

Actividad antibacteriana, hemolítica y coagulante del veneno crudo de la serpiente *Crotalus atrox in vitro*

Escamilla Hernández Max Darío, Martínez García Martha, Campoy Otero Emelia, López Urrutia Eduardo R., Álvarez Rodríguez Carmen

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad Estudios Superiores-Iztacala.
Avenida de los Barrios No. 1, Colonia Los Reyes Iztacala
Estado de México, CP 54090.

racunam@yahoo.com

Fecha de aceptación: 20 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Diversos estudios demuestran el efecto antibacteriano y hemolítico del veneno de *Bothrops atrox*, pero se desconoce si el veneno de la especie *Crotalus atrox* en cautiverio, perteneciente a la misma familia y con amplia distribución en el país, tiene efectos similares. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana, hemolítica y coagulante del veneno crudo de *C. atrox* mediante ensayos *in vitro*. Se obtuvo una concentración de 40 µg/µl de proteína en el veneno. El veneno crudo (60 µg/µl) presentó actividad antibacteriana determinada por los halos de inhibición en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se observaron halos de hemólisis alfa de ~20 mm con 300 a 900 µg/µl de veneno. La actividad coagulante se presentó hasta las 24 h después de la aplicación del veneno. Se realizó una electroforesis para la obtención del patrón proteico del veneno y se mostró una banda de 130 kDa, la cual podría pertenecer a algún miembro de la familia de la L-aminoácido oxidasa y otras por debajo de los 15 kDa, donde podrían estar incluidas la crotamina y la fosfolipasa A₂.

Palabras clave: viperidae, herpetario, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Several studies show that *Bothrops atrox* venom has antibacterial and hemolytic activities; however, whether the venom from *Crotalus atrox* –a species that belongs to the same family and is widely distributed in our country– has similar effects, remains unknown. In this work, the antibacterial, hemolytic and clotting activities of crude *C. atrox* venom were evaluated *in vitro*. The crude venom contained 40 µg/µl protein. It displayed *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* inhibition at 60 µg/µL, and ~20 mm alpha hemolysis at 300-900 µg/µl. Clotting activity appeared later, 24 h post exposition to the venom. Electrophoretic separation of the venom protein content revealed a 130 kDa band, which could belong to a member of L-amino acid oxidase family, and a sub-15 kDa band, which could comprise crotamin and phospholipase A₂.

Key words: viperidae, herpetarium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

En América existen dos familias de serpientes venenosas, la *Elapidae* y la *Viperidae*. Los responsables de más de 90% de los accidentes ofídicos en América pertenecen a la familia *Viperidae* (Sasa y Vazquez, 2003). En México existen 322 especies de serpientes, el 20% son venenosas, entre ellas la serpiente de cascabel *Crotalus atrox* (Flores y García, 2014). Los envenenamientos provocados por estas serpientes se caracterizan por sus efectos locales y manifestaciones sistémicas. Los primeros se caracterizan por la aparición de edema, el cual constituye el efecto más común por serpientes de la familia *Viperidae* (Moreno, 2011). Los efectos generales se manifiestan mediante cuadros hemorrágicos sistémicos, coagulopatías, choque cardiovascular e insuficiencia renal (Guerrero y Rodríguez, 2011).

De acuerdo con Kochva (1987) el veneno de las serpientes tiene efectos que pueden variar en letalidad e inestabilidad química según edad, época del año, cantidad, ubicación geográfica de la serpiente y la composición del veneno, dependiendo de la especie. El daño necrosante se produce por la participación de miotoxinas que actúan sobre las células epiteliales; su función coagulante, se debe a la acción de enzimas procoagulantes sobre la protrombina y el factor X, que provocan la obstrucción de vasos sanguíneos; el daño hemorrágico se ocasiona por la destrucción del endotelio vascular de los vasos sanguíneos y linfáticos (Marval y Arocha, 1993).

