

Análisis comparativo de la actividad hemolítica entre las subespecies *Crotalus molossus molossus* y *Crotalus molossus nigrescens*

A comparative analysis of hemolytic activity between *Crotalus molossus* and *Crotalus molossus nigrescens* subspecies

Macias-Rodríguez, E.F., Martínez-Martínez, A., Gatica-Colima, A., Bojórquez-Rangel, G., Plenge-Tellechea, L.F.*

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Av. Benjamin Franklin 4651 Zona Pronaf, C.P. 32310., A.P. 1595-D. Cd. Juárez, Chihuahua, México.

RESUMEN

La serpiente de cascabel de cola negra *Crotalus molossus* presenta cuatro subespecies distribuidas en el territorio nacional, dos de ellas se distribuyen dentro del estado de Chihuahua. Pocos trabajos se han realizado sobre la composición de veneno de crotálicos. En este trabajo realizamos un estudio comparativo del veneno de las subespecies *Crotalus m. molossus* y *Crotalus m. nigrescens* tomado en cuenta el grado de concentración proteica del veneno y por medio de su actividad hemolítica sobre placas de agarosa-eritrocitos humanos. El análisis estadístico se realizó por la prueba no paramétrica Mann Whitney a un IC_{95} . La concentración proteica de *Crotalus m. nigrescens* fue de 466 ± 35.0 mg mL⁻¹ y para *Crotalus m. molossus* de 449 ± 90.0 mg mL⁻¹, no hubo diferencias significativas a un IC_{95} ($p > 0.05$). El perfil proteico del veneno de *C. m. nigrescens* presentó dos bandas proteicas con masas moleculares elevadas de alrededor de 230 kDa en comparación con *Crotalus m. molossus*, las cuales fueron de 160 kDa aproximadamente. A la primer hora de exposición del veneno *Crotalus m. nigrescens* fue 18 % más hemolítico (156.7 ± 23.33 UHD) que *Crotalus m. molossus* (128 ± 23.32 UHD), a la siguiente hora presentó 20 % de hemólisis con valores de UHD de 116.7 ± 12.3 y de 94 ± 9.8 , respectivamente. El veneno de las dos subespecies no presentó diferencias estadísticas a un IC_{95} ($p > 0.05$ a una h y $p > 0.05$ a las dos h). De esta manera se

logra concluir que las dos muestras de las subespecies son proteómicamente iguales. Estas diferencias se pueden atribuir a los diferentes hábitos alimenticios debidos a la altitud, distribución geográfica y la época del año. Son necesarios más estudios del veneno de crotálicos.

ABSTRACT

Blacktailed rattlesnake (*Crotalus molossus*) has four subspecies distributed in México; two of them are distributed in Chihuahua. Literature shows that few studies have been done in order to analyze the composition of their venom. Therefore, this study was carried out to evaluate protein content and hemolytic damage by agarose-human erythrocyte substrate between the *Crotalus molossus nigrescens* and *Crotalus molossus molossus* subspecies. Mann Whitney's nonparametric test was used in order to get the statistics analysis at an IC_{95} . Protein concentration of *Crotalus m. nigrescens* was 466 ± 35.0 mg mL⁻¹ and *Crotalus m. molossus* of 449 ± 90.0 mg mL⁻¹ there was no statistical difference detected at IC_{95} ($p > 0.05$). The protein profile of the venom of *Crotalus m. nigrescens* showed two protein bands with elevated masses approximately 230 kDa in comparison with *Crotalus m. molossus* that was of 160 kDa approximately. *Crotalus m. nigrescens*'s venom was 18 % more hemolytic (156.7 ± 23.33 UHD) than *Crotalus m. molossus*'s (128 ± 23.32 UHD) at the first hour and 20 % more hemolytic at the second hour, with UHD values of 116.7 ± 12.3 and 94 ± 9.8 , respectively. The venom of the two subspecies did not show differences statistically at an IC_{95} at the first

PALABRAS CLAVE

Actividad hemolítica, *Crotalus molossus*, veneno, serpiente

Información del artículo

Recibido: 22 de enero de 2013.

Aceptado: 13 de diciembre de 2013.

*Autor corresponsal:

Plenge-Tellechea, L.F. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias, Químico-Biológicas, Av. Benjamin Franklin 4651 Zona Pronaf, C.P. 32310., Apartado Postal 1595-D. Cd. Juárez, Chihuahua, México. Tel.: +52(656) 688 1800 ext.1621. Correo electrónico: fplenge@uacj.mx.

hour ($p>0.05$) and second hour ($p>0.05$). It could be concluded that two subspecies samples showed equal proteomic characteristics. These differences can be attributed to the different eating habits due to the altitude, geographical distribution and the season. It can also be concluded that more investigation regarding venom of rattlesnakes is needed.

KEY WORDS

Hemolytic activity, *Crotalus molossus*, venom, snake.

