

Cambios en el patrón electroforético del veneno de la serpiente cascabel muda (*Lachesis muta stenophrys*) almacenado bajo diferentes condiciones*

José A. Gené, Bruno Lomonte, José M. Gutiérrez y Luis Cerdas
Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

(Recibido para su publicación el 23 de junio de 1985)

Abstract: Liquid and lyophilized samples of *Lachesis muta* venom were stored at different temperatures and for different periods of time, and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoelectrophoresis. Only slight variations were evident when three pools of freeze-dried venom, that had been kept at -30°C for several months were compared with fresh venom. These results suggest that *L. muta* venom is not altered drastically when stored under these conditions.

El veneno de cascabel muda (*Lachesis muta*) se utiliza en el Instituto Clodomiro Picado para la producción de suero antiofídico. A cada serpiente se le extrae veneno cada quince días, los venenos colectados se mezclan y se almacenan por períodos hasta de 5 años y su estabilidad debe garantizarse para poder obtener antivenenos eficaces para combatir las mordeduras de serpiente (Schöttler, 1951). Algunos autores han propuesto recomendaciones generales para el almacenamiento de venenos (Schöttler, 1951; Organización Mundial de la Salud, 1977; Williense y Hattingh, 1977; 1979; 1980; World Health Organization, 1981). Sin embargo, hemos intentado determinar las condiciones óptimas para el almacenamiento de nuestros propios venenos, ya que la estabilidad del veneno almacenado podría variar según la especie de serpiente.

El veneno se obtuvo de cinco ejemplares adultos de *Lachesis muta stenophrys* (Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica) siguiendo el procedimiento previamente descrito por Williense y Hattingh (1980). Los venenos frescos se mezclaron y una muestra fue analizada por electroforesis en gel de poliácridamida. El resto se dividió en cuatro alícuotas, dos de las cuales se congelaron inmediatamente a -30 °C y

se liofilizaron. Las otras dos se almacenaron en forma líquida. Una muestra líquida y otra liofilizada fueron almacenadas a 4°C; las otras dos se mantuvieron a -30°C.

Cada muestra se analizó mediante electroforesis por triplicado a los 1, 5, 8 y 15 días después de la extracción del veneno. Tres y 6 meses más tarde se hizo nuevamente electroforesis a cada una de las muestras en geles de poliácridamida al 7% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., E.U.A.) utilizando un amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA, pH 8.9. Todas las muestras se corrieron siempre a una concentración de veneno de 25 mg/ml y a 2,1 mA por gel durante 4,5 hr en una cámara para electroforesis Büchler (Fort Lee, N.J., E.U.A.). Los geles se tiñeron con negro almidón 10B 1% en ácido acético al 7% y se lavaron con ácido acético al 5%. El experimento se repitió una vez para corroborar los resultados.

A las cuatro muestras de veneno a una concentración de 25 mg/ml se les hizo inmunoelectroforesis después de seis meses de almacenamiento utilizando geles de agarosa al 0,75% (Division of Marine Colloids Inc., Rockland, Maine, E.U.A.), en amortiguador de barbital, pH 8,2 y fuerza iónica 0,1, utilizando una cámara electroforética Büchler. El antisuero utilizado fue el monovalente anti-laquéstico preparado en el Instituto Clodomiro Picado inmunizando caballos con veneno de *L. muta* liofilizado.

* Proyecto N° 02-07-10-66, financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

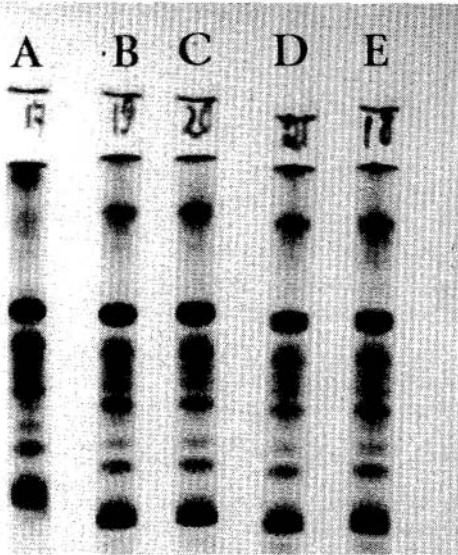


Fig. 1. Electroforesis de veneno de *L. muta* en gel de poliacrilamida después de seis meses de almacenamiento. (A) Veneno fresco; (B) y (C) veneno líquido almacenado a 4 °C y a -30 °C respectivamente; (D) y (E) veneno liofilizado almacenado a 4 °C y a -30 °C respectivamente. El veneno se utilizó a una concentración de 25 mg/ml en todos los casos.

zado y mantenido a -30 °C. Los geles se tiñeron con Ponceau S.