A pesar de los graves efectos que presentan los venenos de serpientes, en varios estados de México como en Chiapas se recurre al veneno de *C. atrox* de manera tradicional con fines terapéuticos; se utiliza como paliativo en acelerar los partos, disminución del dolor reumático, control de hemorragias, entre otros, en todos los casos el uso se recomienda en dosis pequeñas y controladas (Enríquez *et al.*, 2006). Por otra parte, se reporta que el veneno de los miembros de la familia *Viperidae* también es útil en medicina por sus propiedades anticancerígenas y antibacteriales (Kerkis *et al.*, 2014). Además, las enzimas del veneno de cobra perteneciente a la familia *Elapidae* son una promesa en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades como el Parkinson's y Alzheimer (Goswami *et al.*, 2014).

En los venenos en general el 95% del contenido seco está formado por polipéptidos que incluyen enzimas, toxinas y pequeños péptidos capaces de generar los efectos descritos -en párrafos anteriores- en los animales envenenados (Wong y Belov, 2012). Se han identificado más de 20 enzimas en el veneno de las *Viperidae*, de las cuales, 12 se encuentran en la mayoría de los venenos y una de ellas, la L-aminoácido oxidasa (LAO) es común a todos ellos; la función de esta enzima es facilitar la distribución del veneno por los distintos tejidos de la presa (Ruiz, 2009). La LAO es una enzima que cataliza la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos y producen un cetoácido, amoníaco y peróxido de hidrógeno. Esta enzima está ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido descrita desde hace varias décadas en bacterias, levaduras, hepatopáncreas de moluscos, huevos de gusano de seda, riñones de mamíferos, hígado de aves y mamíferos, y venenos de algunos reptiles, incluyendo ofidios de las familias *Elapidae* y *Viperidae* (Torii *et al.*, 2000).

La proteína LAO aislada y el veneno crudo de la serpiente *Bothrops brazili* (*Viperidae*), mostraron efecto antibacteriano en cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Streptococcus faecalis* con la mayor actividad en esta última utilizando el veneno crudo (Solís *et al.*, 1999). La LAO de *C. atrox* comercial en un reporte de U.S.A. mostró efectos antibacterianos sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus subtilis* (Stiles *et al.*, 1991).

Hasta el momento, el efecto del veneno de *C. atrox* de especies mexicanas en cautiverio no se ha reportado y se desconoce si en esta condición, el veneno conserva las propiedades previamente citadas. Además, en México la zooterapia es aprovechada por gran número de personas debido, principalmente a su uso tradicional y la carencia de recursos económicos (Alonso, 2014). Conocer más acerca del veneno de esta especie ayudará a futuro a la obtención de nuevos fármacos con posible efecto medicinal; por lo cual, en el presente trabajo se determinó la actividad antibacteriana, hemolítica y coagulante de veneno crudo, así como el contenido y patrón electroforético de sus proteínas.

METODOLOGÍA

El veneno se obtuvo de dos individuos adultos de serpiente *C. atrox* mantenidos en cautiverio en el Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, se extrajo por presión manual y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Para la cuantificación de proteínas por la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), se utilizaron 10 µl de veneno y se empleó albúmina sérica de bovino como patrón.

Para las pruebas de sensibilidad bacteriana se utilizaron las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, obtenidas de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FESI, las cuales se mantuvieron en agar nutritivo BD Bioxon.

El ensayo de sensibilidad antibacteriana del veneno de *C. atrox* se realizó por el método de Kirbi-Bauer. Se trabajó con cultivos de *S. aureus* y *E. coli* crecidos 24 h., de éstos se transfirieron colonias a un tubo que contenía 5 ml de solución salina al 0.9% y se igualó la turbidez al estándar (0.5) de la escala de Mc Farland, lo que corresponde aproximadamente 1.5×10^8 células. Las bacterias en solución se inocularon en placas con agar Muller Hinton y se colocaron discos de papel filtro de 7 mm de diámetro, con 40, 50 y 60 µg de proteína del veneno, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El ensayo se realizó por quintuplicado.

