

COMUNICACIONES

Efectos de la irradiación neutrónica del Uranio 235 sobre el veneno de *Lachesis muta muta*  
(Ofidia: Viperidae)

Paul Becerra<sup>1</sup> y Alfonso Zavaleta<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Farmacología, Depto. Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 4314, Lima 100, Perú.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 4314, Lima 100, Perú.

<sup>3</sup> Centro de Control de Calidad, y Laboratorio Afiliado, Dirección de Investigación Epidemiológica, Instituto de Enfermedades Transmisibles "Hugo Lumbrales Cruz", Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

\* Dirección para correspondencia.

(Rec. 4-XI-1993. Acep. 17-II-1994)

**Abstract:** The effect of irradiation of the aqueous solution of *L. m. muta* venom was evaluated with thermic neutrons from Uranium-235 employing doses of 1.61 to 5.19 Gray. The venom was examined for protein content by the Folin Lowry Method modified by Stauffer; for acute toxicity by intraperitoneal route estimation in mice and for immunochemical tests by the antigen-antibody reactions evaluation. Neutronic radiation affects all evaluated parameters in venom (decrease in protein content levels, increase of LD50 values and decrease in the number of precipitating antigen-antibody) as shown by immunodiffusion and immunoelectrophoresis.

**Key words:** Snake venom, irradiation, protein, immunology, Uranium-235.

El envenenamiento ocasionado por la mordedura de serpientes venenosas (ofidismo) constituye un serio problema de salud en América, debido a la producción de efectos y secuelas locales entre los que se incluyen edema, hemorragia y necrosis, que en algunos casos conducen a incapacitación física temporal y/o definitiva del sujeto envenenado, así como por sus efectos sistémicos, que pueden desencadenar la muerte (Zavaleta 1990). Estos efectos se han atribuido a la acción de componentes proteicos presentes en los venenos, algunos de los cuales poseen actividad enzimática asociada, responsable de la hemorragia, necrosis muscular, hemólisis y/o neurotoxicidad, considerándose al efecto letal del veneno como la resultante de la acción de múltiples factores presentes en los venenos. En el momento actual, el tratamiento de elección para el ofidismo es la aplicación paren-

teral del suero antiveneno específico (Zavaleta 1990). Durante la segunda mitad de este siglo, el empleo de las radiaciones ionizantes para fines no bélicos se ha incrementado, existiendo la posibilidad de su utilización en la destoxificación de sustancias altamente tóxicas como los venenos de serpiente, y la obtención de *venenoides*, los que pudieran ser empleados como antígenos en la fabricación de sueros anti veneno más potentes (Sundaram *et al.* 1970, Lauhatiranda & Ganthavorn 1970, Kankonfar & Ganthavorn 1975). Uno de los objetivos ideales de la aplicación de esta técnica sería lograr la destoxificación selectiva de los venenos, tratando en lo posible de no afectar grandemente las estructuras asociadas a sus propiedades antigénicas.

Los efectos de la irradiación de los venenos ofídicos con <sup>60</sup>Co (irradiación de baja energía lineal de transferencia) fueron estudiados pre-

viamente por Sundaram *et al.* (1970), Lauhatirananda *et al.* (1970), Balvin & Rodríguez-Tafur (1984) y Herrera *et al.* (1986), demostrándose que los venenos neurotóxicos de las serpientes de la Familia Elapidae requieren altas dosis de radiación para su destoxicación mientras que los venenos de la Familia Viperidae son más sensibles y requieren de menores dosis. No conocemos informes previos sobre la aplicación de radiación neutrónica (radiación de alta energía lineal de transferencia) para destoxicación de venenos, por lo que en este trabajo estudiamos los efectos de dicha radiación generada por los neutrones térmicos de una fuente de Uranio-235 sobre el contenido protéico, la toxicidad aguda y algunos parámetros inmunológicos del veneno de la serpiente *L. m. muta*.

Se utilizó veneno desecado cristalizado (contenido protéico: 74.4%) obtenido en el serpentario del Instituto Nacional de Salud en Lima, a partir de ejemplares adultos de *L. m. muta* (Alto Marañón, Amazonas, Perú). Para los ensayos el veneno cristalizado fue reconstituido a una concentración inicial de 10 mg/ml (W/V) con una solución de 0.85% NaCl; filtrado con filtros Millipore (0.22 $\mu$ ) a 4°C, y posteriormente envasado en 6 frascos color caramelo. Cinco de los viales fueron irradiados a temperatura ambiente en el núcleo del reactor nuclear de Potencia Cero (RP -0) a dosis de 1.61; 3.13; 3.71; 4.04 y 5.19 Gray de Uranio-235 respectivamente. El sexto vial no se irradió y se empleó como testigo. El contenido protéico de cada una de las muestras de veneno irradiado y control se determinó pre y post tratamiento, por el método de Lowry modificado por Stauffer (1975). La capacidad antigénica del veneno fue evaluada empleando las técnicas de inmunodifusión radial en gel de Ouchterlony e inmunoelectroforesis (Rose & Friedman 1980). Para las pruebas inmunológicas se empleó Suero Antilachésico Monovalente Lote 13 (1987), producido por el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú, potencia neutralizante antiletal equivalente a 2.5 mg/ml). Para la inmunodifusión se empleó 1.2% Agarosa Tipo II-Low (Sigma S. Louis, Misuri, E.U.A.) en agua destilada y buffer fosfato salino (0.2M; pH 8.0), según la técnica de Ouchterlony, empleando un pozo central y 6 periféricos equidistantes. En el pozo central se colocó el Suero Antilachésico Monovalente y en los restantes, el veneno control y

