

¿Protegen los venenos de serpientes ante otros antígenos?

Dres Ángel Alonso, Krikor Mouchián, Julio F Albónico

División Alergia e Inmunología. Hospital de Clínicas. UBA. Asociación Médica Argentina. Sociedad Científica Argentina. Asociación Química Argentina. Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Se exponen datos sobre la antigenicidad del *Triatoma infestans* (Ti), de la *Periplaneta americana* (Pa) y de algunos venenos de serpientes, así como la importancia de que los pacientes mordidos por ellas exhibieran títulos de anticuerpos anti-Ti y anti-Pa más elevados que los no mordidos.

Palabras claves. Veneno de víbora, alérgenos respiratorios, influencia de los venenos, factores fisicoquímicos.

Do Snake Venoms Protect from other Antigens?

Summary

Data on the antigenicity of *Triatoma infestans* (Ti), *Periplaneta americana* (Pa) and some snake venoms are presented, as well as the importance of patients bitten by them, exhibiting higher anti-Ti and anti-Pa antibodies titers than those not bitten.

Keywords. Viper venom, respiratory allergens, influence of venoms, physicochemical factors.

Introducción

En publicaciones anteriores se detectaron pacientes mordidos por una serpiente que recibieron tratamiento intensivo y superaron el infaus- to episodio.¹⁻²⁻³ Los hechos habían ocurrido en las provincias de Corrientes, Chaco y Formosa y requirieron un intenso tratamiento farmacológico para superar el cuadro general y respiratorio. En publicaciones previas habíamos estudiado que las glucoproteínas del exoesqueleto del reduviedo *Triatoma infestans* (Ti) eran capaces de producir una respuesta específica IgE dependiente en sujetos atópicos con síntomas de rinitis y asma bronquial, especialmente en las provincias norteañas de nuestro país.⁴⁻⁵ Curiosamente varios de estos pacientes respiratorios habían sido mordidos años atrás por alguna serpiente del lugar, en especial aquellos dedicados a las tareas rurales y agropecuarias. (Figura 1). De los 35 pacientes estudiados por su alergia respiratoria al Ti y a la Pa, tan sólo 8 manifestaron algún accidente previo con una serpiente del lugar, que superaron con tratamiento médico urgente y adecuado, pero todos ellos señalaron un empeoramiento notable de su malestar respiratorio.⁶⁻⁷ Debido a esos relatos investigamos si algún factor vinculado con el veneno de la serpiente podría ser el agravante del cuadro alérgico-respiratorio, o si el accidente con el ofidio modificó la sensibilidad personal del paciente por las características dramáticas del suceso. Entre los 8 pacientes, 4 de ellos habían sido mordidos 2 veces en un lapso de 2 y 3 años. Estos casos habían padecido episodios agudos de urticaria y de angioedema que requirieron tratamiento intensivo y prolongado. La especie agresiva fue la *Bothrops*, comúnmente llamada yarará o víbora de la cruz. (Figura 2). Al mismo tiempo, tomamos conocimiento de la publicación de la reacción cruzada

Correspondencia: Dr Ángel Alonso
Correo electrónico: alehclin@fmed.uba.ar

Figura 1. Fraccionamiento de Ba por DEAE-celulosa. Seis picos proteicos se observan a 280 nm.