Introducción

Entre los géneros de serpientes más venenosas en México se encuentran *Micrurus*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Bothriechis* y *Agkistrodon* (Lion, 2004). Las serpientes de cascabel presentan una amplia distribución en el territorio mexicano, donde se cuenta con 24 especies, donde todas se encuentran en alguna categoría de riesgo con base la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), esto se debe a que las comunidades humanas donde ellas habitan, las cazan por temor a una mordedura, con fines de protección, como alimento, para remedios médicos, por las modificaciones antropogénicas del hábitat al construir barreras disminuyendo el movimiento de los animales (Fitzgerald *et al.*, 2004; Campbell y Lamar, 2004). Al modificar el hábitat de los animales, estos quedan sujetos a la adaptación por la selección natural, estos cambios pueden influir en sus componentes de defensa como son un aumento en la toxicidad de sus venenos (Sánchez *et al.*, 2003). Las variaciones intraespecíficas y semejanza del veneno están relacionadas a muchos factores ambientales, estacionales, geográficos, edad, sexo y régimen alimenticio (Forstner *et al.*, 1997; Gómes, 2000; Dos-Santos *et al.*, 2005; French *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2005). Bush y Siedenburt (1999) observaron que los híbridos de *C. viridis helleri* y *C. scutulatus* presentaron un veneno de mayor toxicidad bajo condiciones en cautiverio. Se ha detectado que el veneno de todos los viperidos (*Crotalus* sp., *Bothrops* sp., *Lachesis* sp. entre otros) tienen en común proteínas y toxinas como lo son metaloproteinasas, serina proteasas y proteasas ricas en cisteínas (Mackessy, 2010).

La actividad hemolítica del veneno de *Crotalus durissus terrificus* ha sido medida por métodos cuantitativos, la cual consistió en someter eritrocitos de humanos, de ovejas y caballos en una mezcla de veneno de 200 serpientes, observando que al incrementarse la concentración de veneno hubo mayor actividad hemolítica (De Hurtado y Layrisse, 1964). Al comparar el veneno dentro de las familias Viperidae y Elapidae, encontraron que

solo en los géneros de crotálicos se observó mayor actividad hemolítica en comparación con los de Elapidae, ello debido a sus actividades proteolítica y hemorrágica (Soto *et al.*, 1988). Al caracterizar el veneno de *Crotalus durissus ruruima* y *C. d. terrificus*, se observaron dos patrones de coloración diferentes, entre el blanco y el amarillo, lo cual se atribuyó a la presencia de la enzima *L-aminoácido oxidasa* la que le confiere la coloración amarillenta. Sin embargo las actividades hemolíticas de ambos venenos si mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) (Dos Santos *et al.*, 1993). Al medir la actividad hemolítica del veneno contenido en la serpiente *Bothrops hyporrurus*, se observó que no causó una hemólisis directa, sino de tipo fosfolipasa A_2 (Bonilla y Zavaleta, 1997). Biardi y Coss (2011) midieron la actividad hemolítica y proteolítica del veneno de tres depredadores de la ardilla de las rocas, que son la serpiente del Pacífico *Crotalus oreganus helleri*, la serpiente diamante del oeste *Crotalus atrox* y la serpiente de las praderas *Crotalus v. viridis*, donde observaron que el suero producido por las ardillas es menos susceptible al veneno de estos dos últimos depredadores en comparación con la serpiente del Pacífico, a la cual la ardilla tiene más resistencia al veneno.

La serpiente *Crotalus molossus* presenta cuatro subespecies distribuidas en el territorio nacional (Lemos-Espinal y Smith, 2007), en el norte de Chihuahua se encuentran dos: *Crotalus molossus molossus* y *Crotalus molossus nigrescens*, estas subespecies se caracterizan por presentar la parte posterior de la cola de color negro, por lo cual reciben el nombre común de cascabel de cola negra. La característica que diferencia a *Crotalus m. nigrescens* es el tono más oscuro por todo el cuerpo en comparación al de *Crotalus m. molossus* el cual es más claro. El veneno que contiene *Crotalus molossus* es una mezcla compleja de componentes tóxico-enzimáticos que están formados por proteínas y por péptidos muy activos (López-Lozano *et al.*, 2006). La mezcla de estos componentes cuando actúan sobre la presa puede llegar a producir trastornos digestivos, neurotóxicos, miolíticos, hemostáticos, cardiotoxicos y anticoagulantes (Gómes, 2000). El objetivo de este estudio es determinar las diferencias entre dos subespecies de crotálicos por medio del patrón proteico de sus venenos y la actividad hemolítica.

Materiales y métodos

Veneno y serpientes

Las muestras de veneno crudo fueron obtenidas de siete ejemplares que se encuentran en el Laboratorio

de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA) de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, el cual cuenta con cinco ejemplares de *Crotalus molossus molossus* y dos ejemplares utilizados como control *Crotalus atrox* y *Crotalus tigris*. Las muestras de veneno de *Crotalus molossus nigrescens* fueron obtenidas de cinco ejemplares del Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Juriquilla. El veneno fue obtenido por extracción manual y mantenido a temperatura de -20 °C hasta su utilización. Todos los ejemplares fueron tratados bajo el menor estrés.

