

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE SERIN PROTEASAS DEL VENENO DE
HÍBRIDOS DE *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* EN CAUTIVERIO**
Roldán Padrón, O⁽¹⁾; Blanco Labra, A.⁽²⁾; García Gasca, T.⁽¹⁾; Padilla García, U.⁽¹⁾
Facultad de Ciencias Naturales⁽¹⁾
Universidad autónoma de Querétaro
CINVESTAV IPN Irapuato.⁽²⁾

RESUMEN

Se analizaron las actividades proteolíticas tipo tripsina y quimotripsina del veneno de organismos híbridos y parentales de *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* además de actividad proteolítica en gelatina, encontrando que organismos híbridos poseen variaciones en los niveles de actividad proteolítica tipo tripsina una mezcla de proteínas pertenecientes a los parentales, con valores de actividad proteolítica mayores a la especie parental.

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es un problema importante de salud pública en las zonas tropicales, subtropicales y rurales del mundo. Se estima que a lo largo del mundo, cada año más de 2,5 millones de personas son mordidas por serpientes venenosas resultando alrededor de 120.000 muertes en las regiones tropicales de Asia, África y América Latina, (Pirela de Las Salas, 2006). Los venenos se dividen en dos grupos; neurotóxicos, que se caracterizan por afectar al sistema nervioso, particularmente a los centros respiratorios y determina la muerte por asfixia; y hemotóxicos, que afectan al sistema circulatorio rompiendo las paredes de los capilares. (Laita, 2002). El veneno del grupo *Crotalidae* es sobre todo hemotóxico y citotóxico, es decir que actúa sobre las células y el sistema hemostático, causando extensas lesiones locales, hemorragias, induciendo una variedad de alteraciones sobre la coagulación sanguínea, por contener componentes procoagulantes y anticoagulantes (Maruñak, *et al*, 2005), caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local incluyendo edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes; desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento (Gutiérrez, *et al*, 2000). Las fracciones del veneno que alteran el mecanismo de la hemostasia han sido clasificados en cinco grupos diferentes, dependiendo de su efecto general: a) tipo coagulante que incluyen enzimas similares a la trombina ó trombino similares y las activadoras de la protrombina; b) fracciones anticoagulantes como las activadoras de la proteína C; c) fracciones que inhiben la función plaquetaria como la familia de las proteínas RGD (Arg-Gly-Asp), las desintegrinas; d) fracciones activadoras de la fibrinólisis y finalmente, e) las hemorraginas (Huang, 1998). En el Estado de Querétaro *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* son especies que comparten la misma zona de distribución y es muy común que se observen en hábitats muy parecidos, y aun que no existen reportes es muy probable que estas especies se reproduzcan entre ellas generando híbridos, debido a que presentan un desarrollo filogenético muy cercano (Padilla-García, com. pers). Debido las variaciones que se han observado en algunas especies de crótalos encontradas en diferentes regiones, así como variaciones en el tipo de desintegrinas como se ha descrito en los trabajos de; Sánchez, *et al.*, 2005 y Pirela De las Salas, *et al.*, en el 2006, se esperaría que exista variación de la concentración y los tipos de serin-proteasas del venenos de organismos parentales y los organismos híbridos. Además, ya que metaloproteasas y serin proteasas son uno de los principales componentes que confieren una actividad hemorrágica y de degeneración del tejido (Tu, 1991) característico de los veneno de crotalidos, el presente estudio se enfocara en el estudio de estos tipos de proteasas y analizar si las posibles variaciones tengan influencia en el grado toxico del veneno de híbridos en relación a las especies parentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del veneno

Fue obtenido por extracción manual (ordeño) de 7 híbridos y 4 organismos parentales (hembra y macho para cada especie parental), pertenecientes al Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro. El veneno fue almacenado a -70°C hasta el momento del análisis. La extracción del veneno se hará por compresión manual de las glándulas de veneno, en tubos eppendorf.

Determinación de la concentración proteica: método de Bradford en microplaca

Se prepararon 5 diluciones de un estándar de proteína (ASB) a diferente concentración de μg de proteína /mL. En una placa de 96 pozos se agregan los estándares de albumina sérica bovina y un muestra blanco (agua). Se agrega en cada pozo restante 10 μL de muestra (veneno diluido 1:1000) y 200 μL de reactivo de Bradford en relación 1:4 con agua. La placa se lee en un espectrofotómetro a 495 nm. A partir de la curva obtenida se calcula la proteína de los venenos teniendo la absorbencia.