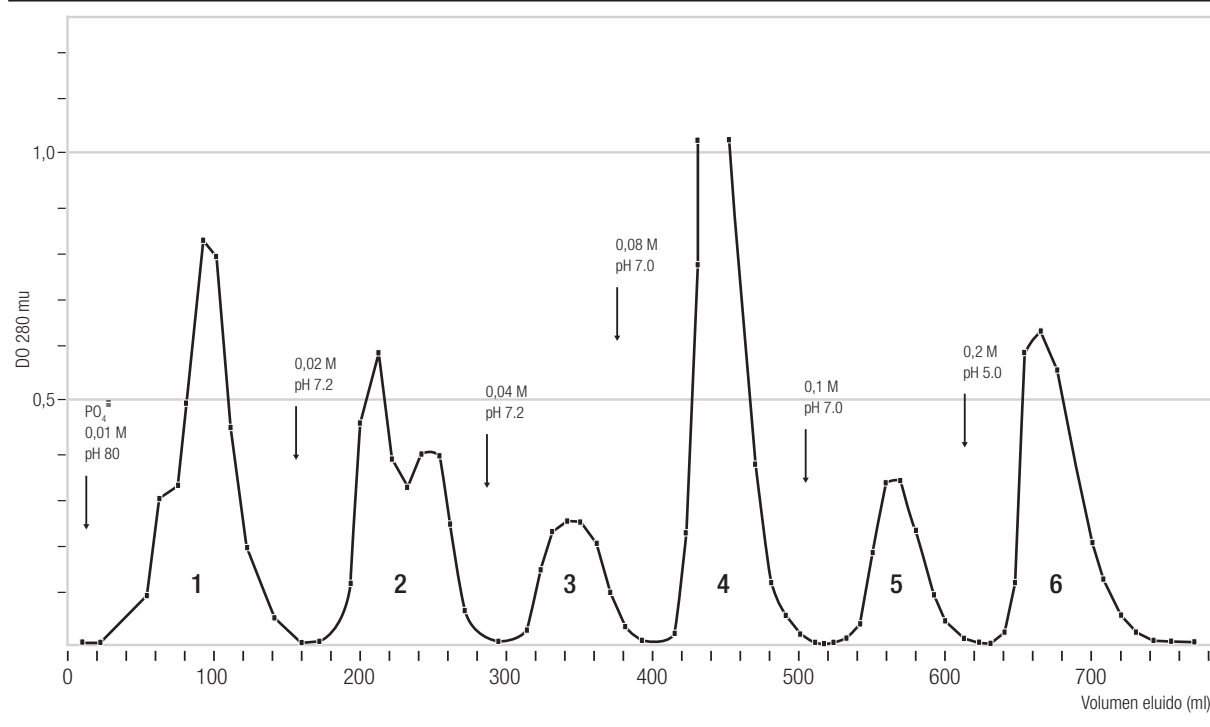
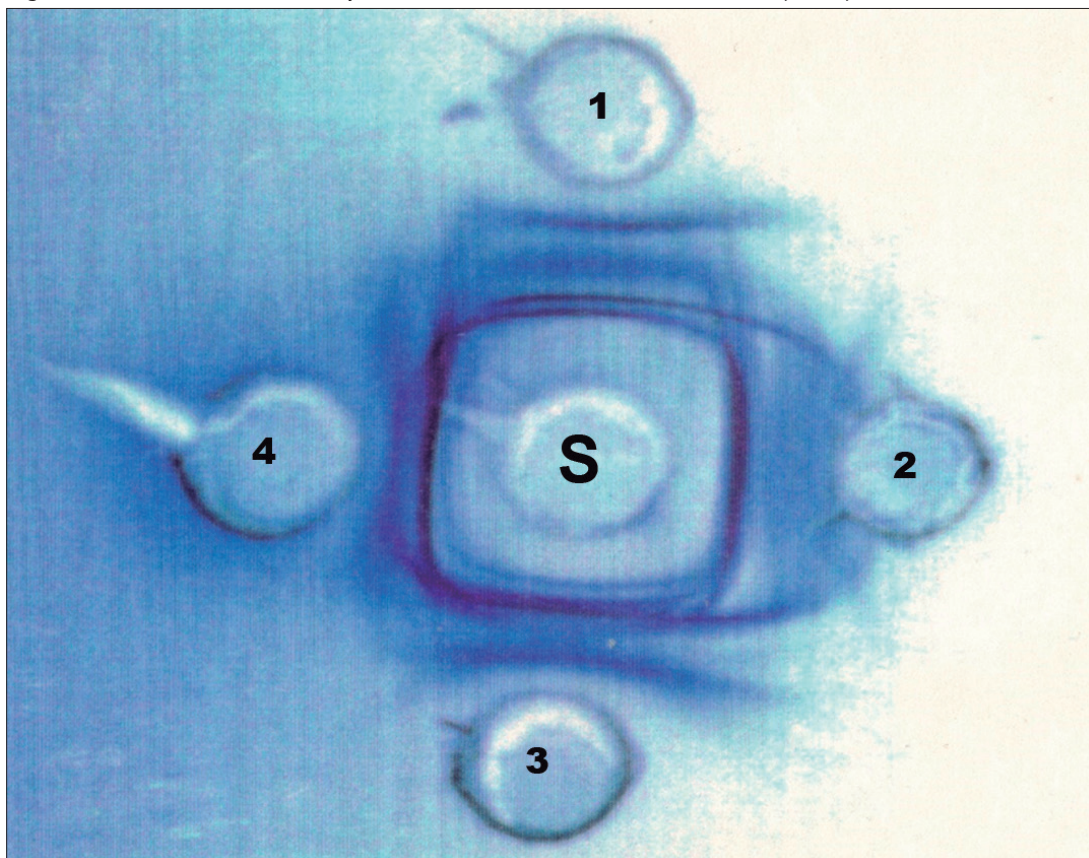


