

VARIACIÓN ONTOGÉNICA EN EL VENENO DE *Crotalus simus* EN MÉXICOONTOGENETIC VARIATION IN THE VENOM OF *Crotalus simus* IN MEXICOEdgar Neri-Castro<sup>1,2\*</sup> y Roberto Ponce-López<sup>1</sup><sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de la UNAM. Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos. Apdo. Postal 510-3, C.P.62250<sup>2</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, CDMX, México.Autor para correspondencia: [neri@ibt.unam.mx](mailto:neri@ibt.unam.mx); [nericastroedgare@gmail.com](mailto:nericastroedgare@gmail.com)

RECIBIDO: 24/05/2018

ACEPTADO: 25/06/2018

PALABRAS CLAVE:

*Crotalus simus*,  
veneno,  
crotoxina,  
variación ontogénica.

KEYWORDS:

*Crotalus simus*,  
snake venom,  
crotoxin,  
ontogenetic variability.**RESUMEN**

*Crotalus simus* es una especie de cascabel importante desde el punto de vista clínico, ocasiona un porcentaje alto de accidentes ofídicos y su veneno es utilizado como inmunógeno en la elaboración de antivenenos. En México es la especie mejor estudiada ya que se han realizado distintos trabajos sobre sus actividades bioquímicas y biológicas. Sin embargo, dichos trabajos se han centrado en el estudio del veneno de ejemplares adultos, mientras que poco se sabe del veneno de ejemplares neonatos y juveniles. En el presente trabajo se describe que el veneno de *C. simus* de juveniles posee una potencia letal mayor, baja actividad hemorrágica y baja actividad proteolítica comparado con el veneno de ejemplares adultos. A pesar de que existía el reporte de variación ontogénica, este fue descrito por medio de proteómica, hasta el presente trabajo no existían reportes de las diferencias en las actividades bioquímicas y biológicas para las poblaciones mexicanas.

**ABSTRACT**

*Crotalus simus* is an important rattlesnake species from its clinical point of view, since it causes for a high rate of snake bite cases and its venom is used as an immunogen for antivenom production. The most studied in Mexico in terms of biochemical and biological activities. However, a number of reports focused only on venom from adult individuals, whereas little is known about juvenile specimen venom. The present work demonstrated that juvenile *C. simus* venoms have higher lethal potency and lower hemorrhagic and proteolytic activities, compared to to adult venom. So far, there is only one report regarding ontogenetic variation in this species, using a proteomic approach, while there was no report regarding differences in biochemical and biological activities between both stages.

## INTRODUCCIÓN.

México posee una diversidad importante de serpientes venenosas, divididas en dos familias, Elapidae con 17 especies (Uetz et al., 2018), la cual engloba a las serpientes conocidas comúnmente como coralillos y una serpiente marina (*Pelamis platurus*) con distribución en las aguas del pacífico. La segunda familia es Viperidae con 71 especies registradas, esta familia incluye a los cantiles, nauyacac y cascabeles (Uetz et al., 2018). En México, del 95 al 98% de los envenenamientos son causados por vipéridos, siendo *Bothrops asper* la especie que causa el mayor número de accidentes, seguido de las víboras de cascabel (Campbell y Lamar, 2004). Dentro de estas, destaca *C. simus* la cual se distribuye por la vertiente del golfo de México, iniciando su distribución en el norte de Veracruz, Tabasco, Chiapas y parte de Oaxaca. Es una especie que en promedio mide de 120 a 150 cm, con colores amarillos y rombos de color oscuro en el dorso de su cuerpo. Una de las características principales son dos líneas paravertebrales de color negro que inician en la base de la cabeza y generalmente terminan en el primer tercio del cuerpo (Campbell y Lamar, 2004).

Los venenos de vipéridos se caracterizan por poseer una mezcla compleja de moléculas proteicas y no proteicas como lípidos, sales, nucleótidos, entre otros. Sin embargo, las proteínas son las moléculas involucradas en la fisiopatología ocasionada en los envenenamientos. A pesar de que existe una gran cantidad de proteínas con actividades distintas, estas son agrupadas en familias proteicas. Hasta la fecha se han reportado 63 familias proteicas en los venenos de serpientes, sin embargo, en vipéridos son tres familias (metaloproteasas, serín proteasas y fosfolipasas) las que representan cerca del 70% de la composición y estas son las responsables de ocasionar la fisiopatología principal (Tasoulis e Isbister, 2017).

