

Los anticuerpos IgG de conejos anti-fosfolipasa A₂ de *Crotalus durissus terrificus* neutralizan la actividad del veneno¹

La crotoxina, una fosfolipasa neurotóxica y miotóxica, es el mayor componente del veneno de la víbora de cascabel sudamericana (*Crotalus durissus terrificus*) y puede constituir más del 50% de éste. Aislada por Slotta y Fraenkel-Conrat en 1938, es famosa por ser la primera toxina de venenos de serpientes cristalizada. En 1971, se descubrió que está compuesta por una unidad ácida, denominada "crotopotina" o subunidad A y una básica, la fosfolipasa A₂ o subunidad B². Es una de las fosfolipasas de venenos de serpientes más estudiadas. Los métodos de separación de los diferentes componentes del veneno y sus subunidades son bien conocidos.

En 1986 se comprobó que antisueros de conejos inmunizados con crotoxina o su subunidad B neutralizaban su actividad tóxica³. Posteriormente se comunicó que anticuerpos monoclonales contra la subunidad B, e incluso fragmentos scFv humanos de bibliotecas de fagos no inmunes neutralizaban la crotoxina⁴.

En 1988 y 1989 se publicó que ratones inmunizados con subunidad B adquirirían protección frente al veneno de *C. d. terrificus* y que la inmunización de equinos con ella, los protegía de dosis letales de ese veneno⁵. En 1989 se comprobó que la inmunización de equinos con la subunidad B genera una respuesta inmune tal que puede ser aprovechada para la producción de antivenenos terapéuticos, ya sea inmunizando con la fosfolipasa sola, o reforzando a las inmunizaciones con veneno entero⁶.

Resulta lógico entonces que las conclusiones del trabajo que genera esta nota¹, sean que se puede producir un antiveneno para el veneno de *C. d. terrificus* inmunizando con la subunidad B de la crotoxina. Hay abundante bibliografía al respecto.

Por lo referido antes, en ese trabajo no se utilizó subunidad B de crotoxina como en él se expresa, sino el complejo crotoxina, las subunidades A y B.

Estas subunidades sólo se pueden separar (refiriéndose a cromatografía líquida como la usada en el trabajo) mediante un intercambiador iónico con alta molaridad, como fue la primera separación realizada por Rubssamen utilizando carboximetil celulosa a pH ácido² o por DEAE-celulosa⁷, citando sólo las clásicas. También pueden obtenerse ambas subunidades mediante la cromatografía por fase reversa o isoelectroenfoque. Entre los métodos usuales para su separación se encuentra el descripto por Landucci y col., citado por los autores del artículo¹.

Landucci y col. utilizaron los dos pasos clásicos para la separación de esta toxina, un primer paso por filtración en gel por *Sephadex* G-75, en el que se observan casi siempre (dependiendo de las condiciones de corrida y las características del veneno utilizado) tres o cuatro picos, ya sea utilizando la solución tampón citada en ese trabajo (bicarbonato de amonio a pH 8.0) o con *buffers* de pH neutro o ácido, siendo el mayor de estos picos el correspondiente a la crotoxina. Los autores citados, utilizaron un segundo paso de intercambio catiónico en SP-*Sephadex* con formiato de amonio 0.15 M pH 3.5, llevando en dos pasos la molaridad a 2.5. Sea cual fuere la técnica de cromatografía líquida que se utilice, es necesario someter a la crotoxina a una alta molaridad para separar sus subunidades^{2,7}. En el trabajo mencionado¹, lejos se ha estado de utilizar un método más simple para separar esta fosfolipasa que el descripto por Landucci y col.