Medición de actividad tipo tripsina y quimotripsina

Se utilizó el método de Erlanger, *et al* (1961). Tipo tripsina, se cargaron 20 μl de muestra de veneno de *crotalus* con una dilución 1:1000, 20 μl de sustrato BApNA y 200ul de buffer tris pH 8e n una placa de 96 pozos, la cual fue colocada en un espectrofotómetro de placas biorad a una longitud de onda de 405 nm; Quimotripsina Para el análisis tipo quimotripsina se utilizaron 20 μl de muestra de veneno de *crotalus* dilución 1:100, 20 μl de sustrato BApNA y 150 μl de buffer tris pH 8e n una placa de 96 pozos, la cual fue colocada en un espectrofotómetro de placas biorad a una longitud de onda de 405 nm.

Electroforesis nativa

Se elaboró un gel de poliacrilamida al 10 % de acuerdo al método de Laemmli (1970) y se le adicióno gelatina como sustrato para medir actividad proteolítica. En cada carril del gel se agrego 20 mg de muestra. Gel se analizo baja el método de Rice, *et al.*, (200) para detectar proteólisis. Completado esto se tiño el gel con azul de comassie por 8 horas y se destiño con una solución de etanol- acido acético al 40% y 10% respectivamente.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

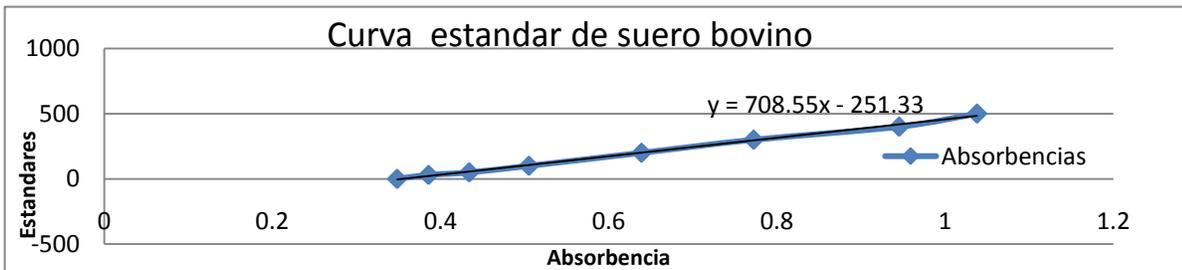


Figura 1: Curva estándar obtenida a partir de valores conocidos de proteína de albumina de sérica bovina a diferente concentración.

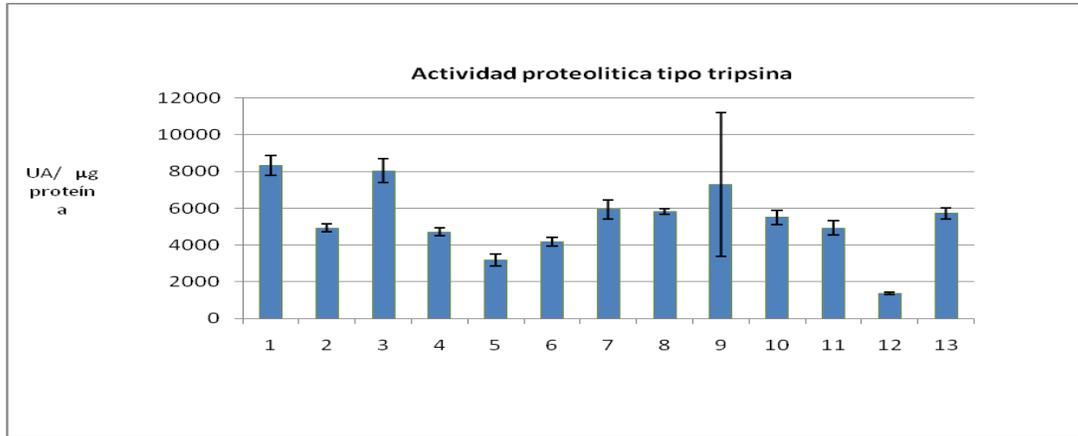


Figura 2: actividad proteolítica específica tipo tripsina sobre sustrato BApNA incubado por 30 minutos. Muestras 1-4 híbridos primera generación (3 años); 5-7 híbridos segunda generación (4 años); muestras 8-9 especie parental *C. aquilus*; muestras 9-11 especie parental *C. polystictus*; 12 y 13 *C. aquilus* (2 años)