Caracterización del color del veneno

La caracterización del veneno de cada serpiente fue analizada por la coloración presente en cada extracción, la cual fue de un color amarillo que varió su tonalidad: claro (+), leve (++) , intenso (+++) e incoloro (-).

Determinación de concentración proteica

El contenido proteico de 12 muestras de veneno: cinco muestras de *Crotalus m. molossus*, cinco de *Crotalus m. nigrescens*, una de *Crotalus atrox* y una de *Crotalus tigris* se determinó por el método de Lowry et al., (1951) usando albumina sérica bovina (BSA) como curva patrón.

Visualización del contenido proteico

Las 12 muestras de veneno se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al método de Laemmli (1970) en un sistema Mini-Protean III Bio-Rad (USA). Se emplearon geles al 10 % (p/v) a un voltaje de 120 durante aproximadamente 45 min. Como marcadores de masa molecular media se utilizaron las siguientes proteínas: miosina (215 kDa), fosforilasa b (120 kDa), albúmina de suero bovino (84 kDa), albúmina de huevo (60 kDa), anhidrasa carbónica (39.2 kDa), inhibidor de tripsina (28 kDa) y lisozima (18.3 kDa).

Actividad hemolítica

La actividad hemolítica (hemólisis) fue medida en placas de Petri de agarosa-eritrocitos humanos de manera directa según el método de Bonilla y Zavaleta (1997). El sustrato en placa se preparó mezclando agarosa de alta electroendosmosis al 1 % (p/v)

y agarosa de baja electroendosmosis al 1 % (p/v) en amortiguador de acetato de sodio 0.05 M a un pH 7.5, la mezcla fue calentada hasta diluir la agarosa, se esperó a que enfriara, adicionando 2 mL de eritrocitos lavados previamente en solución salina glicina-NaCl (Glicina 0.1 M en Cloruro de sodio al 0.6 % (p/v) a pH 5.8) y posteriormente vaciado con cuidado a las cajas de Petri. Una vez solidificado el medio se realizaron orificios utilizando como molde las puntas delgadas de las pipetas Pasteur. Las placas de agarosa-eritrocitos fueron incubadas a 37 °C por 30 min y la reacción de hemólisis general fue iniciada por la adición del veneno crudo de la serpiente (0.05 mg) usando como control negativo solución salina 0.9 % (p/v). El grado de hemólisis fue visualizado mediante el halo formado por la reacción del veneno sobre los eritrocitos. El diámetro de hemólisis directa fue medido a un intervalo de 1, 2, 3 y 14 h mantenidas a la temperatura antes mencionada. La hemólisis se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{UHD} = \frac{\text{Diámetro de hemólisis directa (mm)}}{h \times \text{mg de proteína}}$$

Análisis estadístico de la variabilidad proteica y actividad hemolítica

Los datos obtenidos de la concentración proteica y la actividad hemolítica entre las dos subespecies fueron analizados por medio de la prueba no paramétrica Mann Whitney, manejando un intervalo de confianza del 95% (IC₉₅). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusión

Caracterización del veneno de *Crotalus m. molossus* y *Crotalus m. nigrescens*

Las serpientes presentaron diferente cantidad volumétrica y tonalidad de los venenos obtenidos por subespecie, siendo para *Crotalus m. molossus* entre amarillo intenso al amarillo leve 60 y 40 % respectivamente y *Crotalus m. nigrescens* amarillo leve 100 % (Tabla 1).

Dos Santos et al., (1993) caracterizaron el veneno de las serpientes *Crotalus durissus ruruima* y *C. d. terrificus* de color amarillo y blanco, respectivamente, siendo estas serpientes importantes por el alto grado de accidentes en la frontera de Venezuela y Brasil. El veneno amarillo toma

Tabla 1.
Volumen y tonalidad del veneno de las serpientes.

Serpiente	Tonalidad de color	Cantidad total extraída en μl
<i>Crotalus m. molossus</i> (n=5)	3 (+++) y 2(++)	246
<i>Crotalus m. nigrescens</i> (n=5)	5 (++)	130
<i>Crotalus atrox</i> (n=1)	++	300
<i>Crotalus tigris</i> (n=1)	-	60

esa coloración por la presencia de la L-aminoácido oxidasa (LAO). De acuerdo con Galán *et al.*, (2004) entre mas amarillo se encuentre el veneno es más tóxico, este estudio fue realizado con la serpiente del Pacífico *Crotalus helleri*. El veneno que presenta *Crotalus molossus* es de color amarillo por la presencia de la LAO, como lo menciona Mackessy, (2010). Lourenço *et al.*, (2013) al caracterizar el veneno de *Crotalus durissus terrificus* identificaron una proteína llamada crotamina, la cual es la que proporciona el color amarillo, esta puede ser considerada como la LAO.