Para la prueba de hemólisis indirecta del veneno se utilizaron placas con 20 ml de agar Sangre, donde se colocaron discos de 7 mm de diámetro con 100, 300, 500, 700 y 900 µg de proteína del veneno crudo y se incubaron a 37 °C por 24 h (Pirela *et al.*, 2006). El ensayo se realizó por duplicado.

La actividad coagulante se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Theakston y Reid (1983). Se trataron 200 µl de sangre venosa humana recién extraída, con 3 dosis de veneno correspondientes a 40, 50 y 60 µg de proteína. Para determinar la significancia entre los halos de inhibición de los tratamientos y el tiempo de coagulación se aplicó el estadístico de ANOVA y una prueba de LSD con una α de 0.05.

Además, con la finalidad de evaluar el patrón proteico del veneno crudo, se corrió una electroforesis en gel SDS PAGE al 12% en cámara Biorad Miniprotein II; posteriormente, el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Coomassie R250.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El veneno de *C. atrox* presentó una concentración de proteínas (40 µg/µl) mucho menor a lo reportado para otras especies, ya sea en cautiverio o silvestres del mismo género (Macias *et al.*, 2014a). Se reportó que *C. molossus molossus* en vida silvestre presenta mayor contenido proteico (~700 µg/µl) en comparación con los organismos en cautiverio (~400-650 µg/µl); sin embargo, los resultados pueden variar de acuerdo a la estación del año (Macias *et al.*, 2014b) y a factores como el clima, la edad, el sexo, la distribución, las estaciones del año y el régimen alimenticio de las serpientes (Gómez, 2000). Asimismo, al analizar el veneno de *C. lepidus lepidus*, se observó que de acuerdo con la distribución geográfica, el veneno presentaba diferencias en su rango de toxicidad de 0.70 mg/kg a 2.20 mg/kg (Forstner *et al.*, 1997). Considerando todos estos parámetros es probable, que la condición de cautiverio genere dicha variación en el contenido proteico, por lo que sería interesante conocer si esta condición afecta la toxicidad y el patrón proteico.

En cuanto a la actividad antibacteriana se mostró efecto del veneno a concentraciones de 40, 50 y 60 µg de proteína, los cuales no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos; los halos de inhibición mostrados para *S. aureus* y *E. coli*, fueron en promedio de 18 a 20 mm de diámetro y de 8 a 10 mm, respectivamente (Figura 1). *S. aureus* resultó ser más sensible al veneno de la serpiente. Este hecho puede atribuirse a las características estructurales de la pared celular propias de cada bacteria. Las Gram positivas presentan una gruesa pared de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram

negativas, tienen una membrana externa rica en lípidos y carbohidratos, lo cual la hace impermeable a sustancias hidrofílicas, de esta forma el antibacteriano dependiendo de su tamaño, penetra sólo a través de proteínas transmembranales, llamadas porinas (Vignoli y Seija, 2008). Otro mecanismo propuesto, es la presencia de lipopolisacáridos en la membrana externa, los cuales forman una barrera contra los péptidos antimicrobianos (de Oliveira *et al.*, 2013).