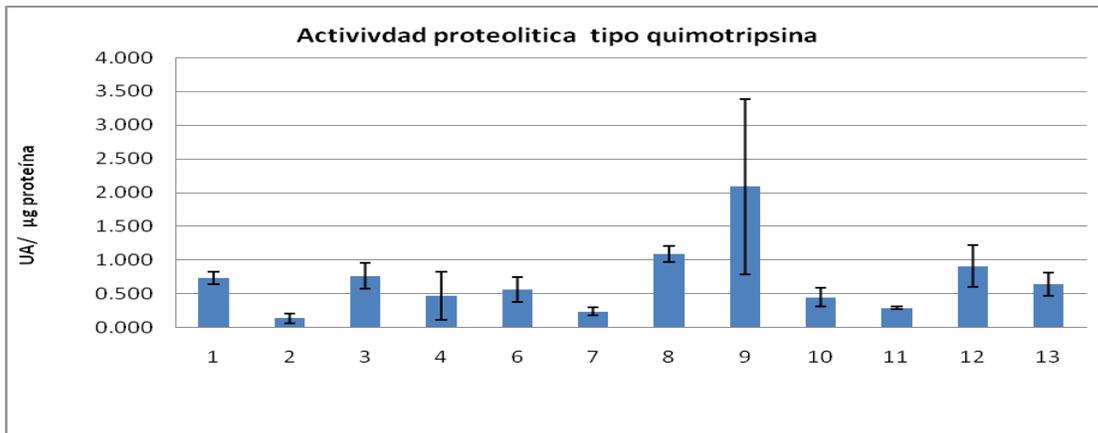


Figura 3: actividad proteolítica específica tipo tripsina sobre sustrato SAAPFpNA. 1-4 a híbridos de la primera generación (4 años); 5-7 híbridos de la segunda generación (3 años); muestras 8-9 especie parental *C. aquilus*; muestras 9-11 especie parental *C. polystictus*; 12 y 13 *C. aquilus* (2 años)

Las actividades tipo tripsina muestran valores altos de proteolisis en rangos que van de 2000 a 8000 UA/μg de proteína. Muestras 1,3,7 presentan los valores más altos de actividad entre los organismos híbridos. Especies parentales adultas *C. aquilus* y *C. polystictus* tienen valores de actividad similares entre si, alrededor de los 6000 UA/μg de proteína. (Unidades de actividad son el incremento de 0.01 de absorbencia a 405 nm). Especie *C. aquilus* de tres años de edad presentan valores de actividad parecidos a organismo *C. aquilus* adultos, alrededor de 6000 y 2000 UA/μg de proteína. Actividad proteolítica tipo quimotripsina muestras valores que van desde los 200 a 1500 UA/μl. organismo 1, 3 de los híbridos, y 8 de los parentales presentan los valores más altos de actividad proteolítica tipo quimotripsina. Entre organismos parentales *C. aquilus* y *C. polystictus*, el primero de estos parece tener una actividad mayor. Actividades proteolíticas de tipo tripsina son mucho mayores en comparación con los resultados de actividad proteolítica tipo quimotripsina, los cuales no alcanzan las 200 UA/μg de proteína, mientras que para tripsina los valores más bajos están alrededor de las 4000 UA/μg de proteína. Actividad proteolítica en gel muestra variación entre organismo 4 y la especie parental *C. polystictus*.