Dentro de la familia de fosfolipasas se encuentra la crotoxina, que es una potente  $\beta$ -neurotoxina, inicialmente descrita en el veneno de *C. durissus terrificus* y posteriormente reportada en otras especies de cascabeles como *Crotalus tigris*, y en algunas poblaciones de *C. scutulatus* y *C. tzabcan* (Glenn y Straight, 1989; Yi-Hsuan et al., 2004; Calvete et al., 2012; Castro et al., 2013; Borja et al., 2014; Durban et al., 2017; Rivas et al., 2017). La crotoxina se encuentra formada por dos subunidades; una de ellas es la subunidad A con peso molecular cercano a 9.5 kDa, sin toxicidad ni actividad enzimática, proviene de un gen de fosfolipasa que al llegar a proteína sufre modificaciones postraduccionales, los cuales son cortes proteolíticos por alguna proteasa (hasta la fecha no se conoce la proteasa que realiza dicho corte), y que dejan tres cadenas unidas por puentes disulfuro; y la otra es la subunidad B que es una fosfolipasa con peso molecular de 14.3 kDa, actividad enzimática y es letal (Faure et al., 1994). Cuando se encuentra formado el complejo A+B (crotoxina) la actividad letal aumenta (Canziani et

al., 1983; Faure et al., 1994).

Para *C. simus* con distribución en Costa Rica se ha reportado una variación ontogénica de su veneno. No obstante, en estudios proteómicos se ha reportado que ejemplares neonatos (de 6 semanas de nacidos) poseen como componentes mayoritarios fosfolipasas con 55.9% de los cuales el 52.7% corresponde a crotoxina, la segunda familia importante fueron las serín proteasas con 36% mientras que las metaloproteasas se encontraban en baja proporción con 2%. Para el caso de los adultos, crotoxina y serín proteasas se encuentran en 4% y 5.3%, respectivamente, mientras que las metaloproteasas se encuentran en un porcentaje alto con 71.7% (Calvete et al., 2010). Para el caso de México en el 2013, se reportó el proteoma de un pool de *C. simus* adultos de Veracruz en el cual se describió que estos venenos poseen una  $DL_{50}$  bajas, es decir, venenos con alta potencia letal (0.18 a 0.65  $\mu$ g/g). También mencionan que los componentes de mayor relevancia son las metaloproteasas con 27.4%, serín proteasas 30.4% y crotoxina 14% (Castro et al., 2013). En México se ha realizado el proteoma del veneno de un solo ejemplar cría de *C. simus*, los resultados muestran que el veneno posee el 5.3% de metaloproteasas, 26.2% de crotoxina y 32.7% de serín proteasas (Castro et al., 2013; Durban et al., 2017), sin embargo, no se conocen las actividades biológicas de dichos venenos, por lo tanto, es necesario conocer las diferencias bioquímicas y biológicas de los venenos de crías y adultos. El objetivo principal del presente estudio es demostrar que la variación ontogénica descrita en trabajos proteómicos (Durban et al., 2017) se relaciona con las actividades biológicas y bioquímicas de los venenos de crías y adultos de *C. simus*.

## METODOLOGÍA

**Extracción de veneno.** Se realizó un pool de veneno de 11 ejemplares adultos de *C. simus* del estado de Veracruz y un pool de 9 ejemplares crías del mismo estado. El veneno se obtuvo por medio de extracción manual, utilizando una copa de vidrio con *parafilm* en la superficie. En todos los casos se realizó masaje de las glándulas venenosas, con el objetivo de obtener mayor volumen de veneno. El veneno obtenido fue centrifugado durante 5 minutos (min) a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, el veneno fue liofilizado y guardado a -20 °C hasta su posterior uso.