Figura 2. Técnica de Ouchterlony. S: suero anti-Ba + Bn; 1: Ba; 2: Bn; 3: Bj; 4: Bju.



Se observan 6 bandas de precipitación con identidades parcial y completa.

entre los antígenos de las serpientes *Bothrops alternata*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedi*, y algunos Himenópteros en pacientes de los Estados Unidos, destacando que las *Bothrops* inoculan venenos que en un 70-80% son proteínas, de las familias de las fosfolipasas, proteasas, neurotoxinas, algunas simil-trombina, todas ellas altamente antigénicas y productoras de importantes actividades biológicas. Estos curiosos hallazgos nos movieron a investigar las posibles relaciones fisicoquímicas entre los venenos de nuestras serpientes y el Ti, reduciendo que parasita nuestro país desde el Río Negro hasta más allá del norte argentino, ya que fue identificado en el Estado de Texas como productor de urticaria, y peor aún, de infección parasitaria en trabajadores rurales de la zona con serología positiva por su picadura.⁸⁻⁹

Materiales y métodos

1.- Venenos de serpientes: extractos crudos de los venenos de *Bothrops alternata* (V5250), *Bothrops jararaca* (V5625), *Bothrops jararacussu* (V3876) y de *Bothrops neuwiedi* (V5500) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), fueron solubilizados en buffer-fosfato (PBS) pH 7,2 hasta obtener una concentración final de 10 mg/ml. De esta manera, estos ex-

tractos fueron utilizados en el fraccionamiento por DEAE-celulosa, en todas las técnicas inmunoserológicas y en los procedimientos del RAST y del RAST-inhibición.¹²⁻¹³⁻¹⁴

2.- Pacientes: de los 35 pacientes estudiados por su alergia respiratoria, especialmente al Ti y a la Pa, todos oriundos de las provincias de Corrientes, Chaco y Formosa, sólo 8 refirieron haber sido mordidos una o dos veces por una serpiente de las especies señaladas más arriba. Clínicamente padecían del síndrome rinitis-asma bronquial, con probada sensibilidad a los alérgenos de los ácaros del ambiente, las cucarachas (*Periplaneta americana* y *Blattella germanica*), los hongos anemófilos y los antígenos del Ti. Todos los pacientes donaron una muestra de su suero sanguíneo en el cual se valoraron la cantidad y la calidad de sus anticuerpos IgG e IgE totales y específicos contra estos alérgenos ambientales, y sus anticuerpos contra los venenos de las serpientes que los mordieron. Un grupo control de 20 pacientes residentes en la ciudad de Buenos Aires, 12 varones y 8 mujeres, con edades entre 28 y 35 años, sin antecedentes de mordedura de serpiente y sin sintomatología respiratoria, presentaron una IgE sérica total igual o menor a 50 KU/L, con pruebas cutáneas negativas a los alérgenos ambientales. (Figuras 3)

Figura 3. Fracciones de la Cromatografía en DEAE – Celulosa de Veneno *B. Alternata* INMUNOELECTROFORESIS.