La concentración proteica del veneno de *Crotalus m. molossus* de $449 \pm 90.0 \text{ mg mL}^{-1}$ fue menor en comparación a la de *Crotalus m. nigrescens* de $466 \pm 35.0 \text{ mg mL}^{-1}$. Por medio de la prueba de Mann-Whitney (*) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Los controles *Crotalus atrox* ($414 \pm 3.0 \text{ mg mL}^{-1}$) y *Crotalus tigris* ($414 \pm 2.0 \text{ mg mL}^{-1}$) tampoco presentaron diferencias significativas (*) a un IC_{95} ($p = 1.0 > 0.5$) (Figura 1).

El contenido proteico de *C. m. molossus* fue ligeramente menor que *C. m. nigrescens*, el primero presentó una

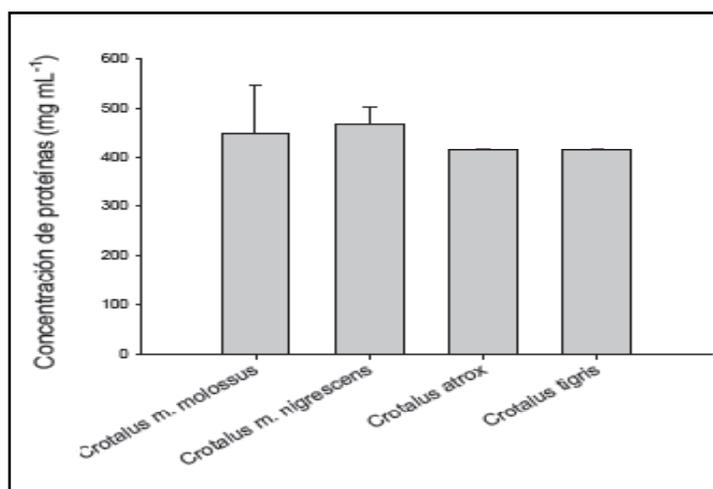


Figura 1. Concentración de proteínas del veneno de las subespecies - *Crotalus m. molossus*, *Crotalus m. nigrescens* y controles.

tonalidad de amarillo leve (++) e intensa, mientras que *Crotalus m. nigrescens* presentó una tonalidad amarillo leve (++) . Galán et al., (2004) quienes observaron que el veneno de *C. helleri* presentó los colores amarillo y blanco, siendo el de color amarillo cuatro veces más concentrado en una cantidad de 549 mg mL^{-1} en comparación con el veneno de color blanco que presentó una concentración de 135 mg mL^{-1} . Dos Santos et al., (1993) mencionan que el veneno de color amarillo de *C. durissus terrificus* y blanco de *C. d. ruuima* presentan una gran diferencia tanto en su concentración proteica como en su actividad enzimática siendo más tóxico el veneno de color amarillo. No solo hay una relación entre concentración proteica y el color, también pueden ser factores como la localidad de muestreo, la estacionalidad y condición (vida silvestre y cautiverio) como lo documenta Macias (2008) siendo el veneno de un individuo capturado en la estación de invierno (marzo) en vida silvestre mayor que en cautiverio, y el veneno de otoño en cautiverio mayor que en vida silvestre. Esto puede deberse a la disposición de la alimentación en vida silvestre.

Visualización de contenido proteico del veneno

En Figura 2 se observa el patrón de bandas de los venenos de: *Crotalus m. nigrescens* (A), *Crotalus m. molossus*, *Crotalus atrox* y *Crotalus tigris* (B), en los recuadros con línea azul se indican las proteínas que presentan en común, como lo son las de aproximadamente de 160 kDa, 90 kDa, 79 kDa, 29 kDa y 14.5 kDa, las cuales pueden ser las reportadas por

Mackessy (2010) (metaloproteinasas PIII, Serin-Proteasas, Metaloproteinasas P I, y las PLA₂). En el recuadro negro de la Figura 2, se muestran las proteínas que presenta *Crotalus m. nigrescens*, las cuales presentan una masa molecular similar a las de *Crotalus atrox* las cuales pueden ser las mismas proteínas. Por otra parte, el veneno control de *Crotalus tigris* se diferenció claramente por su patrón de bandeado y en la nitidez de bandas similares del resto de especies estudiadas. Se evidencian múltiples bandas de proteínas de los venenos de las serpientes, en donde se detectaron proteínas que se pudieron discriminar entre los ejemplares de estudio, dado que en el veneno de *Crotalus m. nigrescens* se observan dos proteínas de aproximadamente 230 y 260 kDa que no se logran observar en *Crotalus m. molossus*, excepto en la especie control *Crotalus atrox*, lo cual se estima que pudo deberse a la concentración de las proteínas del veneno más alta, debido al tipo de hábitat que presentan, su distribución geográfica y las condiciones estacionales (Gregory-Dwyer, 1986; Gómez, 2000 y Macias 2008). En los geles de poliacrilamida al 10 %, se observó que entre las propias subespecies presentaron un patrón de proteínas que se puede diferenciar entre las mismas. Mackessy (2010) en su análisis de la variación proteica de los venenos de las familias de serpientes venenosas, caracterizó el contenido proteico, en donde menciona que las metaloproteinasas de tipo 1 tienen una masa molecular de 21 y 50 kDa, las cuales también estuvieron presentes en el veneno de *Crotalus molossus molossus* (Figura 2).