**Cuantificación de proteína.** Se pesaron entre 3 a 5 mg de veneno y se resuspendió en 1 ml de PBS (buffer de fosfatos). Posteriormente, se cuantificó por medio del ensayo del ácido bicinconínico (BCA) de la marca Price®.

**Gel de poliacrilamida.** Con el fin de ver y comparar el perfil electroforético del veneno de *C. simus* de crías y adultos, se realizaron geles SDS-PAGE al 15% en

condiciones reductoras, utilizando 2-mercaptoetanol, y no reductoras. Se analizaron 20 µg de veneno por carril, la separación se realizó en una cámara de electroforesis marca BIO-RAD® modelo Mini PROTEAN III. Las muestras fueron separadas a 80 volts durante los primeros 30 min y posteriormente se cambió a 120 volts (Laemmli, 1970).

**Potencia Letal.** La dosis letal media se define como la cantidad de veneno necesaria para matar a la mitad de una población animal, en este caso utilizamos ratones de la cepa ICR (CD1) con un peso de 18 a 20 g, sexo indistinto. Se administraron distintas cantidades de veneno a cinco grupos de ratones, cada grupo con tres individuos, a las 24 horas (h) posteriores a la inoculación se realizó el conteo de los ratones muertos, con el fin de obtener el porcentaje de mortalidad. Los resultados fueron procesados en el programa estadístico *Graphd Prism 6*.

**Actividad hemorrágica.** Únicamente se comparó de manera general la actividad del veneno de adultos con las de crías, para lo anterior se utilizó y modificó la técnica descrita por Dagda et al. (2013). Para esto, a un grupo de tres ratones de la cepa CD1 de 28 a 30 g se les administró 20 µg de veneno por vía intradérmica en el dorso del animal, a las 3 h posteriores a la inoculación se sacrificaron los roedores en una cámara de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se les retiró la piel y se midió el halo hemorrágico generado por el veneno.

**Actividad proteolítica.** Se usó como sustrato *hide poder azure* como sustrato, 50 µg de veneno fueron mezclados con 1 ml de sustrato a una concentración de 5 mg/ml con Tris 0.1 M, pH 8.0, después de dos horas de agitación a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 5 min, se midió la absorbancia a 595 nm del sobrenadante, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados fueron interpolados en una curva estándar como lo menciona Borja et al. (2018).

**Degradación de Fibrinógeno.** La degradación de fibrinógeno se realizó con algunas modificaciones a la técnica descrita por Weldon y Mackessy (2010). Se resuspendieron 0.5 mg/ml de fibrinógeno de borrego y se tomaron 400 µl que fueron preincubados con 20 µl de veneno a una concentración de 2 mg/ml, se incubó a 37 °C y cada 1, 5, 10 y 15 min se tomaron 16 µl de muestra a la cual se le agregó 4 µl de 5x de 2-mercaptoetanol, e inmediatamente se hirvieron las muestras durante 5 min. Finalmente, las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 12.5%.

**RP-HPLC.** Se usó una columna analítica C-18 (Vydac, 4.6 mm x 250 mm), con el método usado y descrito por Castro et al. (2013). Se analizaron 3 mg de veneno, los cuales fueron resuspendidos en agua con 0.1% TFA, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm, el sobrenadante fue separado y finalmente,

cargado. Los cromatogramas de crías y adultos fueron empalmados para una mejor comparación.

## RESULTADOS

En la extracción del veneno de un *pool* de nueve ejemplares de crías se obtuvo un total de 200 mg de veneno, es importante mencionar que el color del veneno de crías fue blanco, mientras que el de los adultos fue amarillo, de los ejemplares adulto se obtuvieron cantidades de veneno mayores, cuyas cantidades fueron de 100 mg a 300 mg. En los perfiles electroforéticos (Figura 1) se observa que las crías no poseen la banda de alto peso molecular (> 50 kDa), mientras que en los adultos es una banda con mayor abundancia, por otro lado, en los adultos hay una banda de aproximadamente 22 kDa que no se observa en las crías, también existe una diferencia en proporción en la banda de 14 kDa, siendo más abundante en crías que en adultos.

