

ESTUDIO ELECTROFORETICO DEL VENENO DE SERPIENTE DE CASCABEL

Por AVELINO BARRIO (h)

Trabajos de Polson y colab. (7) y Moura Gonçalves y colab. (4, 5) demostraron las ventajas de la electroforesis como recurso para la dilucidación de los problemas planteados por la constitución química de los venenos ofídicos. Pero fué en realidad el último de los trabajos citados de Moura Gonçalves, el que nos indujo a realizar este estudio.

Al analizar el veneno de *Crotalus terrificus terrificus* procedente de diversas partes del Brasil, este autor encuentra que los electroforogramas son distintos, clasificándolos en tres tipos según su origen a saber: norte, centro y sud. El veneno del Sud del Brasil es idéntico electroforéticamente, según este autor, al de la Argentina, y es en él donde describe una proteína básica que designa con el nombre de *crotamina*, substancia que ocasionaría los síntomas veratrínicos descritos por nosotros (1).

Con el objeto de confirmar esa suposición efectuamos este trabajo.

Material y Métodos

Usamos veneno desecado al vacío a temperatura ambiente, de serpiente de cascabel *Crotalus terrificus terrificus* procedente de la provincia de Santiago del Estero. Este veneno fué diluído en concentraciones variables desde el 1 % al 10 % en "buffer" Veronal-Veronal Sódico y Cloruro de sodio a pH 8.6 (concentración en Veronal sódico 0.02 M).

Unas determinaciones se hicieron con el veneno dializado previamente, otras sin dializar.

En otros casos se disolvió antes el veneno crotálico en agua destilada o en solución fisiológica y se lo sometió a una diálisis contra agua destilada durante 24 a 48 horas. Este líquido exterior, vale

decir el que contenía las substancias que dializaban a través del tubo de celofán, fué concentrado al vacío unas 10 a 15 veces y luego destinado al análisis electroforético sobre papel de filtro.

Se emplearon varias técnicas de electroforesis pero preferentemente recurrimos a la electroforesis en papel de filtro según técnica de Durrum ⁽³⁾ y otros autores ⁽⁶⁾ modificada por Drewes ⁽²⁾. Se procedía de la siguiente manera: una vez embebida en el "buffer" la tira de papel de filtro de unos 6 cm. de ancho, se depositaba sobre ella por medio de una fina pipeta una banda de la substancia en estudio constituida por el veneno total o por las fracciones que dializan, diluidas al 20 % en solución fisiológica. La electroforesis duró término medio 3 horas circulando una corriente de 3,5 miliamperios y 700 voltios. Una vez concluida, toda la tira de papel de filtro era seccionada en dos franjas paralelas y longitudinales. Una, la más angosta era coloreada por el método de Durrum ⁽³⁾, la otra, más ancha, se destinaba al ensayo biológico. Se colocaban luego paralelamente ambas bandas una junto a otra, y la ancha era cortada en pequeños trozos transversales correspondientes a cada una de las fracciones que podían evidenciarse en la banda coloreada, que se tomaba como referencia. Cada uno de los trozos era lavado por arrastre con pequeñas cantidades de solución fisiológica, o bien macerados en distintos tubitos con solución fisiológica.

RESULTADOS

Confirmamos lo expresado por Moura Gonçalves al comprobar que a pH 8,6, además de las dos fracciones que migran hacia el polo positivo existe otro componente de naturaleza alcalina que va hacia el polo negativo, motivo por el que no nos resulta clara la definición de movilidad positiva dada por este autor.

Al comparar los electroforogramas (véase fig. adjunta) del veneno total y de las fracciones que dializan a través del celofán, se observa que la fracción 3, constituida por la *crotovina* no ha sido permeable al celofán como era de esperar por su alto peso molecular de 30.000, mientras que la 2 constituida por el fermento coagulante y la 1 por la *crotamina* han dializado fácilmente.