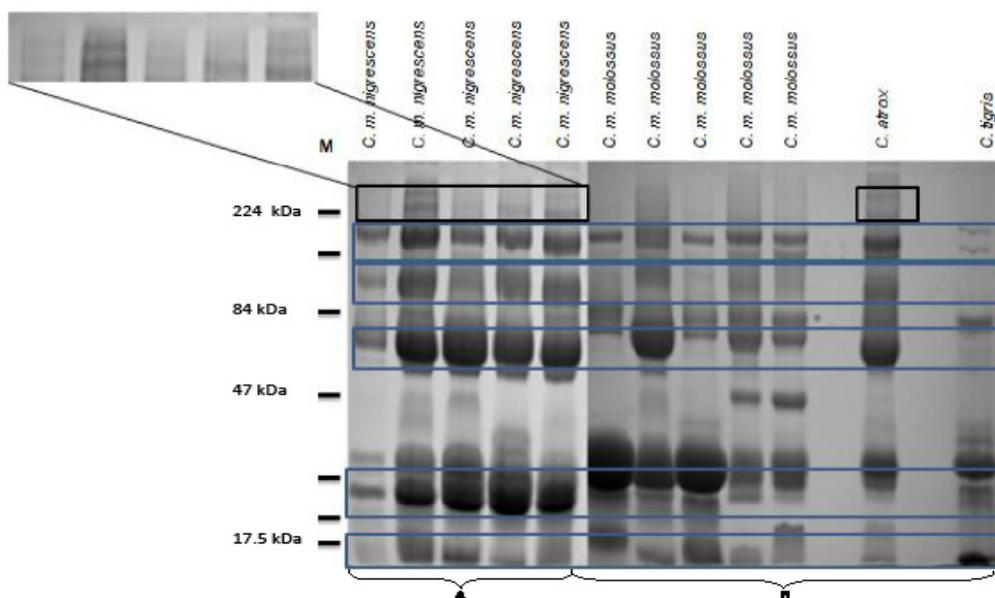


Figura 2. Visualización del contenido proteico del veneno de las serpientes en estudio por medio de electroforesis en gel al 10 % (p/v). Patrón de bandas proteicas de los venenos: (A) *Crotalus m. nigrescens*; (B) *Crotalus m. molossus*, *Crotalus atrox*.

Conforme a los resultados obtenidos de los venenos de las serpientes se pudo observar que entre las dos subespecies *Crotalus molossus molossus* y *Crotalus molossus nigrescens* se presentó una variación de proteínas. Estos resultados de la diversidad de patrón de bandas de proteínas son de importancia médica como una estimación de la toxicidad del veneno. Algunos autores como Gregory-Dwyer *et al.*, (1986) observaron que dependiendo de la época del año el incremento en la producción de veneno de las serpientes, muestran mayor concentración de proteínas en los meses de julio a octubre, de acuerdo a la distribución que presentan las serpientes, las propiedades del contenido proteico

serán diferentes (Rael *et al.*, 1997). Macias (2008) observó que de acuerdo a la época estacional así como de su distribución, si se presenta una diversidad proteica variada de algunas proteínas como las metaloproteinasas con una masa de 29 kDa, que fue de mayor masa molecular comparado con las de otras localidades.

Actividad hemolítica del veneno

Las mediciones del diámetro en mm de la actividad de hemólisis por cada hora de los halos hemolíticos formados, donde se colocó la concentración de 0.05 mg mL⁻¹ de veneno de cada serpiente (Tabla 2).

Tabla 2.
Actividad hemolítica por mg de veneno en 1, 2, 3 y 14 horas (h) a una concentración de 0.05 mg mL⁻¹ de proteína.

Serpiente	Medida (mm)			
	1 h	2 h	3 h	14 h
<i>C. m. molossus</i> (n=5)	6.4 ± 1.2	9.6 ± 0.8	11.4 ± 0.8	19.2 ± 1.5
<i>C. m. nigrescens</i> (n=5)	7.8 ± 1.2	11.7 ± 1.2	14.2 ± 1.6	17 ± 1.2
<i>C. atrox</i> (n=1)	4	4	7	10
<i>C. tigris</i> (n=1)	4	6	6	18.6

Los diámetros de los halos hemolíticos (Figura 3A) y las actividades hemolíticas (Figura 3B), entre *Crotalus m. molossus* y *Crotalus m. nigrescens* a 1, 2, 3 y 14 h por medio de la prueba no paramétrica de Mann Whitney no son significativamente diferentes a un IC del 95 % ($p > 0.05$).

