

INMOVILIZACIÓN DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *BOTHROPS ATROX* EN COLUMNA DE AFINIDAD PARA LA OBTENCIÓN DEL ANTIVENENO ESPECÍFICO

G. A. Sandoval P., F. Lazo M., E. Rodríguez Q., J. Mendoza F., A. Yarlequé Ch.¹

RESUMEN

Se ha inmovilizado el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* para la obtención de anticuerpos específicos a partir del suero de conejos albinos previamente inmunizados mediante cromatografía de afinidad. El veneno (100 mg) fue acoplado a 1 g de Sepharosa 4B-BrCN y la resina empaquetada en una columna cromatográfica de 0.8 x 6.0 cm. Esta columna fue utilizada para la purificación de anticuerpos específicos a partir de suero de conejos machos albinos Nueva Zelanda (2 kg) inmunizados con el veneno de *B. atrox*. El suero (1 mL) fue aplicado a la columna y las fracciones proteicas se eluyeron sucesivamente con NaCl 0.15 M, pH 6.0 y buffer glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5. La cuantificación de proteínas se realizó por métodos espectrofotométricos. La inmovilización del veneno de *B. atrox* en el gel permitió obtener una columna de afinidad para la obtención de anticuerpos anti-*B. atrox*, los cuales fueron eluidos con buffer glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5, recuperándose 100 µg de estos anticuerpos por mL de suero. Se concluye que el uso de la columna de Sepharosa 4B-BrCN permitió obtener anticuerpos purificados contra el veneno de *B. atrox*.

Palabras clave: veneno, *Bothrops atrox*, Sepharosa 4B-BrCN, anticuerpos, cromatografía.

IMMOBILIZATION OF BOTHROPS ATROX PERUVIAN SNAKE VENOM INTO AFFINITY CHROMATOGRAPHY COLUMN FOR OBTAINING SPECIFIC ANTIVENOM

ABSTRACT

The venom of *Bothrops atrox* Peruvian snake venom was immobilized to obtain specific antibodies from serum of immunized white rabbits using affinity chromatography. The venom (100 mg) was coupled to 1 g of CNBr-activated Sepharose 4B and the resin was packed in a chromatographic column (0.8 x 6.0 cm). This column was used to purify specific antibodies from serum of New Zealand white rabbits (2 kg) previously immunized with *B. atrox* venom. The serum (1 mL) was applied to the column and protein fractions were eluted with NaCl 0.15 M, pH 6.0 and glycine-HCl buffer 0.1 M, pH 2.5. Protein quantification was performed using spectrophotometric methods. The immobilization of *B. atrox* venom in gel allowed obtaining an affinity column for isolation of anti-*B. atrox* antibodies, which were eluted with glycine-HCl buffer 0.1 M, pH 2.5. This method could recover 100 µg of antibodies per mL of serum. We conclude that the use of a CNBr-activated Sepharose 4B column allowed obtaining purified antibodies against *B. atrox* venom

Keywords: venom, *Bothrops atrox*, CNBr-activated Sepharose 4B, antibodies chromatography.

1. INTRODUCCIÓN

Las mordeduras de serpientes venenosas constituyen un problema de salud en los países con regiones tropicales, reportán-

dose por lo menos 5 millones de accidentes anuales con 40000 muertes y un número indeterminado de personas discapacitadas^[1]. En esta situación, el único tratamiento de eficacia comprobada lo constituye el empleo

¹ Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.
E-mail: ayarleque48@gmail.com

del antiveneno ofídico, el cual consiste de una preparación de anticuerpos producidos usualmente en caballos, contra uno o más tipos de venenos^[2-3]; sin embargo, uno de los principales problemas de su uso es el contenido de proteínas heterólogas en el suero, las cuales no pueden ser eliminados por precipitación con sulfato de amonio y otras sales, lo cual por un lado, reduce la potencia neutralizante del antiveneno, y por otro, genera reacciones alérgicas como la enfermedad del suero^[4].

Una alternativa para mejorar la tecnología en la calidad de los antivenenos es la preparación de anticuerpos de alta especificidad contra un veneno para lo cual se emplean métodos cromatográficos, principalmente, la cromatografía de afinidad^[5]. Esta última, requiere el empleo de una matriz constituida por un polisacárido a la cual se le une la proteína o proteínas en estudio a través de grupos químicos altamente reactivos como el bromuro de cianógeno (BrCN)^[6].