Se supuso que con un solo paso de purificación por *Sephadex* G-75 usando una solución ácida se obtenía la separación de la crotoxina; esto no es suficiente para separar las dos subunidades. No se consideró que un SDS-PAGE en las condiciones descriptas no resuelve bien entre los (aproximadamente) 15 kDa de la subunidad B y 9 kDa de la subunidad A, por lo que se supuso que se logró la separación de ambas. Estas, a pesar de separarse por la presencia del SDS, no se ven como dos bandas en un SDS-PAGE con tris-glicina y menos aún en geles homogéneos, lo que aparentemente se utilizó en el trabajo¹. Para mejorar la resolución a ese nivel de masa molecular es necesario utilizar en el gel de corrida como *buffer* tris-tricina o realizar un gel en gradiente. La banda de baja masa molecular cercana a los 14.2 kDa que han observado los autores en el veneno crudo (Fig. 2), posiblemente sea crotamina (\approx 5 kDa) junto a los componentes de menor peso molecular, pero no crotopotina. La crotamina y los otros componentes serían los que se observan en el hombro del segundo pico y el último pico de la cromatografía (Fig. 1)¹.

Respecto a la demostración de mayor reactividad inmunoquímica por ELISA en relación al antiveneno equino, si bien esta es probable, con los datos de este trabajo no puede afirmarse. Dos curvas de ensayos realizados con dos conjugados distintos (de los que no se mencionan los datos de uno de ellos) y con dos preparaciones diferentes, como en este caso anticuerpos de conejo y F(ab')₂ equinos (no IgG entera como se menciona), no deben superponerse en un mismo gráfico para confrontarlos. Por estos motivos, no debería compararse la reactividad inmunoquímica en las bases provistas por los autores. Resulta

extraño que se haya realizado el estudio electroforético del antiveneno equino utilizado (en el que no se hallaron impurezas) y no se haya comprobado que este estaba constituido por fragmentos $F(ab')_2$ y no por IgG.

El trabajo llega a conclusiones correctas, si bien conocidas desde hace 18 años²⁻⁵; arriban a estas sin interpretar correctamente sus mismos resultados. Se inmunizó con crotoxina y no con su subunidad B, ya que en ningún momento se separó por no usarse metodologías adecuadas^{3,5,6}. Existe numerosa bibliografía sobre estos temas (mucho mayor a la aquí citada por razones editoriales), de la que ofrezco la que poseo a los interesados en estos temas.

Adolfo R. de Roodt

e-mail: aderoodt@anlis.gov.ar

1. Rodríguez JP, De Marzi M, Maruñak S, et al. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A_2 from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 512-6.
2. Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Biological roles of the two components of crotoxin. *PNAS* 1971; 68: 1560-3.
3. Kaiser II, Middlebrook JL, Crumrine MH, et al. Cross-reactivity and neutralization by rabbit antiserum raised against crotoxin, its subunits and two related toxins. *Toxicon* 1986; 24: 669-78.
4. Cardoso DF, Nato F, England P, et al. Neutralizing human anti crotoxin scFv isolated from a nonimmunized phage library. *Scand J Immunol* 2000; 51: 337-44.
5. Dos Santos MC, Yamaguchi IK, Caricatti CP, et al. Immunization of equines with phospholipase A_2 protects against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Braz J Med Biol Res* 1989; 22: 509-12.
6. Higashi HG, Guidolin R, Nishikawa AK, et al. Producao de anticorpos AV total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A_2 . *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 91-100.
7. Faure G, Choumet V, Bouchier C, et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem* 1994; 223: 161-4.

- - - -

Tuvimos en cuenta la numerosa bibliografía existente sobre el veneno de *C. d. terrificus* y las formas alternativas de su neutralización, y ha sido esta la que ha dado marco a nuestro artículo¹. Los autores citados por el Dr. de Roodt y otros² han trabajado en determinar si la crotoxina y/o el componente básico (fosfolipasa A_2 o CB) es capaz de generar una respuesta inmune protectora ante la crotoxina y/o el veneno entero de *C. d. terrificus*. Sin embargo, existen aspectos en cada trabajo que los vuelve originales y que han justificado su publicación. Así, nuestro trabajo examinó si reduciendo la carga proteica del antiveneno —excluyendo anticuerpos con especificidad contra componentes no letales, de otras proteínas del suero y de otros isotipos de anticuerpos— conservaba el poder neutralizante. Investigamos si la sola presencia de IgG anti-fosfolipasa A_2 conserva la efectivi-