Frac. N°	Tubos	Buffer	Molar.	pH	IEF • fracción • control
1	18-35	PO ₄ ⁼	0.01	8.0	— —
2	69-86	PO ₄ ⁼	0.02	7.2	— —
3	110-125	PO ₄ ⁼	0.04	7.2	— —
4	166-182	PO ₄ ⁼	0.08	7.0	— —
5	206-218	PO ₄ ⁼	0.1	7.0	— —
6	330-338	PO ₄ ⁼	0.2	5.0	— —

3.- Fraccionamiento por columna: 5 mililitros del extracto crudo de *Bothrops alternata* fueron dializados con un buffer fosfato 0,01 M, pH 8, y luego pasado por una columna de DEAE-celulosa de 380 mm x 25 mm. La elución final se realizó con un buffer fosfato 0,01-0,2 M de pH 5-8. Los contenidos proteicos fueron determinados por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro LKB Uvicord, siguiendo el procedimiento de Lowry.

4.- Antisueros: los humanos mordidos por las serpientes recibieron en algún momento de su tratamiento sueros antiofídicos de caballo, en general con buena tolerancia, con excepción de uno de ellos que sufrió un episodio de urticaria aguda; éste requirió dosis elevadas de dexametasona inyectable. Los mismos antisueros antiveneno de serpiente se

comportan como marcadores proteicos del accidente ocurrido años atrás, y de alguna manera hubieran modificado la respuesta inmune a IgE para nuestro antígeno del Ti. En las técnicas serológicas mencionadas se utilizaron sueros controles de sujetos notópicos que además nunca habían sido mordidos por una serpiente. El Boyden demostró el título de anticuerpos anti-veneno y el Ouchterlony ratificó la reactividad cruzada entre los venenos de las diferentes especies de serpientes. Los antígenos se usaron a razón de 10 mg/ml cada uno.

5.- Radioinmunoensayos: la IgE sérica total fue medida por el método del PRIST (*paper radio-immunosorbent test*) siguiendo las especificaciones de Phadebas, Pharmacia, Uppsala, Suecia. Los niveles de la IgE sérica total se expresan en KU/L.

Por su parte, la inhibición del RAST se desarrolló de acuerdo a la técnica de Gleich empleando como antígeno a la *Bothrops alternata* mientras que para establecer la especificidad de la reacción se utilizaron antígenos de la *Crotalus durissus*, en especial, su veneno, los pólenes de *Ambrosia* y de *Lolium perenne*, del pelo del gato y los aislados del Ti. Un extracto de las estructuras exoesqueléticas del Ti, fue preparado por nosotros siguiendo las pautas metodológicas de Frugoni y Hansen. Los Ti fueron seleccionados entre otras especies fitófagas, según las reglas entomológicas establecidas. La IgE sérica humana anti-Ti se midió por el PRIST, siguiendo las pautas clásicas. Los valores para los adultos normales no deberían exceder las 120 KU/L, mientras que la IgE sérica específica contra un determinado antígeno no debería existir, salvo que el paciente hubiese estado expuesto a dicho antígeno a raíz de una mordedura o picadura de serpiente o insecto. La IgE-anti-Ti se midió con el RAST (*radioallergosorbentest*) donde una fase sólida de Ti (13 mg/ml) unida covalentemente a discos de celulosa (SS547) tratados con bromuro de cianógeno a pH 11 durante 2 horas en un medio alcalino. Se midió en PRU/ml (Phadebas RAST Units), con la escala siguiente: menor a 0,35 PRU/ml, sin significación; hasta 0,70 PRU/ml con significación o clase 1; entre 0,70 y 3,50 PRU/ml, clase 2; entre 3,50 y 17 será la clase 3, y así sucesivamente hasta clase 10, donde los valores de los antígenos serían elevadísimos. La inhibición del RAST se emplea para valorar la especificidad del RAST contra un antígeno. Se compara la reacción obtenida con aquella lograda con antígenos no relacionados, generalmente, pólenes de diversas familias, pelos de animales (perro, gato),

que aparecerán negativos y así ratificarán la especificidad de la reacción estudiada y las propiedades del antígeno.¹⁰⁻¹¹

