas de los venenos de serpientes permite profundizar en los mecanismos de toxicidad causados por sus componentes, y esto se refleja en una mejor atención a las víctimas de envenenamiento (Calvete *et al.*, 2009; Markland, 1998; Walker *et al.*, 2013). Los componentes de los venenos de serpientes son en su mayoría proteínas con o sin actividad catalítica y generalmente tienen una alta especificidad para alterar los tejidos que emiten impulsos eléctricos - muscular, cardíaco y nervioso-, o para destruir otros componentes vitales para el organismo, como son el sistema muscular, circulatorio y sanguíneo (Mackessy, 2008; Ménez *et al.*, 2006). En particular, algunas especies de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* (Viperidae: Crotalinae), son las principales responsables de los accidentes ofídicos en México (de Roodt *et al.*, 2005). Los venenos de los vipéridos poseen un arsenal de proteínas capaces de degradar la matriz extracelular e interferir con la cascada de coagulación, el sistema hemostático y la reparación de tejidos (Doley *et al.*, 2010; Fox & Serrano, 2005; Markland, 1998). Las familias de proteínas presentes en estos venenos incluyen enzimas metaloproteasas dependientes de Zn²⁺, fosfolipasas A₂, (PLA₂) proteasas de serina, L-amino oxidasas y proteínas sin actividad enzimática (desintegrinas, inhibidores de proteasas tipo Kunitz, lectinas específicas de galactosa, lectinas tipo C, entre otras) (Mackessy, 2008). En particular, las actividades toxicológicas de las PLA₂ del veneno de serpientes varían extensamente causando neuro y cardiotoxicidad, hemólisis, alteraciones hemostáticas y mionecrosis (Gutiérrez & Ownby, 2003; Lomonte & Gutiérrez, 2001). De igual manera, la presencia de enzimas proteolíticas del tipo metaloproteasas y proteasas de serina son comunes en venenos de vipéridos, y estas proteínas también actúan ampliamente en los mecanismos de toxicidad, tales como la destrucción de vasos sanguíneos y hemorragias, entre otros efectos (Fox & Serrano, 2005). Hasta la fecha, se disponen de muy pocos datos sobre las características bioquímicas y tóxicas del veneno crudo de la serpiente *Crotalus aquilus* (Rivas-Mercado, 2014), y del veneno de *Crotalus ravus exiguus* no existen antecedentes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención y preparación del veneno

El veneno se obtuvo a partir de serpientes adultas de las especies *Crotalus aquilus* (recolectadas en el estado de Aguascalientes) y *Crotalus ravus exiguus* (recolectadas en el estado de Guerrero). La identificación taxonómica de la serpiente se realizó mediante el estudio de las características morfológicas específicas de cada especie (Campbell & Lamar, 2004). Las actividades anteriores fueron realizadas por el Dr. David Lazcano (Laboratorio de Herpetología de la UANL). El veneno de las serpientes fue obtenido por ordeña de los ejemplares, mediante la colocación de sus colmillos sobre contenedores de plástico de 100 mL estériles cubiertos con papel parafilm. El veneno fue recuperado y liofilizado. La concentración de proteínas se determinó mediante la técnica de Bradford (1976).

2.2. Actividad fosfolipasa A₂

La actividad fosfolipasa se determinó de acuerdo con Seibert *et al.*, (2006) con modificaciones. Los venenos (1 µg in 10 µL de PBS, pH 7.4) fueron añadidos a una mezcla de reacción con 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 7mM de tritón X- 100, L-alfa fosfatidil colina al 0.265% y 99 uM de rojo fenol (pH 8.1). Se midieron los cambios en la absorbancia a 558 nm (Genesys 5, Thermo Spectronic) durante 5-8 minutos a temperatura ambiente. La disminución en la absorbancia del rojo fenol por la acidificación del medio fue proporcional a la liberación de ácidos grasos. La actividad específica fue calculada en unidades (mM) de ácidos grasos /min. Se incluyeron controles negativos, añadiendo solución PBS en lugar de veneno. Los experimentos fueron realizados por duplicado y los valores graficados como promedios con su respectiva desviación estándar. El análisis estadístico fue realizado a través del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnet, utilizando el paquete estadístico SPSS, y las diferencias fueron consideradas significantes con $p < 0.05$.