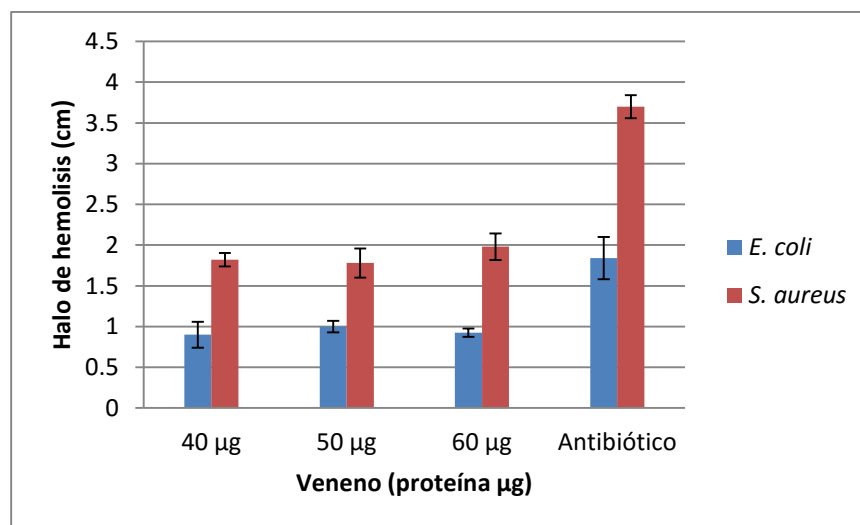


Figura 1. Actividad inhibitoria del veneno de *C. atrox* en *E. coli* y *S. aureus*. El antibiótico empleado para *E. coli* fue Amoxicilina (5 mg/ml) y para *S. aureus*, Cloranfenicol (25 mg/ml). Se observa el promedio de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano con su D. E. De 3 repeticiones.

El efecto antibacteriano del veneno de los crotálicos puede atribuirse a diversas proteínas y/o pequeños péptidos bioactivos presentes, incluso enzimas fosfolipasas A₂ (PLA₂), metaloproteínas y L aminoácido oxidasas (LAOs) (de Oliveira *et al.*, 2013; Samy *et al.*, 2014).

En cuanto al efecto hemolítico de la proteína del veneno crudo (300-900 µg) de *C. atrox*, se observaron halos de hemólisis tipo alfa con un diámetro de 20 a 25 mm en promedio (Figura 2). De acuerdo con Céspedes *et al.*, (2010), la cantidad de veneno capaz de formar un halo hemolítico de 20 mm de diámetro es considerada la concentración mínima indirecta (CMi), en concordancia con este criterio, podría decirse que la CMi en este estudio fue de 300 µg de proteína.

Resultados acerca del efecto hemolítico del veneno de *C. durissus cumanensis* reportados por Pirela *et al.* (2006), donde CMi a 379.51 ± 67.67 µg de veneno formaron halos de tamaño similar a los obtenidos con el veneno de *C. atrox*. Se ha observado también que la CMi de veneno de *C. durissus cumanensis* varía de acuerdo al sexo y edad: en la cría y hembra adulta es de ~11-14 µg de veneno y el macho adulto fue de ~192 µg (Céspedes *et al.*, 2010). En *C. atrox*, se conoce si existe diferencia en la CMi de acuerdo al hábitat y/o a otros factores. Por otro lado, se argumenta que el papel hemolítico del veneno en viperidos puede deberse a la presencia de las enzimas PLA₂ (Jiménez *et al.*, 2005; Inga, 2010).

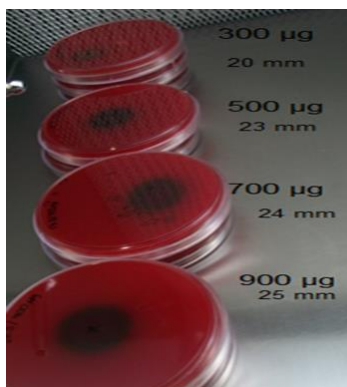


Figura 2. Efecto hemolítico del veneno de *C. atrox* a 300, 500, 700 y 900 µg de proteína in vitro.

El efecto coagulante del veneno crudo de *C. atrox* se observó con 40, 50 y 60 µg de proteína a las 24 h de incubación de la sangre. Se conoce desde hace varias décadas que las PLA₂, debido a su capacidad de interactuar con los fosfolípidos del plasma y de las plaquetas, tienen acción anticoagulante (Alvarado y Gutiérrez, 1988).