La inyección en ratones y ratas de cada una de las tres fracciones puso en evidencia que solamente la fracción del lado negativo (*crotamina*) posee actividad veratrinizante dado que los otros componentes provocan la muerte de los animales sin la aparición de los síntomas espasmódicos

COMENTARIO Y CONCLUSIONES

Moura Gonçalves dice que "es posible" que los síntomas veratricos descriptos por nosotros en el veneno crotálico tipo I, sean ocasionados por la proteína básica aislada del compartimiento superior de la rama descendente, dado que su inoculación determina la aparición de aquellos síntomas. O. Vital Brazil ⁽⁸⁾ testigo presencial de los experimentos ante dichos, nos refirió que en realidad el cuadro que se observa luego de la inyección de esta substancia no era muy típico, pues los espasmos que ocasionalmente aparecían en el animal inyectado eran muy fugaces y no de la intensidad que debería corresponder a la substancia activa responsable, en estado de pureza. Hemos creído hallar la causa de ese resultado un tanto incierto: en efecto, Moura Gonçalves dializa previamente el veneno durante 24 horas contra la solución "buffer" y aunque diluye luego parcialmente dicho veneno con el dializado, una gran parte del componente básico se pierde, obteniendo por consiguiente una diagrama electroforético cuantitativamente erróneo. Hecho que se pone de manifiesto si comparamos nuestro electroforograma, donde se advierte la gran proporción que corresponde al componente de movilidad negativa, con el valor de 9,85 % dado por ese autor, para la misma substancia. Pero luego la pérdida es mayor, pues con el objeto de eliminar el barbiturato de la muestra extraída, antes de inyectarla en los ratones, la somete a una nueva diálisis no sabemos por cuánto tiempo. Es evidente que, en esos condiciones, el líquido inyectado ha de tener muy poca actividad específica.

De nuestros experimentos surge que:

1º) El veneno de *Crotalus terrificus terrificus* procedente de la Argentina posee 3 componentes electroforéticamente evidenciables de los cuales, a pH 8,6, dos de ellos migran hacia el polo positivo y uno hacia el negativo.

El componente 1 corresponde al componente básico (*factor veratrinizante* o *crotamina* de M. Gonçalves).

La fracción 2 incluiría a la o las enzimas proteolíticas, coagulantes y anticoagulantes.

La fracción 3 comprendería al *factor neurotóxico* y *fosfatidásico* (*crotoxina* de Slotta y Fraenkel Conrat).

2º) La crotamina se encuentra en proporciones muy superiores al 9,85 % señalado por M. Gonçalves. Dializa fácilmente a través del celofán, evidenciando su bajo peso molecular y es sin lugar a dudas

la responsable de la actividad veratrínica del veneno de cascabel meridional.

Finalmente nos permitimos llamar la atención sobre la utilidad que nos ha prestado y puede prestar la técnica del papel de filtro al permitir ensayar biológicamente cada uno de los componentes aislados.

Expresamos nuestro agradecimiento al Sr. Atilio Drewes por la valiosa colaboración prestada para la realización de este trabajo.

SUMMARY

1^o) The venom of *Crotalus terrificus terrificus* from Argentina have 3 electroforectic components in evidence; at pH 8.6, two of these, migrate, to the anode and one to the cathode.

The first component belongs to the basic protein (the *veratrizing factor* or M. Goncalves's *crotamine*).