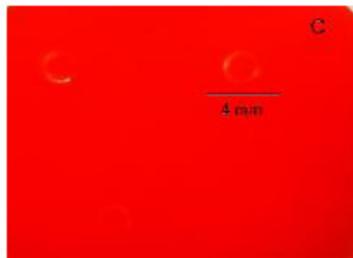
En *Crotalus m. nigrescens* se evidenció el mayor daño hemolítico a las dos primeras h con una medida de 11.7 mm (Figura 3A 2h B) en comparación con el de *Crotalus m. molossus* de 9.6 mm (Figura 3A 2h A), el cual siguió incrementando pero disminuyendo las UHD. A las 14 h se logró observar que el veneno de *Crotalus molossus molossus* presentó mayor halo hemolítico en comparación con el de *C. m. nigrescens*, en donde los controles fueron mucho menores. Dentro de la actividad hemolítica se logró observar que entre las dos subespecies no se encuentran diferencias, donde el veneno de *Crotalus m. molossus* fue menos he-

molítico que el de *C. m. nigrescens*. Pero aun así, mayor que las dos especies de cascabel control.

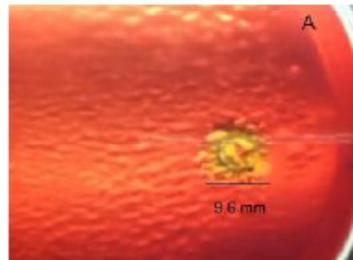
El veneno crudo de las subespecies de *Crotalus molossus* presentaron actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos, debido a que su veneno es mayormente hemolítico en comparación con las demás de su género (Sánchez *et al.*, 2001), sin embargo el veneno de los controles *Crotalus atrox* y *Crotalus tigris*, no presentó hemólisis en las primeras tres horas debido a que su veneno es mayormente neurotóxico (Gómez, 2000).

Dos Santos *et al.*, (1993) mencionan que el veneno de *Crotalus durissus terrificus* el cual es de color amarillo por la presencia de la enzima L-aminoácido oxidasa (LAO), es menos hemolítico en comparación a los de color blanco y amarillo que presenta *Crotalus durissus ruruima*, dado a que este último convierte más rápido la lecitina en lisolecitina, lisando más rápido a los glóbulos rojos (Dos Santos *et*

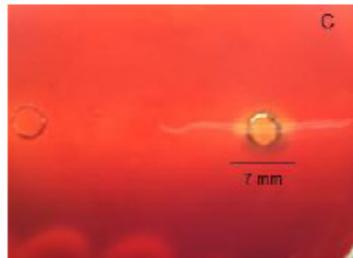
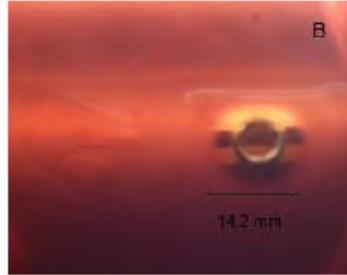
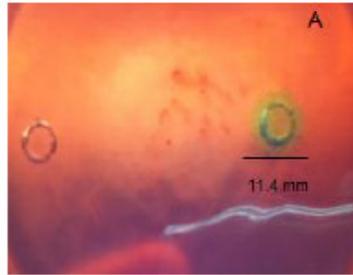
A
1 hora



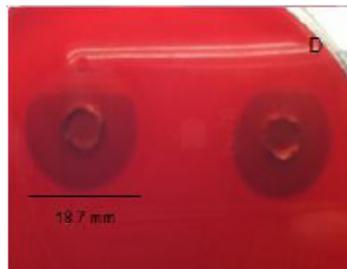
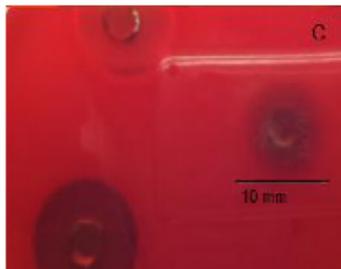
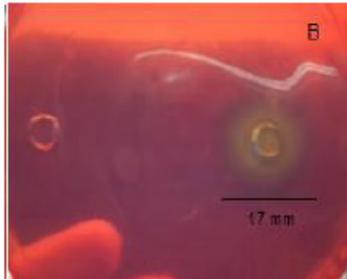
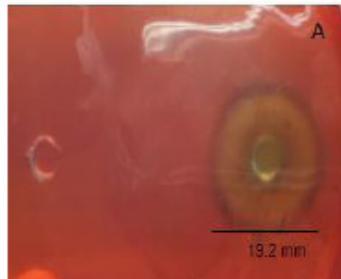
2 horas