También se hizo electroforesis en geles de poliacrilamida a tres lotes diferentes de veneno de *L. muta* (Lotes 7-80, 5-79 y 2-79) que habían sido mantenidos liofilizados a -30 °C en nuestro laboratorio por 7,25 y 25 meses, respectivamente.

Al comparar las bandas de migración electroforética de las diferentes muestras de veneno almacenado con las del veneno fresco se observó leves diferencias en las bandas de migración anódica más lenta (Fig. 1). Por otra parte, los patrones de migración de las muestras almacenadas son muy similares entre sí. En inmuno-electroforesis se observó pequeñas variaciones en el número de bandas entre las diferentes muestras almacenadas.

Al comparar mediante electroforesis los diferentes lotes de veneno liofilizado mantenidos a -30 °C durante 7 y 25 meses con respecto al veneno fresco, también se observó diferencias en las bandas de migración anódica más lenta (Fig.2).

Los venenos almacenados que se utilizan en la inmunización de animales para la producción de antiseros deben ser tan similares como sea posible al veneno fresco en sus propiedades

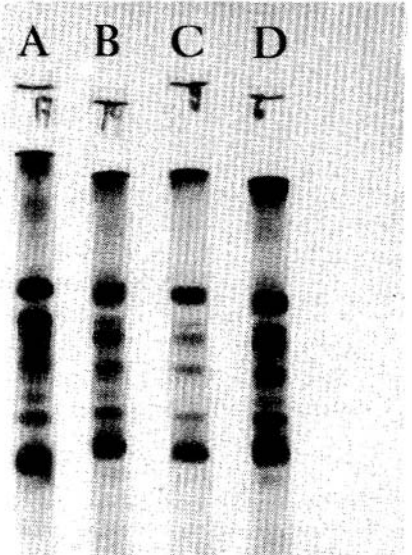


Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida de veneno de *L. muta* fresco (A) y veneno liofilizado Lote 2-79 (B), Lote 5-79 (C) y lote 7-80 (D). Se utilizó venenos a una concentración de 25 mg/ml.

antigénicas. Esto asegura una respuesta inmunológica eficiente, capaz de neutralizar el mayor número de toxinas presentes del veneno.

Este trabajo muestra que hay pequeñas variaciones en el patrón electroforético del veneno almacenado cuando se compara con el veneno fresco, independientemente de las condiciones de almacenamiento. Los resultados obtenidos con el veneno de *L. muta* no muestran diferencias drásticas en los patrones electroforéticos, lo que sugiere que para el veneno de *L. muta* el almacenamiento en forma liofilizada bajo refrigeración es adecuado según recomienda la Organización Mundial de la Salud (W.H.O., 1981). Esto contrasta con los resultados obtenidos por otros autores con veneno liofilizado de *Bitis arietans* y *Naja nivea* (Williemse y Hattingh, 1980). Sin embargo, se puede lograr una demostración más eficaz de las condiciones de almacenamiento más apropiadas para el veneno determinando si hay o no alteración de sus actividades biológicas, ya que los cambios en la movilidad electroforética y en los patrones de precipitación en inmuno-electroforesis sugieren pero no demuestran necesariamente cambios en la actividad de las toxinas.

Agradecemos a la señora Hilda Herrera, a la Srta. Rocío Monge y al señor Guillermo Flores por su colaboración en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Organización Mundial de la Salud. 1977. Manual de procedimientos. Producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa. Organización Panamericana de la Salud. Edición revisada, enero 1977. 189 p.
- Schöttler, W.H.A. 1951. On the stability of desiccated snake venoms. *J. Immunol.*, 67: 299-304.
- Williemse, G.T., & J. Hattingh. 1977. Effect of drying and storing on snake venoms. *S. Afr. Med. J.*, 52: 375.
- Williemse, G.T., & J. Hattingh. 1980. Effect of drying and storage on electrophoretic properties of venom from puff adders (*Bitis arietans*) and cape cobras (*Naja nivea*). *Herpetologica*, 36: 170-174.
- Williemse, G.T., J. Hattingh, R.M. Karlsson, S. Levy, & C. Parquer. 1979. Changes in composition and protein concentration of puff adder (*Bitis arietans*) venom due to frequent milking. *Toxicon*, 17: 37-42.
- World Health Organization. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. W.H.O. Coordination Meeting of Venoms and Antivenoms, Zurich, Switzerland, 1979, 44 p.