En los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC (Figura 2) se observan cambios importantes en las fracciones que eluyen a los 29 min en los que el perfil de adultos muestra tres fracciones en proporciones altas que no se observan en el veneno de las crías, el mismo caso para las fracciones de los 76 y 79 min presentes en adultos y no en crías, finalmente, las fracciones que eluyen después del min 80 se encuentran en mayor proporción en el veneno de adultos que en crías.

En los experimentos de letalidad, el veneno de las crías fue más potente que el de los adultos y es importante mencionar que a pesar de que ambos venenos poseen DL<sub>50</sub> bajas (venenos muy potentes) los ratones inoculados con el veneno de crías presentaron parálisis flácida con mayor rapidez y mucho más marcada que la de los adultos. En la Figura 3 se observan los geles sobre la degradación de las cadenas del fibrinógeno, en las que se observa que el veneno de los adultos degrada la cadena α desde el primer minuto, a los 5, 10 y 15 la banda desaparece por completo, la cadena β comenzó a ser degradada hasta los 10 min y a los 15 la banda desaparece, mientras que la γ no es degradada, ésta se mantiene intacta. En el caso del veneno de las crías se observa un patrón similar para la cadena α, sin embargo, las cadenas β y γ parecen no sufrir degradación.

El veneno de crías no presentó actividad hemorrágica importante, en dos de los ratones no se observó halo hemorrágico, mientras que en uno de ellos fue menor a 2 mm, por otro lado, el veneno de los adultos mostró halos hemorrágicos de 7, 9 y 10 mm. La actividad proteolítica sobre *hide poder azure* mostró que el veneno de crías posee 2.8 veces menor actividad que el de los adultos, similar a lo que pasó en la actividad hemorrágica en ratones (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades biológicas y bioquímicas del veneno de crías y adultos de *C. simus*.

Edad de los ejemplares	Color del veneno	DL <sub>50</sub> (µg/g)	Hemorragia en ratón	Act. proteolítica (U/mg)	Act. Proteolítica + EDTA (U/mg)
Cría	Blanco	0.084	+	12 ± 0.2	6 ± 0.09
Adulto	Amarillo	0.16	+++	34.3 ± 5.0	3 ± 0.3

DL<sub>50</sub>: Dosis letal media; +, poca actividad hemorrágica; +++, alta actividad hemorrágica; U, una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de veneno necesario para degradar 1 mg de sustrato; U/mg, unidades de actividad enzimática por miligramo de veneno, ± desviación estándar. EDTA, indica que el veneno fue preincubado con 5 mM de EDTA durante 30 min a 37°C.

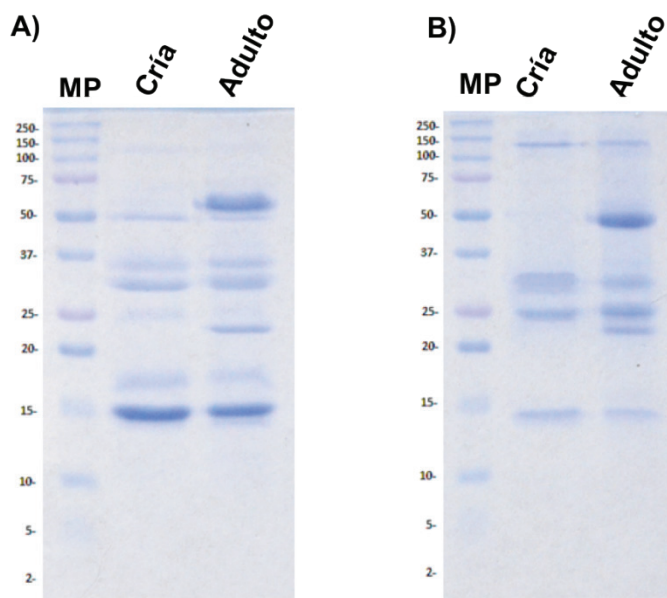


Figura 1. SDS-PAGE al 15%, 25 µg de veneno por carril, A) condiciones reductoras, B) condiciones no reductoras. MP, marcador de peso molecular; cría, refiere al veneno de ejemplares crías.