3 horas



14 horas



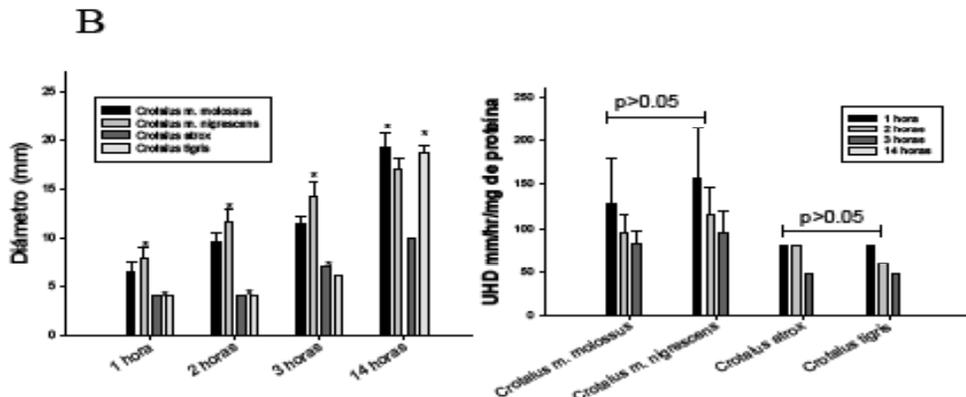


Figura 3. A) Las imágenes muestran el análisis comparativo de halo hemolítico a la de exposición al veneno *Crotalus m. molossus* (A), *Crotalus m. nigrescens* (B), *Crotalus atrox* (C) y *Crotalus tigris* (D), a diferentes horas, B) Las graficas expresan los valores de la actividad hemolítica, en diámetro de hemólisis (mm) y las unidades de hemólisis directa (UHD) por especie.

al., 1988). Lourenço et al., (2013) al caracterizar el veneno de *Crotalus durissus terrificus* identificaron una proteína llamada crotamina, la cual es la que proporciona el color amarillo, esta puede ser considerada como la LAO a la presencia en la coloración del veneno. El veneno que presenta *Crotalus molossus* es de color amarillo por la presencia de la LAO, como lo menciona Mackessy, (2010), siendo en este estudio mas hemolítico en comparación con el del control *Crotalus tigris* el cual es de color transparente. Por su parte Bonilla y Zavaleta (1997) no observaron actividad hemolítica en eritrocitos humanos del veneno de *Bothrops hyoprurus* ni en las fracciones obtenidas del veneno, como con el veneno crudo, pero si observaron actividad de la fosfolipasa atacando directamente sobre la lecitina de yema de huevo.

De Hurtado y Layrissé (1964) demostraron que al aumentar la concentración del veneno sobre los eritrocitos de caballo y oveja al dejarlas dos h en incubación a 37 °C, incrementaba el porcentaje de la actividad hemolítica hasta un 80%, y mencionan que mientras la concentración sea baja, la hemolisis es menos pronunciada. Por su parte, Soto et al., (1988) obtuvieron una actividad hemolítica de 85 % después de dos h de incubación a 37 °C en todos los venenos sobre los sistemas de eritrocitos de conejo con yema de huevo y solo dos venenos no presentaron hemolisis, el diámetro promedio de hemolisis obtenido fue de 10 mm en un 75 % de los venenos analizados, y solo un veneno de *Triemesurus albolaris* presentó un halo hemolítico de 16 mm.

Conclusiones

De las muestras de veneno de *Crotalus molossus nigrescens* se observaron dos proteínas de entre 230-260 kDa que no se lograron observar en las muestras de *Crotalus molossus molossus*.

Con respecto a la actividad hemolítica, se observó que el veneno de *Crotalus molossus nigrescens* presentó un mayor daño hemolítico en comparación con *Crotalus molossus molossus*, pero su actividad continua evidente a las 14 h con respecto al de *C. m. nigrescens* el cual es menor. Lo cual sugiere que se necesitan realizar más estudios sobre el veneno de estas subespecies, tales como geles electroforéticos en segunda dimensión y genómica.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas a través del Proyecto SF-CGIP Toxinas de Origen Animal UACJ 2009 y CONABIO GT032. Agradecemos a la Bióloga Sandra Cruz por los ejemplares donados del Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Juriquilla. Al Dr. Manuel Miranda de la Universidad de Texas en El Paso (UTEP) por su ayuda en parte de los experimentos realizados en su laboratorio.