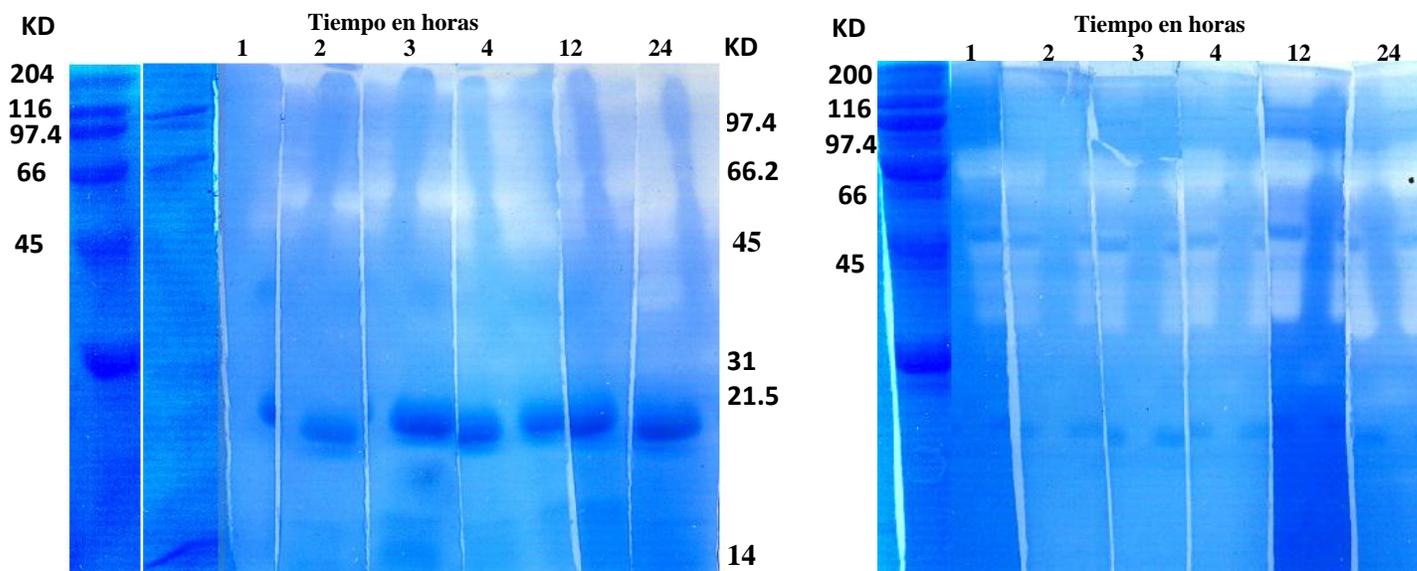


Figura 4: Actividad proteolítica sobre gel de gelatina (bandas claras indican proteólisis). 20 µg de veneno, muestra nativa 9, parental *C. polystictus*. Incubación a diferentes tiempos en buffer de reacción a 37°C. Tiempos de incubación se indican en la parte superior de la imagen. Marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la imagen. Gel izquierda híbrido 4; gel derecha *C. polystictu* (9).

CONCLUSIÓN

Existen variación en el bandeo de proteínas así como en actividad proteolítica, tanto entre organismos parentales *C. aquilus* y *C. polystictus*, como entre híbridos, ya que organismos híbridos presentan una actividad tipo tripsina mayor que la de ambas especies parentales, además de presentar variaciones en la actividad proteolítica e gel entre híbrido (4) y la especie parental *C. polystictus*. Valores de actividad proteolítica tipo tripsina son mucho mayores que actividad tipo quimotripsina, siendo los organismos híbridos 1,3,7 lo que tienen mayor actividad proteolítica, por lo que es importante hacer la determinación de las dosis letales al 50% para observar si estas variaciones afectan en algún grado la letalidad de los venenos presentes en organismos híbridos.

BIBLIOGRAFÍA

- Dueñas Laita, A. Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos. Masson. Barcelona. 2002
- Maruñak, S.L.; Ruíz De Torrent, R.M.; Teibler, G.P.; Gay, C.C.; Leiva, L.; Acosta De Pérez, O. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. Departamento Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias Veterinarias- UNNE. 120-12. 2005.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254. 1976.
- Gutiérrez J.M. & A. Rucavado. Snake Venom Metalloproteases: Their Role in The Pathogenesis of Local Tissue Damage. *Biochimie* 82(9-10): 841-50. 2000.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., y Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95:271-278. 1961.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. 1970
- Pirela de las Salas, Rafael del Carmen, Lopez-Jonsthorpe, Juan Carlos e Hernandez Rangel, Jim Lenry. Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. vol.16, no.3, p.232-238. ISSN 0798-2259. 233,234. *RC*, jun. 2006
- Ouyang, C.; Teng, C.; Huang T. "Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function". *Toxicon*, 30, 9, 945-966. 1992.