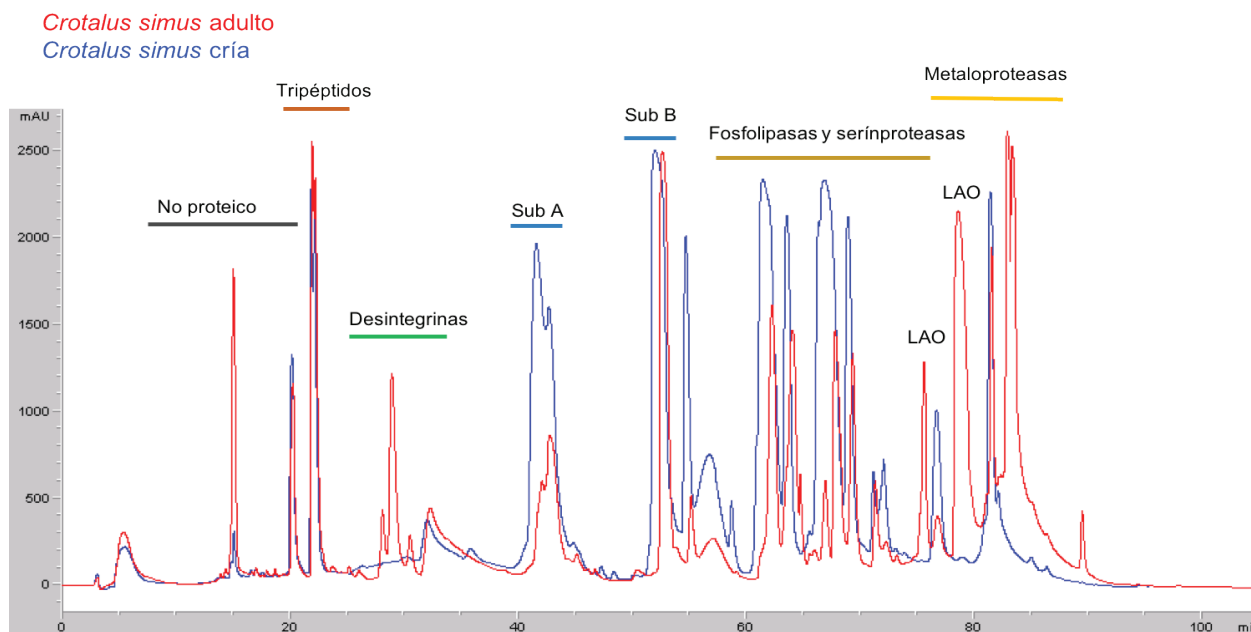
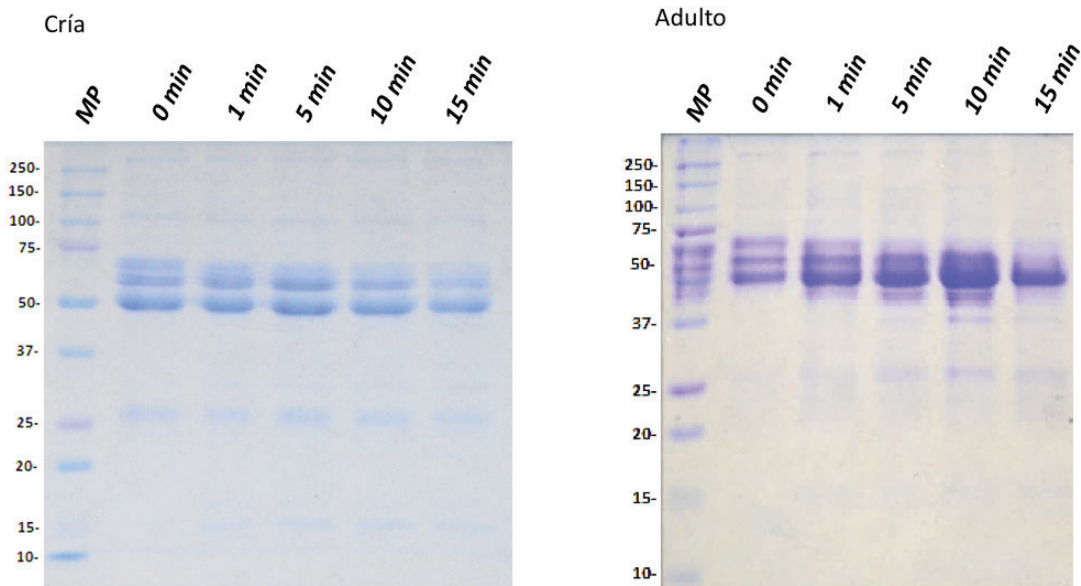


Figura 2. Comparación de los perfiles cromatográficos por RP-HPLC de venenos de crías y adultos.