dad neutralizante que ofrece el antisuero contra el veneno crotálico entero. Asimismo, trabajos que demuestren sólo la inmunogenicidad de la fosfolipasa A_2 crotálica y el poder neutralizante de un antiveneno anti-fosfolipasa A_2 pero que no generen un tipo de confrontación con antisuero contra veneno entero, tales como los publicados por Cardoso, Higashi o Kaiser (citados por el Dr. de Roodt), no se superponen con nuestro estudio. Tampoco son comparables con éste los dos artículos de Dos Santos y col., que muestran la protección contra la letalidad del veneno entero que adquiere el animal inmunizado con dosis bajas de fosfolipasa A_2 crotálica. Es conocido que en la resistencia a los efectos letales de las toxinas, pueden estar involucrados no sólo elementos humorales. Así, la inmunidad activa que se alcanza con pequeñas dosis de un antígeno, no sería comparable a la alcanzada pasivamente con el suministro de un antisuero elaborado por otro animal, aspecto que es tratado en nuestro artículo.

Si las razones expuestas justificaban la publicación de nuestro artículo, destacamos además que las variaciones intra-especie que se presentan en la composición del veneno, dependientes de la ubicación geográfica, justifican la realización de estudios locales, tanto en caracterización como en producción de antivenenos³.

La opinión "la metodología empleada es incorrecta", y por ende la conclusión "se trabajó con crotoxina y no con la subunidad básica (la fosfolipasa A_2 o subunidad B)", merece la siguiente aclaración: el método aplicado se basa en la disociación del complejo crotoxina a pH extremos⁴. Se utilizó un pH tan bajo suficiente como para disociar uniones tan fuertes como las de antígeno-anticuerpo con constantes de afinidad del orden 10^7 - 10^{11} M⁻¹. En particular, si tenemos en cuenta que el pI de fosfolipasa A_2 es del orden de 8.6 y de crotopotín es ~ 3.5, ambas subunidades adquirirán carga neta positiva, lo que lleva a la disociación *in situ* del complejo.

Las diferencias de tamaño molecular entre ambas subunidades, acentuadas por las modificaciones estructurales que desencadena un pH tan ácido, permiten su separación en las condiciones citadas en el artículo y su posterior aislamiento.

Dice el Dr. de Roodt: "Sea cual fuere la técnica de cromatografía líquida que se utilice, es necesario someter a la crotoxina a una alta molaridad para separar sus subunidades". La alta fuerza iónica empleada en los procedimientos que cita es requerida para "despegar" la subunidad que quedó retenida electrostáticamente en la columna, siendo entonces "la columna" la que se encarga de separar las subunidades de la crotoxina. Así, en una columna aniónica eluye la subunidad ácida y queda retenida la básica, luego deben usarse altas fuerzas iónicas para permitir la elusión de la subunidad básica. De usarse columnas catiónicas, el comportamiento es similar pero opuesto. En nuestra técnica, es el pH ácido

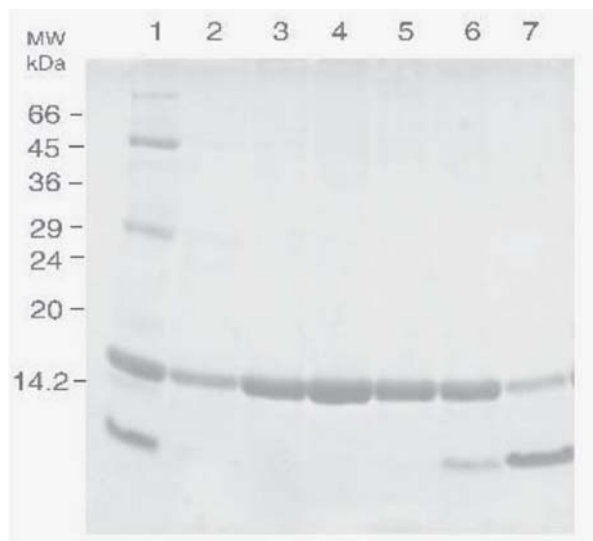


Fig. 1a.– SDS-PAGE de cromatografía de veneno de *Crotalus durissus terrificus* en columna *Sephadex G-75*, buffer glicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 1.9. Línea 1: veneno entero; Líneas 2, 3, 4, 5, 6 y 7: fracciones recolectadas Nº 17, 18, 19, 20, 23 y 24.

el que disocia y la columna de filtración por gel la que separa, por ende la fuerza iónica no es decisiva.