2.3. Actividad caseinolítica

La actividad caseinolítica cuantitativa se determinó de acuerdo a la técnica de Menezes *et al.*, (2006), con algunas modificaciones. Se prepararon 0.4 mL una solución que contuvo: buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 8.8), CaCl₂ 0.01 M, 0.1 mL de solución de veneno (100 µg/mL) y 0.5 mL de solución de caseína al 2% (solubilizada en el buffer Tris-HCl 0.1 M). La solución resultante se incubó a 37 °C durante 30 min, y la reacción fue detenida adicionando 1 mL de ácido tricloroacético. A continuación, la mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm durante 15 min. Finalmente, se tomó 1 mL del sobrenadante y se midió la absorbancia a 280 nm (Genesys 5, Thermo Spectronic). Se utilizó un blanco en el cual se omitió la solución de veneno. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de veneno que produjo un incremento en la absorbancia de 1.0 por minuto a 280 nm. La actividad específica fue expresada como U/mg de veneno. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, y los valores expresados como promedios con su respectiva desviación estándar. El análisis estadístico fue realizado a

través del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnet, utilizando el paquete estadístico SPSS, y las diferencias fueron consideradas significantes con $p < 0.05$.

2.4. Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras

SDS PAGE fue utilizado para determinar el número y la masa molecular relativa de las proteínas encontradas en los venenos de las especies estudiadas. Los geles de electroforesis se elaboraron de acuerdo al sistema de buffer discontinuo descrito por Laemmli (1970), a una concentración del 11 %. Para la elaboración de la SDS-PAGE se utilizó una cámara para electroforesis vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron 20 µg de proteína de cada veneno por carril disueltos en buffer de muestra 5X reductor (glicerol 10%, SDS 2.5%, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.002%). Las muestras fueron calentadas a 100 °C durante 5 minutos antes de ser cargadas en los geles. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 80 Volts (V) para el gel concentrador y 120 V para el gel separador. La concentración de proteínas fue determinada por la técnica de Bradford (1976), y se utilizó albúmina bovina como estándar. El gel fue colocado en una solución de tinción (metanol 25%, ácido acético 10% y azul de Coomassie R-250 0.2%) durante 8 horas; posteriormente fue colocado en una solución de desteñido (metanol 20% y ácido acético 20%) durante 2 horas. Como marcadores de masa molecular se utilizaron proteínas de referencia de masa molecular conocida (Mark 12, Invitrogen).

3. RESULTADOS

3.1. Actividad fosfolipasa A₂

Los resultados de la actividad PLA₂ se muestran en la Tabla 1. El veneno de *C. aquilus* mostró una actividad enzimática de 0.0265 ± 0.0018 , mientras que el veneno de *C.r exiguus* tuvo un valor de 0.0307 ± 0.0023 .

3.2. Actividad caseinolítica

La actividad proteolítica sobre caseína se muestran en la Tabla 1. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la actividad caseinolítica causada por el veneno de *C. aquilus* (0.287 ± 0.021) fue menor que la del veneno de *C.r.exiguus* (0.513 ± 0.062).

Tabla 1. Actividad enzimática de los venenos estudiados

Actividad específica (U/mg proteína)	<i>Crotalus aquilus</i>	<i>Crotalus ravus exiguus</i>
Fosfolipasa A ₂	0.0265 ± 0.0018	0.0307 ± 0.0023*
Proteolítica (en caseína)	0.287 ± 0.021	0.513 ± 0.062*

Tabla 1. Actividad por enzimas fosfolipasas A₂ y actividad proteolítica en caseína. Se muestran las unidades de actividad enzimática U/mg proteína (unidades=mmol producto formado/min/mg). * Diferencias significativas con p<0.05.

3.3. SDS-PAGE

El gel de poliacrilamida SDS-PAGE realizado bajo condiciones reductoras mostró algunas diferencias en cuanto a presencia y ausencia de bandas, así como la intensidad de las mismas; el veneno de *C. aquilus* evidenció bandas de ~14 a ~84 kDa, mientras que el veneno de *C.r.exiguus* las bandas presentes fueron de ~14 a los ~70 (Fig. 1).