Literatura citada

- Bush, S.P. y Siedenburg, E. 1999. Neurotoxicity associated with suspected southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*) envenomation, *Wilderness Environmental Medicine* 10, 247–249.
- Biardi, J.E. y Coss, R.G. 2011. Rock squirrel (*Spermophilus variegatus*) blood sera effects proteolytic and hemolytic activities of rattlesnake venoms. *Toxicon* 57, 323-331.
- Bonilla, C. y Zavaleta, A. 1997. Estudio Bioquímico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprurus*. *Revista de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Salud*, XIV (2) 18-32.
- Campbell, J.A. y Lamar, W.W. 2004. "Regional accounts & keys to venomous snakes- México & Central America." In Campbell, J. A. and W. W. Lamar (Eds.). 2004. The venomous reptiles of Latin America. Cornell University Press, Ithaca. 24-33 pp.
- Diario Oficial de la federación. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL 2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- De Hurtado, I. y Layrisse, M. 1964. A quantitative method for the assay of snake venom hemolytic activity. *Toxicon* 2: 43-49.
- Dos Santos, M.C., Ferreira, L.C.L., Dias Da Silva, W. y D. Furtado, M.F. 1993. Caracterización de Las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 31: 1459-1469.
- Dos Santos, M.C., Diniz, C.R., Pacheco W. y Dias Da Silva, W. 1988. Phospholipase A2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 26(2): 207-213.
- Dos-Santos, M.C., De Assis, E.B., Moreira, T.D., Pinheiro J. y Fortes-Dias C.L. 2005. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. *Toxicon* 46: 958-961.
- Fitzgerald, L.A., Painter, C.W., Reuter, A. y Hoover, C. 2004. Collection, trade, and regulation of reptiles and amphibians of the Chihuahua desert ecoregion. *Traffic North America. World Wildlife Fund* 113.
- Forstner, M.R.J., Hilsenbeck, R.A. y Scudday, J.F. 1997. Geographic Variation in Whole Venom Profiles from the Mottled Rock Rattlesnake (*Crotalus lepidus lepidus*) in Texas. *Journal of Herpetology*, 31(2): 277-287.
- French, W. J., Hayes, W. K., Bush, S. P., Cardwell, M. D., Bader, J. O. y Rael, E. D. 2004. Mojave toxin in venom of *Crotalus helleri* (Southern Pacific Rattlesnake): molecular and geographic characterization. *Toxicon* 44: 781-791
- Galán, J.A., Sánchez E.E., Rodríguez-Acosta, A. y Pérez, J.C. 2004. Neutralization of venoms from two Southern Pacific Rattlesnakes (*Crotalus helleri*) with commercial antivenoms and endothermic animal sera. *Toxicon* 43. 791–799.
- Gómes, T. 2000. Estudio comparativo de la composición bioquímica del veneno en serpientes venenosas de Aguascalientes. *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* 47.
- Gregory-Dwyer, V.M., Egen, N.B., Bosisio, A.B., Righetti, P.G. y Russell, F.E. 1986. An isoelectric focusing study of seasonal variation in rattlesnake venom proteins. *Toxicon* 24(10): 995-1000.
- Jurado, J.D., Rael, E.D., Lieb C.S., Nakayasu, E., Hayes, W.K., Bush, S.P. y Ross, J.A. 2007. Complement inactivating proteins and intraspecies venom variation in *Crotalus oreganus helleri*. *Toxicon* 49: 339–350.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lemos-Espinal, J.A. y Smith H.M. 2007. Anfibios y Reptiles del Estado de Chihuahua, México. *CONABIO* 613.
- Lión, V., Rojas A. y Rodríguez-Acosta A. 2004. Diseño de una prueba de aglutinación en látex, para detectar venenos de serpientes Viperidae en sueros de pacientes. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56(1): 13-20.
- López-Lozano J.L., Valle de Sousa, M., O. Ricarta, C., Chávez-Olorteguic, Flores Sanchez, E., G. Munizb, E., et al. 2002. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest.
- Loureço Jr., A., Zorzella-Creste, C.F., Curtolo de Barros, L. Delazari dos Santos, L., Pimenta D., Barraviera, B. et al. 2013. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crota mine assessment and captivity evaluation on the biological activities. *Toxicon* 69: 75-81.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.

- Macias-Rodríguez, E.F. 2008. Variación estacional del contenido proteico del veneno de la serpiente *Crotalus molossus molossus*. Tesis de licenciatura en biología. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. 69 pp.
- Mackesy, S.P. 2010. Handbook of venoms and toxins of reptiles. CRC Press Taylor y Francis Group. Capítulo 1, 3-19 pp.
- Rael, E.D., Rivas, J.Z., Chen, T., Maddux, N., Huizar, E. y Lieb, C.S. 1997. Differences in Fibrinolysis and Complement Inactivation by Venom Different Northern Blacktailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus molossus*). *Toxicon* 35(4): 505-513.
- Sánchez, E.E., Solís, L.A., Ramírez, M.S. y Pérez, J.C. 2001. Partial characterization of a basic protein from *Crotalus molossus molossus* (northern blacktail rattlesnake) venom and production of a monoclonal antibody. *Toxicon* 39: 523-537.
- Sánchez, E.E., Galán, J.A., Perez, J.C., Rodríguez-Acosta, A., Chase, P. B. y Pérez, J.C. 2003. The efficacy of two antivenoms against the venom of North American snakes. *Toxicon* 41: 357-365.
- Soto, J.G., Perez, J.C. y Minton S.A. 1988. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snakes venoms. *Toxicon* 26(9): 875-882.

Como citar este artículo: Macias-Rodríguez, E.F., Martínez-Martínez, A., Gatica-Colima, A., Bórrquez-Rangel, G., Plenge-Tellechea, L.F. (2014). Análisis comparativo de la actividad hemolítica entre las subespecies *Crotalus molossus molossus* y *Crotalus molossus nigrescens*. *Revista Bio Ciencias* 2(4): 302-312.