6.- Ensayos inhibitorios y Western-blots: el lavado y la incubación de los geles se realizó con y sin los inhibidores de las proteasas. Ellos fueron: el E-64 o L-trans-epoxi-succinil-leucilamido (4-guanidino)-butano en 20 mM; el TLC (tosil-lisil-cloro-metilcetona) en 100 mM; el TPCK (tosil-fenil-alanil-cloro-metilcetona) en 1 mM; el PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) en 10 mM; la leupeptina en 100 mM; la o-fenantrolinea 1 mM y la pepstatina-A en 2 mM. Los pesos moleculares fueron: fosforilasa-b (97,4 kDa), albúmina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de la tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa). En los geles activados, las muestras no fueron ni reducidas ni calentadas antes de la siembra. Las muestras con y sin b-mercaptoetanol fueron corridas en SDS-PAGE con el 15% de poliacrilamida estándar, electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas durante 2 horas con una solución de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 2%, Tween-20 al 0,01% en PBS pH 7,2 v/v, e incubadas durante toda la noche con suero de conejo policlonal anti-Ti/400, un suero humano anti-Ti 1/10 y un suero humano anti-Pa 1/5. Se incubaron toda la noche con los antisueros, las membranas se lavaron e incubaron con un 1/3000 de suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, y con 1/500 de suero de conejo anti-IgE específica conjugado con peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente. La colorimetría se realizó con α -cloronaftol y peróxido de hidrógeno. (Tabla 1)

Tabla 1. Respuesta inmune humoral al veneno de *Bothrops*.

Antígenos	Ouchterlony		Boyden	
	Suero equino anti Ba+Bn	Sueros humanos mordidos (n=18)	Suero equino anti Ba+Bn	Sueros humanos mordidos (n=18)
Ba	+++	-	Títulos	1/128
Bn	+++	-	Mayores a	1/128
Bj	+++	-	1/32.000	1/64
Bju	+++	-		1/32

+++ : Se observan 6 o más líneas de precipitación.

7.- Isoelectroenfoco: se usó gel de agarosa con un pH entre 4.0-6.5 con las especificaciones de Bio-Rad. Se emplearon como monitores del gradiente de pH marcadores proteicos con pH entre 3,5-9,5. El pH de cada banda individual se determinó por la curva de calibración de las proteínas estándar. Luego de la corrida, la mitad del gel fue

removida, fijada por una hora y coloreada durante 20 minutos en azul de Coomassie R-250 al 0,1%, calentado a 60° C.

8.- Electroforesis capilar: se desarrolló en el laboratorio de Bio-Rad (Hércules, California, EE.UU.), en un Bio-Focus 3000 siguiendo las pautas del laboratorio en tiempo y potencia eléctrica. Se corrieron

antígenos de la Pa, del Ti y de sus respectivos estadios ninfales. Así se probó la reactividad cruzada entre ambos a concentraciones equivalentes.

9.- Electroforesis en poliacrilamida: SDS-PAGE (según Laemmli) al 15%, corriéndolo en un aparato Mini-Protean II. Veinte µl de Ti y de Pa fueron cargados en orificios separados con azul brillante de Coomassie en condiciones diferentes de reducción y calentamiento para luego ser transferidos a una membrana de nitrocelulosa.

10.- Ensayos de actividad enzimática: se corrieron durante 2 hs a 130 V minigels de 10x10 cm cada uno y de 1,5 mm de espesor de acrilamida al 12% más gelatina a una concentración final del 0,2%. Se usó el azul de bromofenol como marcador del fin de la corrida; los geles se lavaron 2 veces en agua destilada con Tritón-X-100, al 0,15%, por 15 minutos y se incubaron a 37° C en 0,1% de MES (2-N-morfolino-etano-ácido sulfónico), bufferado a pH 6, en Tris-AcH 100 mM a pH 3,5 y en Tris-ClH 100 mM a pH 8,5 con 0,5 mM de DTT. La reacción se detuvo y las proteínas se colorearon por incubación con 0,25 ml de azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-ácido acético-agua 5:1:5 (v/v/v).