**Figura 3. Gel SDS-PAGE al 12.5% sobre análisis de la degradación de fibrinógeno, el minuto cero representa la muestra antes de preincubar el veneno.**

## DISCUSIÓN

Con base a la información de los proteomas reportados por Castro et al. (2013) y Durban et al. (2017), las fracciones que eluyen a los 29 min se trata de desintegrinas las cuales se encuentran en porcentajes bajos en el veneno de las crías, por otro lado, las fracciones del min 76 y 79 coeluyen L-amino oxidasas y metaloproteasas. El veneno color amarillo de los individuos adultos los dan las L-amino oxidasas las cuales no se encuentran presentes en el veneno de las crías, debido a esto el veneno de los ejemplares crías es color blanco (Bhattacharjee et al., 2015).

En los cromatogramas también se puede observar que la proporción de las fracciones que eluyen a los 41 y 52 min corresponden a la subunidad ácida (crotopotina) y básica, respectivamente, de la crotoxina (Castro et al., 2013; Durban et al., 2017; Rivas et al., 2017; Borja et al., 2018;). El veneno de crías posee mayor proporción de ambas, pero es importante notar que la proporción de la subunidad ácida es considerablemente mayor, estas proporciones correlacionan con la actividad letal, ya que diferentes estudios han demostrado que venenos con crotoxina en su composición poseen mayor actividad letal (Calvete et al., 2010; Castro et al., 2013).

La actividad hemorrágica en el veneno de las crías fue baja comparada con la de los adultos, lo cual concuerda con la baja proporción de metaloproteasas observada en el cromatograma de RP-HPLC, ya que estas enzimas son las encargadas de degradar las proteínas que conforman la lámina basal de los vasos sanguíneos. La actividad proteasa usando como sustrato *hide poder azure* muestra que el veneno de los adultos posee

significativamente mayor actividad que las crías. Los experimentos realizados con EDTA demuestran que la actividad proteolítica de los adultos se encuentra dada por las metaloproteasas ya que dicha actividad es inhibida cuando el veneno se preincuba con EDTA, mientras que la poca actividad que presenta el veneno de las crías es otorgado por las serín proteasas debido a que cuando el veneno es preincubado con EDTA la actividad proteolítica se mantiene similar.

La variación ontogénica de los venenos de vipéridos mexicanos es un tema nuevo ya que no existen trabajos realizados con especies o poblaciones mexicanas, existen especies de vipéridos en las cuales se ha reportado dicha variación como es el caso de *Bothrops asper* (Saldarriaga et al., 2003), *Crotalus simus* de Costa Rica (Calvete et al., 2010), *Atropoides nummifer* y algunos ejemplos en los cuales no se han observado cambios en la composición del veneno como es el caso de *Agkistrodon bilineatus* (datos generados por nuestro grupo aún no publicados).

Los componentes de mayor importancia en el veneno de *C. simus* son la crotoxina y las serín proteasas, la primera encargada de generar todo el cuadro clínico neurotóxico y la segunda probablemente de ocasionar problemas en la coagulación (Castro et al. 2013). Ambos componentes se encuentran en los venenos de crías y adultos, sin embargo, las proporciones de crotoxina son mayores en el veneno de crías, por lo que un envenenamiento ocasionado por estas debe ser tratado de manera rápida y eficaz ya que puede llevar al paciente a complicaciones tales como parálisis flácida generalizada que, de no ser tratada, puede llevar a un paro respiratorio.