Teniendo en cuenta que la serpiente *B. atrox* es la más abundante y peligrosa en la selva del Perú y que causa entre el 88 y 92% de accidentes en humanos^[7], en la presente investigación hemos inmovilizado las proteínas del veneno de *B. atrox* en Sepharosa 4B-BrCN a fin de purificar anticuerpos específicos a partir del suero de conejos inmunizados con este veneno.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Material Biológico

Se empleó el veneno total de especímenes de la serpiente *Bothrops atrox* procedente de Pucallpa (Ucayali - Perú), mantenidas en el Serpentario "Oswaldo Meneses", Museo de Historia Natural, UNMSM. Después de colectados, los venenos fueron liofilizados y mantenidos a -20 °C hasta su uso.

Para la producción de anticuerpos se emplearon conejos albinos machos de raza Nueva Zelanda (2.5 kg), los cuales fueron mantenidos en el Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión", UNMSM.

Cuantificación de proteínas

Se realizó mediante la absorbancia a 280 nm^[8] en un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS, y por el método de Lowry^[9], modificado previamente^[10]. Se empleó la proteína albúmina sérica bovina como proteína estándar.

Inmunización de conejos para la producción de anticuerpos

Para la producción de anticuerpos, se siguió el protocolo de inmunización previamente reportado por Sandoval et al.^[11], utilizando adyuvante completo e incompleto de Freund. Al final de dicho protocolo, se colectó sangre a partir de la vena arterial de la oreja y el suero obtenido se empleó para la posterior purificación de anticuerpos.

Inmovilización del veneno de *B. atrox* en columnas de Sepharosa

Para la elaboración de la columna de afinidad, se empleó 1 g. de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (BrCN) (Sigma-Aldrich), el cual fue rehidratado en 10 mL de HCl 1 mM, pH 3.0, lavado 5 veces con agua destilada y finalmente resuspendido en 10 mL de buffer de acoplamiento (NaHCO₃, 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3). Posteriormente, el gel preparado fue mezclado con 100 mg de veneno de *B. atrox* (ligando), disuelto previamente en buffer de acoplamiento, durante una noche a 4 °C. Después, el gel fue lavado 5 veces con el buffer de acoplamiento a fin de eliminar las proteínas que no reaccionaron, y los sitios activos remanentes de las esferas de Sepharosa fueron bloqueados con dietanolamina 1 M, pH 8.0, durante una noche a 4 °C. Finalmente, el gel fue lavado alternadamente con 50 mL de buffer acetato 0.1 mM, NaCl 0.5 M, (pH 4.0) y 50 mL buffer de acoplamiento (pH 8.3), y equilibrado con NaCl 0.15 M, pH 6.0. Para la purificación de anticuerpos, el gel fue empacado en una columna de polietileno de 0.8 x 6.0 cm, o almacenado a 4 °C en un solución de etanol 20% para su preservación.

Purificación de anticuerpos anti-*B. atrox*

Las muestras de suero obtenidas previamente fueron aplicadas en alícuotas de 1 mL sobre la columna de afinidad con el veneno acoplado e incubadas bajo agitación constante durante 2 h a 20 °C para permitir la unión de los anticuerpos al ligando. Los anticuerpos que no se unieron fueron lavados completamente con NaCl 0.15 M, pH 6.0 y los anticuerpos retenidos fueron luego eluidos con buffer glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5. Inmediatamente después, los anticuerpos obtenidos fueron neutralizados con Tris 1 M y luego dializados contra buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4. Todos los pasos de elución fueron realizados a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método del Bromuro de Cianógeno (CNBr) permitió el acoplamiento de las proteínas del veneno de la serpiente *B. atrox* al gel de Sepharosa 4B previamente activado. Ésta fue la primera técnica usada a gran escala para la inmovilización de ligandos que contienen grupos amino, la cual involucra la derivatización de grupos hidroxilo sobre la superficie de un soporte para formar un éster de cianato activo o un grupo imidocarbonado^[12]. Ambos grupos activos pueden ser acoplados a los ligandos a través de las aminas primarias, pero el éster es más reactivo que el imidocarbonato (Fig. 1).