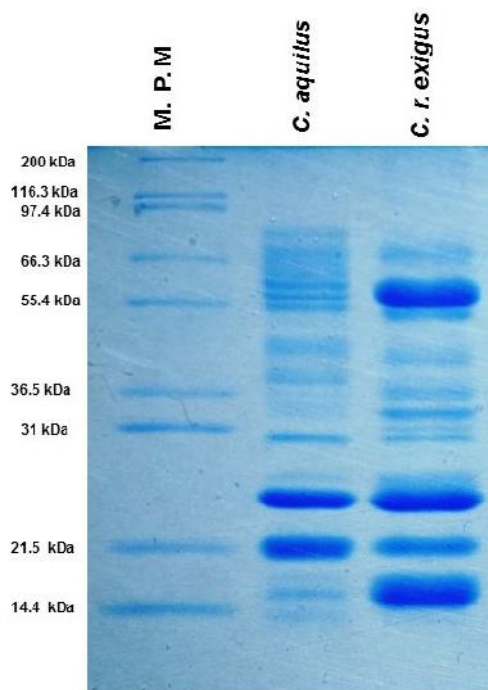


Fig. 1. Gel de SDS-PAGE al 11%. *C. aquilus*=*Crotalus aquilus*., *C.r.exiguus*= *Crotalus ravus exiguus*., MPM= marcador de peso molecular., kDa= kilodalton. Se cargaron en cada carril 20 µg de proteína de cada veneno.

4. DISCUSIONES

A pesar de que México posee una amplia diversidad de serpientes venenosas de la Familia Viperidae, su estudio se ha enfocado principalmente a estudios taxonómicos y de distribución (Campell y Lamar 2004; Ernst & Ernst, 2011), pero existen muy pocos datos desde el punto de vista toxicológico. Los venenos de vipéridos causan principalmente daños a nivel tisular y en la afectación de la cascada de coagulación; en particular, estos venenos son especialmente ricos en enzimas fosfolipasas A₂, las cuales provocan la hidrólisis de fosfolípidos en el tejido del músculo esquelético para inducir su efecto necrotizante, por lo que es importante su estudio ya que tienen una gran implicación médica en las personas que han sufrido mordeduras (Doley *et al.*, 2010; Gutierrez & Ownby, 2003; Lomonte & Gutiérrez, 2011). En este trabajo, se encontró un ligero incremento en la actividad fosfolipasas A₂ del veneno de *C.r.exiguus* con relación al veneno de *C. aquilus*; dichos valores son semejantes a los encontrados en los venenos de otras cascabeles de montaña, es decir, de las subespecies de *Crotalus lepidus* (Martínez Romero *et al.*, 2013). De igual manera, la determinación de la actividad proteolítica de las muestras de veneno sobre caseína es una técnica ampliamente usada, ya que este sustrato puede ser degradado por proteasas de serina y metaloproteasas de los venenos de vipéridos, y estas proteínas también actúan ampliamente en los mecanismos de toxicidad de dichos venenos (Fox & Serrano, 2005; Menezes *et al.*, 2006; Terra *et al.*, 2009). De esta manera, se pudo determinar que la acción proteolítica del veneno de *C.r.exiguus* fue mayor que la del veneno de *C. aquilus* (Tabla 1). Es interesante mencionar que Rivas-Mercado (2014) reportó que el veneno de *C. aquilus* mostró actividad proteolítica en azocaseína.