En el patrón electroforético se observaron bandas correspondientes a 12, 15, 20, 30, 40 y 130 kDa como se muestra en la figura 3. El peso molecular de la LAO purificada se encuentra alrededor de 110-150 kDa (Solis *et al.*, 1999, Guo *et al.*, 2012). Por lo que la banda de 130 kDa, podría pertenecer a alguno de los miembros de ésta familia. Las bandas de menor peso que se observan corresponderían a otras proteínas presentes en el veneno: la PLA₂ (~15kD) (Beghini *et al.*, 2000) y la crotamina, menor a 10 kD (Remuzgo *et al.*, 2000; Kerkis *et al.*, 2014) presumiblemente.

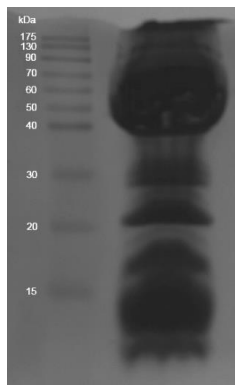


Figura 3. Patrón electroforético del veneno crudo de *Crotalus atrox*. En el carril 1 se observan los estándares de peso molecular. En el carril 2 se muestra el veneno. La muestra de veneno se corrió en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul brillante de Coomassie R250.

CONCLUSIONES

El veneno crudo de *C. atrox* a partir de organismos en cautiverio mostró actividad antibacteriana entre los 40 a 60 µg de proteína sobre *S. aureus* y *E. coli*. Con respecto a la actividad hemolítica se observó que la CMi fue de 300 µg de proteína en el veneno. El efecto coagulante del veneno se presentó hasta 24 h con dosis de 40, 50 y 60 µg de proteína. El patrón electroforético mostró bandas que podrían corresponder a miembros de la familia de la LAO, PLA₂ y la crotamina. Este trabajo aporta datos al conocimiento que sustentan el uso del veneno crudo de los crotálicos en la medicina tradicional. Conocer los mecanismos de acción de los componentes del veneno ayudará en la búsqueda y obtención de nuevos fármacos.

REFERENCIAS

- Alonso, C. A. J. (2014). Use of medicinal fauna in Mexican traditional medicine *J. Ethnopharmacol.*, 152: 53-70.
- Alvarado J., Gutiérrez J. M. (1988). Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae) *Rev. Biol. Trop.*, 36: 563-565.
- Beghini D. G, Toyama M. H., Hyslop S., Sodek L. C., Novello, Marangoni S. (2000). Enzymatic Characterization of a Novel Phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* Rattlesnake (Maracambóia). *Venom J. Protein Chem.*, 19: 679-684.
- Céspedes N., Castro F., Jiménez E., Montealegre L., Castellanos A., Cañas C. A., Arévalo-Herrera M., Herrera S. (2010). Biochemical comparison of venoms from young Colombian *Crotalus durissus cumanensis* and their parents. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 16: 269.
- de Oliveira J. N.G., Silva Cardoso M.E., Franco O.L (2013). Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70: 4645-4658.
- Enríquez V. P., Mariaca M. R., Retana G. Ó. G. y Naranjo P. E. J. (2006). Uso medicinal de la fauna silvestre en los altos de Chiapas, México. *Interciencia (Venezuela)*, 31: 49-499.
- Flores-Villela O., García-Vázquez U. O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Rev. Mex. Biodiversidad*, 85: S467-S47.
- Forstner M., Hilsenbeck R., Scudday J. (1997). Geographic Variation in Whole Venom Profiles from the Mottled Rock Rattlesnake (*Crotalus lepidus lepidus*) in Texas. *J. Herpetology*, 31: 277-287.
- Gómez, T. (2000). Estudio comparativo de la composición bioquímica del veneno en serpientes venenosas de Aguascalientes. CONACyT México.
- Goswami P. K., Samant M., Srivastava R. S. (2014). Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6: 4-7.
- Guerrero E. Y., Rodríguez-Acosta A. (2011). Estudio clínico-epidemiológico de alteraciones hemorrágicas y necróticas causadas por el veneno de la serpiente de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*) en pacientes venezolanos. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 42: 41-49.
- Guo C., Liu S., Yao Y., Qiaoqiao Zhang Q., Sun M.-Z. (2012). Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*, 60: 302-311.
- Inga R., Vivas D., Palermo P., Mendoza J., Lazo F., Yarlequé A. (2010). Caracterización biológica y acción de inhibidores de una fosfolipasa A2 del veneno de *Lachesis muta*. *Rev. Peru. Biol.*, 17: 123 - 128.
- Jiménez K. L., Zavaleta A. I., Izaguirre V., Yarleque A. (2005). Biología Celular y Molecular de las fosfolipasas A₂. *Ciencia e Investigación VIII (1), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM*, 17-32
- Kerkis I., Hayashi M. A. F., Prieto da Silva A. R. B., Pereira A., De Sá Júnior P. L., Zaharenko A. J., Rádis-Baptista G., Kerkis A., Yamane T. (2014). State of the Art in the Studies on Crotamine, a Cell Penetrating Peptide from South American Rattlesnake. *BioMed Res. International*, 2014.
- Kochva E. (1987). The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 25: 65-106.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Macías R.E.F., Martínez M. A., Gatica C.A., Bojórquez R.G., Plenge, T.L.F. (2014a). Análisis comparativo de la actividad hemolítica entre las subespecies *Crotalus molossus molossus* y *Crotalus molossus nigrescens*. *Revista Bio Ciencias*, 2: 302-312.