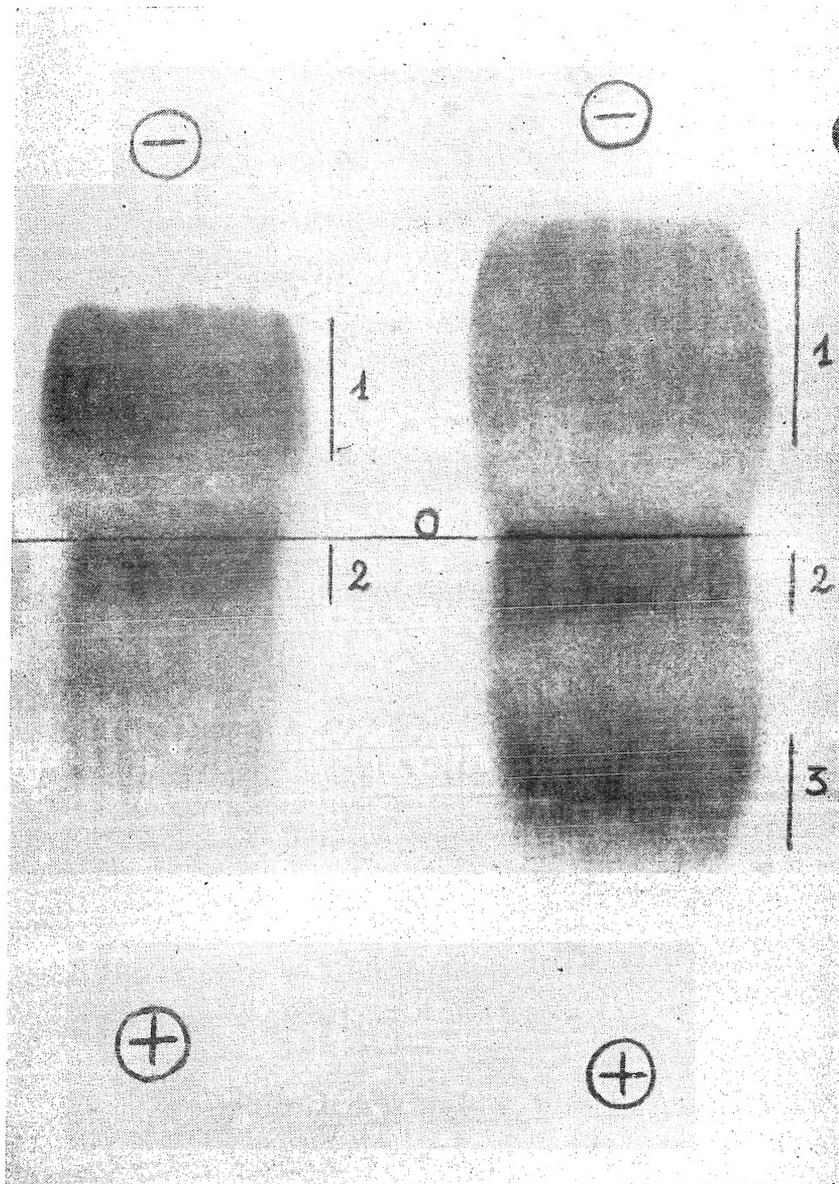
The second component would include the coagulant and anti-coagulant proteolytic enzymes.

The third component would be related to the *neurotoxic and phosphatidasic factor* (Slotta's and Fraenkel Conrat's *crototoxine*).

2^o) Crotamine is found in highest proportions than the 9.85 % indicated by M. Goncalves. It is easily dialyzed through celophane, putting in evidence its low molecular weight and it is, undoubtedly, the cause of the veratrinic activity of the meridional rattle-snake's venom.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) BARRIO A. (h.), VITAL BRAZIL, O. — *Acta physiol. Latinoamer.*, 1951, 1, 291.
- 2) DREWES, A. — *Rev. Inst. Malbrán*, 1954, (en prensa).
- 3) DURRUM, E. L. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 2945.
- 4) MOURA GONCALVES, J., GOUVEA VJEIRA, L. — *An. Acad. Bras. Cienc.*, 1950, 22, 141.
- 5) MOURA GONCALVES, J., POLSON, A. — *Arch. Bioch.*, 1947, 15, 253-259.
- 6) MACHEBOEUF, M., REBEYNOTTE, P., BRUNEIRE, M. — *Bull. Soc. Chimier. Biol.*, 1951, 55, 1545.
- 7) POLSON, A., JOUBERT, F. C., HAIG, D. A. — *Biochem. J.*, 1946, 40, 265.
- 8) VITAL BRAZIL, O. — *Comunicación personal*.



Electroforesis en papel de filtro del veneno de *Crotalus terrificus terrificus* de la Argentina.

El electroforograma de la derecha corresponde al veneno total, el de la izquierda a las fracciones que dializaron. Fracción 1 de movilidad hacia el polo negativo (factor veratrinizante o "crotamina"). Fracción 2 (enzimas proteolíticas y coagulantes) y 3 ("crotoxina") que migran hacia el polo negativo. — 0 — línea de punto de partida inicial.