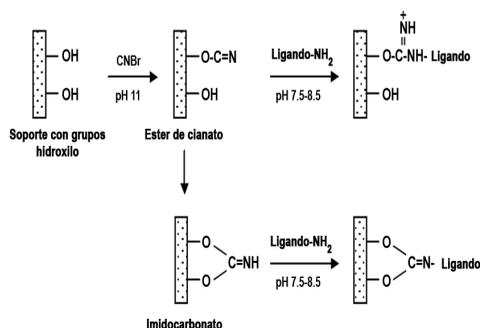


Fig. 1. Posibles reacciones en el método de inmovilización con bromuro de cianógeno (BrCN) con el uso de ligandos conteniendo grupos amino (ligando-NH₂)

El método del BrCN emplea condiciones poco severas para el acoplamiento del ligando, haciendo apropiado para moléculas más sensibles como las proteínas. Uno de los problemas de este método es la toxicidad del BrCN, lo cual requiere el uso de precauciones de seguridad adecuadas durante los procesos de activación, y el escape de ligandos que puede resultar de soportes activados con BrCN.

Por otro lado, la columna de afinidad preparada permitió la purificación de anticuerpos anti-*B. atrox* presentes en el suero de conejo (Fig. 2).

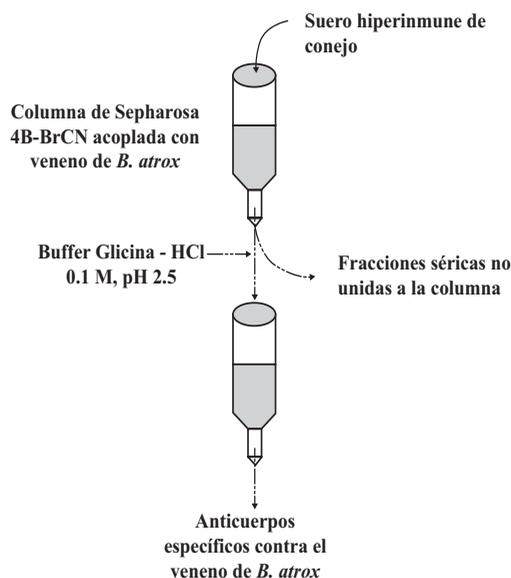


Fig. 2. Representación esquemática de la purificación de anticuerpos anti-*B. atrox* empleando la columna de Sepharosa 4B-BrCN.

Como se puede observar en la Fig. 3, una porción proteica fue eluida con la solución inicial, es decir, NaCl 0.15 M, pH 6.0. La fracción proteica atrapada en el sistema que corresponde a los anticuerpos contra el veneno fue eluida utilizando buffer glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5, con el cual se logró escindir

la asociación establecida entre el ligando (veneno) con los anticuerpos producidos.

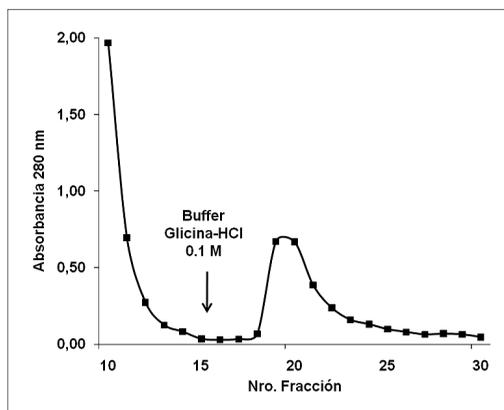


Fig. 3. Elución cromatográfica de anticuerpos anti-*B. atrox* usando la columna de Sepharosa 4B-BrCN

Los venenos de serpientes por el hecho de contener fundamentalmente proteínas son altamente reactivos desde el punto de vista inmunológico^[13], pero además es importante señalar que las ponzoñas de serpientes de la familia Viperidae a la cual pertenece la especie peruana *Bothrops atrox* tiene un elevado contenido enzimático así como hemorraginas y otros factores proteicos destinados a paralizar y digerir a la presa^[14]. El peligro para los seres humanos está centrado en que estos compuestos son capaces de alcanzar diferentes órganos y producir daños irreversibles e incluso la muerte por lo que el ofidismo es uno de los problemas de salud pública de mayor impacto en regiones donde la floresta es muy abundante¹.

A pesar de los diferentes métodos que se han desarrollado para atender este problema de salud, sólo el uso de antivenenos elaborados por hiperinmunización en animales de laboratorio ha demostrado capacidad neutralizante sobre la mayoría de los compuestos proteicos presentes en las ponzoñas⁴. Sin embargo, se presentan reacciones anafilácticas como la enfermedad del suero por la presencia de proteínas heterólogas en el antiveneno. Por esta razón, la producción de anticuerpos de alta especificidad constituye un requerimiento perentorio y en este sentido se hace necesario el desarrollo de técnicas para separar los anticuerpos obtenidos por

inmunización. En este aspecto, la cromatografía de afinidad constituye una alternativa promisoriosa ya que permite purificar estos anticuerpos utilizando como criterio la asociación veneno-antiveneno sobre un soporte cromatográfico.