Macías R.E.F., Díaz C.C. O., Gatica C.A.B., Plenge T.L.F. (2014b). Variación estacional del contenido proteico y actividad de la PLA₂ del veneno de *Crotalus molossus molossus* entre especímenes de origen silvestre y en cautiverio. *Acta Universitaria*, 24: 38-47.

Marval E., Arocha P.C.L. (1993). Efecto de algunos venenos y secreciones de animales sobre el mecanismo hemostático. *Interciencia*, 18: 10-15

Moreno C. (2011). Epidemiología clínica y laboratorial por mordeduras de serpientes en pacientes hospitalizados. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 6: 23-27

Pirela S. R. C., López J., Hernández R. J. L. (2006). Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, XVI: 232-238.

Remuzgo C., Álvarez M. P., Lazo F., Yarlequé A. (2000). Caracterización parcial del veneno de la serpiente cascabel peruana *Crotalus durissus terrificus*. *Rev. Peru. Biol.*, 7: 1-5.

Ruiz G. N. C. (2009). Algunas propiedades catalíticas de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón" Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas, Perú.

Samy R. P., Kandasamy M., Gopalakrishnakone P., Stiles B. G., Rowan E. G., Becker D., Shanmugam M. K., Sethi G., Chow T. K. (2014). Wound healing activity and mechanisms of action of an antibacterial protein from the venom of the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *PLoS ONE* 9: e80199. doi: 10.1371/journal.pone.0080199.

Sasa M., Vazquez S. (2003). Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990–2000. *Toxicon*, 41: 19-22.

Solís C., Escobar E., Yarlequé A., Gutiérrez S. (1999). Purificación y caracterización de la L-amino ácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "Jergón shushupe". *Rev. Peru. Biol.*, 6: 75-84.

Stiles B. G., Sexton F. W., Weinstein S. A. (1991). Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*, 29: 1129-1141.

Theakston R. D., Reid H. A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. World Health Organ.*, 61: 949-956.

Torii S., Yamane K., Mashima T., Haga N., Yamamoto K., Fox J. W., Naito M., Tsuruo T. (2000). Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with l-amino acid oxidase activity. *Biochemistry*, 39: 3197-3205.

Vignoli R., Seija V. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica.

Recuperado el 13 de abril del 2015, de
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>

Wong E. S. W., Belov K. (2012). Venom evolution through gene duplications. *Gene*, 496: 1-7.