La imagen presentada en nuestro artículo tal vez no fuera lo suficientemente nítida para ver la separación de las subunidades de la crotoxina, por lo que adjuntamos una nueva imagen (Fig. 1a). La banda que se distingue en todas las calles, y se ubica en la zona cercana a 14.2 kDa, corresponde a la subunidad básica (constituida por una sola cadena polipeptídica, con un peso del orden 14-16 kDa), mientras que las de menor PM, que se distinguen tanto en el veneno entero como en las calles 6 y 7, corresponde a los fragmentos que presenta el crotopotín en condiciones reductoras y, a la crotamina. Así, un gel homogéneo de 15% resulta apropiado para resolver la presencia de 2 bandas del orden de 15 y 5 kDa, y distinguir si la fracción aislada es fosfolipasa o crotoxina. Otros autores han comunicado resultados similares con las mismas propiedades resolutoras, sobre venenos crotálicos^{5,6} e inclusive en condiciones no reductoras, donde el crotopotín tiene un peso molecular de 9 kDa y puede diferenciarse de la fosfolipasa⁷. Es correcto trabajar en un gel en gradiente con *buffer tricine*, pero no es el método exclusivo para separar ambos componentes de la crotoxina. Dos sueros de diferentes espe-

cies no deberían compararse por ELISA dado que deben usarse necesariamente dos conjugados diferentes. Con la Fig. 5¹ se pretendió demostrar una mayor actividad de las preparaciones de conejo ya que partiendo de una misma concentración proteica (80 mg.ml⁻¹ de concentración de proteína inicial, que es la que se usa en la terapia de rutina) se observa que con diluciones dos logaritmos mayores, el suero de conejo sigue reaccionando con la fosfolipasa A₂ inmovilizada. El resultado de los ELISA simplemente complementa los resultados presentados en la Tabla 1¹ que demuestran la mayor capacidad neutralizante por mg de proteína de la preparación en conejos.

No podemos aclarar el punto de la composición del suero comercial ACS –si se trató de IgG o F(ab')₂– utilizado en los experimentos, pues no disponemos de material remanente. Antes de emplearlo realizamos una corrida electroforética en acetato de celulosa, comprobando una intensa banda en la región de las gammaglobulinas y ausencia de otras proteínas.

Juan P. Rodríguez, Mauricio De Marzi, Silvana Maruñak, Emilio Malchiodi, Laura Leiva, Ofelia Acosta

e-mail: patmed@vet.unne.edu.ar

- Rodríguez JP, De Marzi M, Maruñak S, et al. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 512-6.
- Choumet V, Jiang MS, Radvanyi F, Ownby C, Bon C. Neutralization of lethal potency and inhibition of enzymatic activity of phospholipase A₂, neurotoxin, crotoxin, by non-precipitating antibodies Fab. *FEBS Lett* 1989; 244: 167-73.
- Chippaux J, Goyffon M. Production and use of snake antivenin. In: Tu, A.T., (Ed.), *Reptile Venoms and Toxins*, vol. 5, New York: Dekker 1999, p 529-55.
- Karlsson E. Chemistry of Protein Toxins in Snake Venom. In: Chen Yuan Lee (Ed). *Snake Venom: Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. Reprinted by SIGMA Chemical Company, 1991, p 193.
- Rangel-Santos AC, Mota I. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 2000; 38: 1451-7.
- Aguiar AS, Melgarejo AR, Alves CR, Giovanni-DeSimone S. Single-step purification of crotopotín and crotactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing. *Braz J Med Biol Res* 1997, 30: 25-28.
- Rangel-Santos A, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso DF, Mota I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *C d cascavella* and *C d collilineatus*. *Toxicon* 2004; 43: 801-10.