Ho et al.^[15], realizaron un estudio comparativo entre los métodos de separación cromatográfica de las inmunoglobulinas usando cromatografía de intercambio iónico y de afinidad. En el primer caso, las proteínas son atrapadas por el efecto de carga y en el segundo; por asociación altamente específica entre las superficies de los anticuerpos con los determinantes antigénicos presentes en las proteínas que actúan como tales. De acuerdo con este estudio, la recuperación de anticuerpos específico es mayor y con el menor número de pasos cromatográficos usando las columnas de afinidad de Sepharosa 4B activadas con bromuro de cianógeno (BrCN). Por otro lado, se ha demostrado que la precipitación salina con sulfato de amonio y sulfato de sodio, entre otras, resulta altamente inespecífica comparado con estas técnicas.

Teniendo en cuenta que en la cromatografía de afinidad debemos asegurarnos que se dé el correcto acoplamiento del antígeno (veneno) al sistema Sepharosa 4B-BrCN, la preparación de la columna resulta crucial, por lo que los trabajos desarrollados por varios autores fueron fundamentales en el diseño de esta técnica aplicada a los anticuerpos ofídicos. En este trabajo, la cromatografía de afinidad usando el veneno de *B. atrox* para ligar los anticuerpos de conejo anti-*B. atrox*, resultó ser un método idóneo pues se logró en primer lugar, una masa de anticuerpos de 100 µg por mL de suero.

4. CONCLUSIONES

Concluimos que la inmovilización del veneno de *B. atrox* en columnas de Sepharosa 4B activada con BrCN permite la purificación por cromatografía de afinidad de los anticuerpos anti-*B. atrox* de forma rápida y con un alto

rendimiento. Dichos anticuerpos permitirán la detección de antígenos tóxicos en muestras clínicas mediante el empleo de técnicas inmunoenzimáticas como las de ELISA y Western Blot.

5. AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en marco del Convenio de Cooperación Científica entre las Universidades Británicas de Oxford y Liverpool con la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Pugh RN, Theakston RD. Incidence and mortality on snake bite in savanna Nigeria. *Lancet*. 1980;2(8205):1181-3.
- [2] Theakston RD, Warrell DA. Antivenoms: a list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. *Toxicon*. 1991;29(12):1419-70.
- [3] Laing GD, Yarleque A, Marcelo A, Rodriguez E, Warrell DA, Theakston RD. Preclinical testing of three South American antivenoms against the venoms of five medically-important Peruvian snake venoms. *Toxicon*. 2004;44(1):103-6.
- [4] Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.
- [5] Theakston RD, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003;41(5):541-57.
- [6] Van Dong L, Quyen le K, Eng KH, Gopalakrishnakone P. Immunogenicity of venoms from four common snakes in the South of Vietnam and development of ELISA kit for venom detection. *J Immunol Methods*. 2003;282(1-2):13-31.
- [7] Loja D, Aviles R, Necochea Y, Vilca M, Castro J. 2000. Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. *Diagnóstico*. 38(5):261-265.
- [8] Warburg O, Christian W, 1942. Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Biochem Z*. 310, 384-421.
- [9] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
- [10] Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarleque A. 1985. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Rev Soc Quim Peru*. 52:151-63.
- [11] Sandoval G. Evaluación de la inmunogenicidad del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "Jergón" por métodos inmunoenzimáticos. Tesis para la obtención del título de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética. UNMSM, 2009. 61 pp.
- [12] Hage DS. *Handbook of Affinity Chromatography*. Second Edition. Taylor & Francis, 2006. 876 pp.
- [13] Boquet P. Immunological properties of snake venoms. In: Lee, C.Y. (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52. Springer, Berlin, 1979. pp. 751-824.
- [14] Yarleque A. *Las Serpientes Peruanas y sus Venenos*. Fondo Editorial de la UNMSM, 2000. 78 pp.
- [15] Ho M, Warrell MJ, Warrell DA, Bidwell D, Voller A. A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snake bite. *Toxicon*. 1986;24(3):211-21.