Por otro lado, la separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida es un método que útil para determinar de manera semi-cuantitativa la presencia y la cantidad relativa de los componentes de cada veneno. De esta manera, el gel de poliacrilamida SDS-PAGE fue realizado bajo condiciones reductoras, y se pudieron observar algunas diferencias en cuanto a número, intensidad y masa molecular de las bandas de los venenos. Las bandas encontradas en el veneno de *C. aquilus* estuvieron en el intervalo de ~14 a ~70 kDa aproximadamente, siendo las bandas más intensas las obtenidas en ~14.4, 21.5 y 25 kDa; Rivas-Mercado (2014) mostró un perfil de electroforesis en gel del veneno de *C. aquilus* muy similar al de este trabajo, con excepción de la banda ~25 kDa, la cual se presentó en nuestros resultados (Fig. 1). Con relación al veneno de *C.r.exiguus*, las bandas más intensas se localizaron a los ~21.5 y 25 y 55.4 kDa aproximadamente (Fig. 1). En el trabajo de Martínez *et al.*, (2013) se realizó una comparación del perfil de proteínas de las subespecies pertenecientes al grupo *Crotalus lepidus* (serpientes de cascabel de montaña del norte de México); dicho estudio evidenció la presencia de las bandas más intensas en el intervalo de 27 a 50 kDa. Es importante el estudio de las propiedades bioquímicas de los venenos de serpientes, ya que algunas especies están involucradas en casos de mordeduras en personas y el conocimiento de sus propiedades toxicológicas permite el mejoramiento de los tratamientos médicos y de los antivenenos (Calvete *et al.*, 2009; de Roodt *et al.*, 2005).

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección del Posgrado de la UAdeC por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Calvete J.J., Sanz L., Angulo Y., Lomonte B. & Gutiérrez J.M. 2009. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters* 583, 1736-1743.

Campbell J.A. & Lamar W.W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Volúmenes 1 y 2. Cornell University Press, Ithaca, New York, United States. 870 p.

de Roodt A.R., Estévez R.J., Paniagua S.J.F., Litwin S., Carvajal S.A., Dolab J.A., Robles O.L. & Alagón A. 2005. Toxicidad de serpientes de importancia médica en México. *Gaceta Médica de México*. 141, 13-21.

Doley R., Zhou X. & Kini R.M.. 2010. Snake venom phospholipase A₂ enzymes. En: *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. S.P. Mackessy (Ed). CRC Press. pp.173-205.

Ernst C.H. & Ernst E.M. 2011. Venomous reptiles of the United States, Canada, and Northern Mexico: Heloderma, Micruroides, Micrurus, Pelamis, Agkistrodon, Sistrurus. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 392 p.

Fox J.W. & Serrano S.M. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 45: 969-985.

Gutierrez J.M. & Ownby C.L. 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 42: 915-931

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Lomonte B. & Gutierrez J.M. 2011. Phospholipases A₂ from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage?. *Acta Chimica Slovenica*. 58(4): 647-659.

Mackessy S.P. 2008. Venom composition in rattlesnakes: Trends and biological significance. En: *The Biology of Rattlesnakes*. W.K. Hayes, K.R. Beaman, M.D. Cardwell & S.P. Bush (Eds.). Loma Linda University Press, Loma Linda, California. pp. 495-510.

Markland F.S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 36: 1749-1800.

Martínez-Romero G., Rucavado A., Lazcano D., Gutiérrez J.M., Borja M., Lomonte B., Garza-García Y. & Zugasti-Cruz A. 2013. Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi* and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon*. 71, 84-95.

Ménez A., Gillet D. & Grishin E. 2006. Toxins: threats and benefits. En: Recent research developments on toxins from bacteria and other organisms. D. Gillet & L. Johannes (Eds.). Recent research developments on toxins from bacteria and other organisms. Research Signpost, Trivandrum, India. pp. 1-33.

Menezes M.C., Furtado M.F., Travaglia-Cardoso S.R., Camargo A.C. & Serrano S.M. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*. 47, 304-312.

Rivas Mercado E.A. 2014. Caracterización bioquímica del veneno de tres serpientes de cascabel de montaña (*Crotalus aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidusxaquilus*). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Agascalientes, México. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/123456789/287>

Seibert C.S., Tanaka-Azevedo A.M., Santoro M.L., Mackessy S.P., Torquato R.J.S., Lebrun I., Tanaka A.S. & Sano-Martins I. S. 2006. Purification of a phospholipase A₂ from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 342, 1027-1033.

Terra R.M., Pinto A.F., Guimarães J.A. & Fox J.W. 2009. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): insights into venom induced pathology. *Toxicon*. 54, 836-844.

Walker J.O., Morrison R., Stewart R. & Gore D. 2013. Venomous bites and stings. *Current Problems in Surgery*. 50, 9-44.