Resultados

El pasaje por columna del veneno de *Bothrops alternata* reveló la producción de 6 picos proteicos a diferentes pHs, desde 5 hasta 8, y diferentes molaridades desde 0,2 M hasta 0,01 M. Por su parte, el fraccionamiento del extracto de Ti por una columna de Sephadex G-150 obtuvo 3 picos proteicos correspondientes a los tubos 18-21, 22 y 45-55, y 3 picos con gran contenido de hexosas en los tubos 15-25, 36 y 42-48. El método de Bradford reveló los contenidos proteicos: extracto de Ti: 13 mg/ml; tubo 20: 3600 mcg/ml; tubo 22: 150 mcg/ml y tubo 50: 6800 mcg/ml. El método del indol detectó las siguientes hexosas: extracto de Ti: 920 mg%; tubo 20: 240 mg%; tubo 36: 30 mg% y tubo 45: 600 mg%. De estos hallazgos se deduce la composición glucoproteica del extracto de Ti. Con el colector de fracciones se lograron alícuotas de 1 ml donde se estudió el peso molecular del extracto de Ti. De esta manera se obtuvieron 7 picos, correspondientes a la lisozima, beta-lactoglobulina, tripsinógeno, pepsina, albúmina de huevo, albúmina sérica bovina y alcohol-dehidrogenasa. Cada pico fue testificado por Ouchterlony contra un antisuero de conejo anti-Ti y contra un antisuero contra la albúmina sérica bovina. Se detectaron bandas de precipitación con albúmina sérica bovina en el segundo tubo, mientras que el Ti mostró bandas de precipitación entre la alcohol-dehidrogenasa y la albúmina sérica bovina. Los pesos moleculares de los 7 indicadores proteicos fueron transportados a una escala semilogarítmica que en la abscisa indicaba la relación entre los volúmenes de elución y muerto y, en la ordenada, los kilodal-

tons. El valor extrapolado del extracto de Ti resultó de 92 kDa. La inmunización en conejos con el extracto de Ti posibilitó obtener un antisuero anti-Ti que exhibió 3 bandas de precipitación por Ouchterlony, mientras que el anti-Ti fue negativo contra los extractos de *Dermatophagoides* y de *Ambrosia*, mientras que con la contraelectroforesis y la rocketelectroforesis se evidenciaron precipitinas en el sistema Ti-anti-Ti, y en forma cruzada con la Pa, más notorias en aquellos sujetos mordidos por una serpiente. El Boyden mostró altos títulos de anticuerpos (1:4096) en la reacción Ti-anti-Ti y un título de 1:512 en las reacciones cruzadas con la Pa. Las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada hechas en cobayos aerosolizados con Ti fueron positivas desde la 5ª semana de inhalación crónica, mientras que la prueba de anafilaxia pasiva (test de Ovary-Bier) fue positiva desde la 6ª semana. La IgE sérica total de los atópicos estudiados tuvo un promedio de 640 KU/l mientras que las IgE-anti-Ti de los 8 pacientes mordidos reunían el 50% del total de las IgE-anti-Ti dosadas y 27 pacientes sensibles al Ti componían el 50% restante con elevada IgE-anti-Ti, no obstante compartir el mismo ambiente. El análisis del veneno de *Bothrops* reveló por DEAE-celulosa su compleja composición proteica, con 6 componentes en los tubos 18-35, 69-86, 110-125, 166-182, 206-218 y 330-338, cuya riqueza proteica fue revelada por el Lowry, en la misma secuencia, de 240 µg/ml, 1750 µg/ml, 600 µg/ml, 3560 µg/ml, 1200 µg/ml y 1650 µg/ml.