los venenos irradiados a una concentración de 2.5 mg/ml, dejándose difundir las muestras durante 48 horas a 4°C, procediéndose luego a la tinción con 0.1% Coomassie Blue 250-R (Sigma) seguida de decoloración en una solución de 5:5:2 (v/v) metanol, agua destilada y ácido acético glacial. La inmunoelectroforesis se efectuó empleando 1.2% de Agarosa Tipo III-high (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en buffer barbital sódico (0.2M; pH 8.6, F.I. 0.05). (1.8 Amp x cm<sup>-1</sup>, durante 3.5 horas). Para la visualización de las bandas de inmunoprecipitación, se empleó un procedimiento similar al utilizado en la inmunodifusión.

La Dosis Letal 50% (DL50) del veneno control e irradiado se estimó por la vía intraperitoneal empleando el método de Probits (Finney 1971) y como parámetros el porcentaje de mortalidad a las 48 horas, y el logaritmo de la dosis aplicada expresada en mg/kg ratón.

La DL50 del veneno control no irradiado fue estimada en 17.9 mg/kg (límites fiduciales al 95% de 16.2 y 19.7 mg/kg). Los valores de la DL50 se incrementaron progresivamente en el rango de dosis de 1.71 a 3.71 Gray. Dosis mayores no incrementaron el valor de la DL50.

El contenido protéico determinado mediante la cuantificación de la absorbancia producida principalmente por los aminoácidos aromáticos, disminuyó a medida que se incrementó la dosis de radiación aplicada al veneno (Fig.1).

En las pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis, el veneno no irradiado (testigo) presentó 8 y 13 bandas de precipitación respectivamente frente a su antiveneno homólogo. El número y el patrón de bandas de precipitación no mostró variaciones en el veneno irradiado a dosis menores a 3.71 Gy<sup>-</sup>. A dosis mayores (4 y 5.19 Gy<sup>-</sup>) se observó la desaparición de 2 bandas de precipitación en la inmunodifusión. (Cuadro 1). En la inmunoelectroforesis hubo pérdida total de 2 bandas anódicas y disminución de intensidad en la tinción en otras 2 bandas catódicas a las dosis de 4.04 Gy<sup>-</sup>, las que no se observaron a la dosis de 5.19 Gy (Cuadro 1).

Los efectos provocados por la acción de la radiación ionizante sobre las proteínas a nivel molecular son de 2 tipos: directos e indirectos. Los primeros se producen cuando una partícula atómica (electrón, fotón, protón o neutrón) pasa a través de la sustancia produciendo una excitación ó ionización de la misma que puede pro-

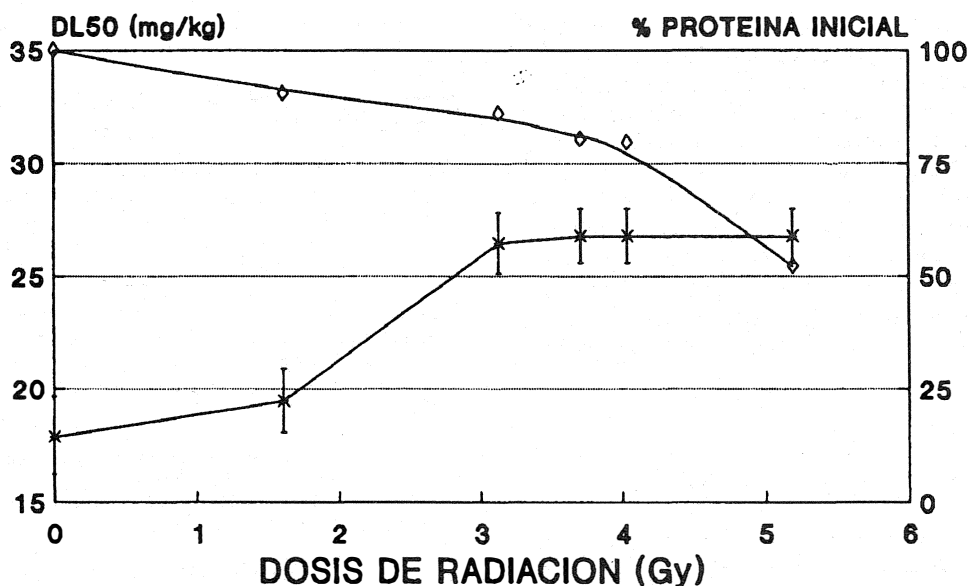


Fig. 1. Efectos de la radiación neutrónica de U-235, sobre la toxicidad aguda y el contenido protéico del veneno de *L. m. muta*. Las barras de la DL<sub>50</sub> representan los límites fiduciales al 95% de confianza.