## CONCLUSIÓN

Existe variación ontogénica en el veneno de *C. simus*, las crías poseen mayor porcentaje de crotoxina, lo cual es un factor determinante en el aumento de la potencia letal. Las crías presentaron menor actividad hemorrágica y proteolítica comparada con la que presentó el *pool* de adultos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Alagón cano por el apoyo brindado durante este proyecto. A la M. en C. Melisa Bénard Valle por la ayuda en la extracción de veneno. A Miguel Borja por haber donado veneno de algunos ejemplares de *C. simus*. Este proyecto fue financiado con el proyecto DGAPA-PAPIIT: IN207218.

## LITERATURA CITADA

Bhattacharjee P., Mitra J. y Bhattacharyya, D. 2015. L-Amino acid oxidase from venoms. In: Gopalakrishnakone, P. (eds) Toxins and drug discovery. Toxicology. Springer, Dordrecht.

Borja, M., Castañeda, G., Espinosa, J., Neri, E., Carbajal, A., Clement, H., García, O. y Alagón, A. 2014. Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) with type B venom from Mexico. *Copeia* 2014(1): 7–13.

Borja, M., Neri-Castro, E., Castañeda-Gaytán, G., Strickland, J.L., Parkinson, C.L., Castañeda-Gaytán, J., Ponce-López, R., Lomonte, B., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A. y Pérez-Morales, R. 2018. Biological and proteolytic variation in the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins* 10(1): 35.

Calvete, J.J., Pérez, A., Lomonte, B., Sánchez, E.E. y Sanz, L. 2012. Snake venomomics of *Crotalus Tigris*: The minimalist toxin arsenal of the deadliest nearctic rattlesnake venom. Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type ii venoms. *Journal of Proteome Research* 11(2): 1382–1390.

Calvete, J.J., Sanz, L., Cid, P., de la Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M.C., Borges, A., Bremó, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A. y Gutiérrez, J.M. 2010. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome Research* 9(1): 528–544.

Campbell, J.A. y Lamar, W.W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Cornell University Press. Ithaca, New York, USA.

Canziani, G., Seki, C. y Vidal, J.C. 1983. The mechanism of inhibition of phospholipase activity of crotoxin B by crotoxin A. *Toxicon* 21(5): 663–674.

Castro, E.N., Lomonte, B., Gutiérrez, M<sup>a</sup> del C., Alagón, A. y Gutiérrez, J.M. 2013. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics* 87: 103–121.

Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A. y Calvete, J.J. 2017. Integrated venomomics and venom Gland transcriptome analysis of juvenile and adult Mexican rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan* and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated ontogenetic shifts. *Journal of proteome research* 16(9): 3370–3390.

Faure, G., Choumet, V., Bouchier, C., Camoin, L., Guillaume, J.L., Monegier, B., Vuilhorgne, M. y Bon, C. 1994. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the Venom of *Crotalus durissus terrificus*. *European Journal of Biochemistry* 223: 161–164.

Glenn, J.L., y Straight, R. C. 1989. Intergradation of two different venom populations of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Toxicon* 27(4): 411–418.

Laemmli, U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680.

Rivas, E., Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Hernández-Dávila, A.I., Zamudio, F. y Alagón, A. 2017. General characterization of the venoms from two species of rattlesnakes and an intergrade population (*C. lepidus x aquilus*) from Aguascalientes and Zacatecas, Mexico. *Toxicon* 138: 191–195.

Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Dí'az, A., & Gutiérrez, J.M. 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42(4): 405–411.

Tasoulis, T., y Isbister, G.K. 2017. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins* 9(9): 290. Uetz, P., Freed, P. y Hošek, J. (eds.). 2018. The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, Consultado en Marzo del 2018.

Weldon, C.L. y Mackessy, S.P. 2010. Biological and proteomic analysis of venom from the Puerto Rican racer (*Alsophis portoricensis*: Dipsadidae). *Toxicon* 55 (2–3): 558–569.

Yi-Hsuan, C., Ying-Ming, W., Ming-Jhy, H. y Inn-Ho, Tsai. 2004. Molecular evolution and structure–function relationships of crotoxin-like and asparagine-6-containing phospholipases A2 in pit viper venoms. *Biochemical Journal* 381: 25–34.