Discusión

Los datos obtenidos en seres humanos sobre la dinámica de los anticuerpos IgE-anti-Ti, y anti-Pa, por la presunta influencia de los venenos de *Bothrops*, y la persistencia en el tiempo de altos títulos de dichos anticuerpos en un grupo de pacientes residentes del norte argentino, amerita mayor investigación por lo novedoso del hallazgo.¹⁶ No obstante, la vinchuca es capaz de producir cuadros respiratorios al inhalar crónicamente desechos de parásitos muertos y momificados en el suelo de nuestra pampa. Desde 1964, en que Voorhost demostró el papel del ácaro *Dermatophagoides* en la rinitis y en el asma bronquial, se indujo la investigación de otros insectos ambientales como la cucaracha (*Periplaneta americana*), el *Triatoma infestans* (Ti), la *Blomia tropicalis* y otros, que develaron su papel en patologías respiratorias en las cuales la IgE juega un papel etiopatogénico importante. La prueba de la doble difusión de Ouchterlony ratifica la composición cruzada entre las especies de *Bothrops alternata*, *neuwiedii*, *jararaca* y *jararacussu*, de tal manera que conocer con exactitud cuál mordió a nuestros pacientes no ayuda, pues todos los venenos poseerían una composición química parecida, cuya función como “adyuvante” del alérgeno (si es que la tiene) estaría omnipresente, más aún cuando los mordidos actualmente residen

en la CABA. La existencia de una IgE específica contra los venenos de Bothrops ya fue demostrada en 1995 en sujetos no alérgicos cuya evolución fue satisfactoria, así como también se observaron valores de IgG específica anti-veneno en títulos desde 1/32 a 1/128, empleando como antígeno una suspensión de Bothrops alternata. La reactividad cruzada con el veneno de Crotalus durissus terrificus necesita mayor investigación por la importancia biológica, clínica y epidemiológica que ello implica.¹²⁻¹⁶

Bibliografía

1. Envenenamiento por serpientes. Centro Nacional de Intoxicaciones. [Hospital Nacional Alejandro Posadas. Argentina.gob.ar](https://www.hospitalnacionalalejandroposadas.gov.ar)
2. Manual Merck. MSD. Venenos de serpientes. 2024.
3. Alonso A., Scavini L.M., Marino G.A., Rodríguez S.M.: IgE antibodies against snake venoms. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1995;5(1):31-34.
4. Alonso A., Marino G.A., Scavini L.M., Rodríguez S.M.: Immunochemical properties of the antigens of Triatoma infestans. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1992;2:154-160.
5. Alonso A., Caccuri R., Scavini L.M., Rodríguez S.M., Marino G.A.: Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by Triatoma infestans antigens. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1994;4:197.
6. Alonso A., Scavini L.M., Marino G.A., Rodríguez S.M.: Hipersensibilidad al veneno de Bothrops. *Pren méd argent.*, 1995;82:935-939.
7. Anderson M.C.: Methodology for RAST-inhibition. In: Methods of the allergenic products. FDA. Bethesda 1986;1-17.
8. Atías A., Neghme A.: Parasitología clínica. Ed. Mediteraneo. Santiago de Chile, 1993.
9. Barret A.J.: Classification of peptidases. *Meth. Enzymol.*, 1994; 244:1-5.
10. Ceska M., Erikson R.: Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1986;78:436.
11. Crowle A.: Immunodiffusion. Academic Press. New York. 1961.
12. Gleich G.J.: Measurement of potency of allergy extracts by RAST. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1974;58:113.
13. Houssay B.: Estudios sobre venenos de serpientes. *Rev. Inst. Bacteriol.*, 1: 341-349, 1918.
14. Ouchterlony O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 1958;5:1.
15. Pirovsky I., Abalos J.W.: Venenous Argentine Serpents. Ophidism and snake antivenom. Pergamon Press. New York. 1963.
16. J.F., Riquelme P.A.: Patología respiratoria debida al Triatoma infestans en humanos y animales. *Anales de la SCA.*, 2023: vol.274(2):3-36.