#### CUADRO 1

Efecto de la radiación neutrónica de U-235 sobre la actividad antigénica del veneno de *Lachesis muta muta*.

Dosis de radiación (Gy)	Numero de bandas de precipitación	
	inmunodifusión	inmunolectroforesis
0.00	8	13
1.61	8	13
3.13	8	13
3.71	8	13
4.04	6	11
5.19	6	9

vocar un cambio a nivel estructural al liberar partículas atómicas ó átomos de la molécula; lo cual provocaría un reordenamiento molecular. El segundo efecto se produce cuando la sustancia en estudio se encuentra en solución acuosa y ella no es la que absorbe directamente la energía proveniente de la fuente radiactiva sino que la recibe a través de otras moléculas como son los radicales libres que reaccionan con los grupos más superficiales de las moléculas protéicas, siendo los efectos más drásticos (Skalka & Antoni 1970).

Aun cuando la radiación neutrónica del U-235 logró destoxificar significativamente al veneno de *L. m. muta*, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la producción simultánea de alteraciones marcadas en los niveles de proteínas cuantificadas como aminoácidos aromáticos así como en sus propiedades inmunoprecipitantes frente a su antiveneno específico, lo que sugiere la generación de alteraciones estructurales severas en las proteínas constituyentes del veneno. Skalka & Antoni (1970) han postulado que la aparición de nuevos grupos

carbonilo y amida así como la formación de nuevos enlaces cruzados intra estructura proteica, ó disturbios en los enlaces de hidrógeno conllevarían a cambios en la conformación espacial de las proteínas, los que serían los responsables de la alteración de las distintas actividades biológicas, entre ellas la reacción Antígeno-Anticuerpo. A la luz de estos resultados se hace necesaria la realización de mayores estudios del veneno destoxificado mediante irradiación neutrónica, a fin de evaluar su utilidad como antígeno en la preparación de sueros anti-veneno.

### AGRADECIMIENTOS

A Gustavo Balbin y al personal del Departamento de Animales Venenosos y Serpentario del Instituto Nacional de Salud. A Gilberto Salas, Agustín Zuñiga, Benjamín Marticorena y Mario Condor, del Instituto Peruano de Energía Nuclear por el apoyo brindado en la irradiación del veneno y sus sugerencias. A Zavaleta es beneficiario del Programa de Apoyo al Investigador del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú. Este trabajo se realizó dentro del Convenio de Cooperación para Investigación Científica y Docencia suscrito entre el Instituto Nacional de Salud del Perú y la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### REFERENCIAS

- Balvin, H. G. & J. Rodríguez-Tafur. 1984. Efecto de la Radiación Gama de Cobalto 60 en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. Bol. Inst. Nac. de Salud (Lima) 5: 115-119.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3º Ed. Cambridge University, Londres. 333p.
- Herrera, E., A. Yarlequé, S. Campos & A. Zavaleta. 1986. Efecto de la radiación gama sobre la actividad biológica y propiedades enzimáticas de los venenos de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. Informe Nuclear (Lima) 3 : 1-14.
- Kankofar, R. S. & S. Ganthavom. 1975. Irradiated Cobra (*Naja naja*) venoms for biomedical applications. Proceedings of a Symposium, Bombay 9-13 Dic. International Atomic Energy Agency, Viena STI/PUB/383: 252-262.
- Lauhatirananda, P. & S. Ganthavorn. 1970. Radiation effects on cobra venom. Proceeding of a Panel, Bangkok 19-22 May, International Atomic Energy Agency, Viena STI/PUB/243: 107-112.
- Rose, N.R. & H. Friedman. 1980. Manual of Clinical Immunology. 2º Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1105 p.
- Skalka, M. & F. Antoni. 1970. Effect of radiation on the properties of proteins. International Atomic Energy Agency, Viena STI/PUB/243: 1-11.
- Stauffer, C.E. 1975. A linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein. Anal. Biochem. 69: 46-648.
- Sundaram, K., P. Sundaresan & G.P. Phondke. 1970. Effect of Co-60 gamma irradiation on antigen - antibody system. International Atomic Energy Agency, Viena STI/PUB/243: 13-18.
- Zavaleta, A. & H. Alvarez. 1990. Envenenamiento por mordedura de serpientes, p. 427-440. In R. Morales Soto, (ed.). Urgencias en Medicina Interna, Segunda Parte. Talleres Gráficos P.L. Villanueva, Lima.