

ANTICUERPOS SEGUROS Y EFICACES: LA REVOLUCIÓN DE LOS NUEVOS ANTIVENENOS

Alejandro Alagón*

ENVENENAMIENTOS POR ANIMALES Y SUS VENENOS

Los envenenamientos por animales ponzoñosos son un verdadero problema de salud pública. En el año 2000 la Secretaría de Salud reportó 261 mil 754 intoxicados por picaduras o mordeduras de animales; 208 mil 444 fueron causados por alacranes y el resto por abejas, arañas y serpientes. El tratamiento es la aplicación del antiveneno específico. Nuestro país dispone de antivenenos de gran calidad contra vipéridos (cascabeles, nauyacas y cantiles), coralillos, la araña viuda negra (o capulina) y los alacranes (o escorpiones), por lo que la mortalidad es más bien baja y continúa descendiendo. Como corolario de lo hasta aquí mencionado, en el ámbito mundial México cuenta con la mayor experiencia clínica, en el manejo con anticuerpos de pacientes emponzoñados (fig. 1).

Los venenos son mezclas altamente heterogéneas de compuestos biológica y farmacológicamente especializados. Los compuestos tóxicos son mayormente de naturaleza peptídica o proteica. Los péptidos más importantes de los venenos de los alacranes peligrosos son neurotoxinas que bloquean y/o modifican el mecanismo de apertura y cierre de canales iónicos de las membranas excitables (Dehesa-Dávila *et al.*, 1995; Possani *et al.*, 1999). Los venenos de las víboras poseen proteínas con actividades necróticas, miotóxicas, edematizantes y hemolíticas, mientras que las serpientes de coral tienen neurotoxinas de mediana y baja masa molecular que inhiben la unión neuromuscular.

El veneno de la viuda negra se distingue de los anteriores porque una sola proteína de enorme tamaño es la responsable de la toxicidad en mamíferos. Esta brevísima descripción de los venenos sirve para entender por qué el único recurso eficaz en el tratamiento de estos accidentes son los antivenenos ya que poseen la variedad necesaria de anticuerpos que neutralizan a los distintos componentes tóxicos presentes en un veneno.

LOS PRIMEROS ANTIVENENOS ERAN SUEROS

El desarrollo de la inmunología y los avances en la seroterapia han estado muy ligados. Los anticuerpos fueron descubiertos en 1890, cuando Behring y Kitasato demostraron que el suero (la porción fluida de la sangre coagulada) de animales inmunizados con toxina diftérica o con toxina tetánica contenía agentes protectores. Al inyectar suero inmune junto con una dosis letal de toxina a animales susceptibles, éstos sobrevivieron, en tanto que los animales control, que recibieron toxina pero no suero, murieron. El mismo Emil von Behring, a finales de 1891, trató con suero de oveja inmunizada a un niño berlinés con difteria que se debatía entre la vida y la muerte; el resultado fue espectacular. En París, otro Emilio, de apellido Roux, repitió la experiencia el 1 de febrero de 1894; esta vez utilizó antitoxina diftérica producida en caballos. De manera vertiginosa se produjeron los primeros antivenenos; Phisalix y Bertrand por un lado y Calmette

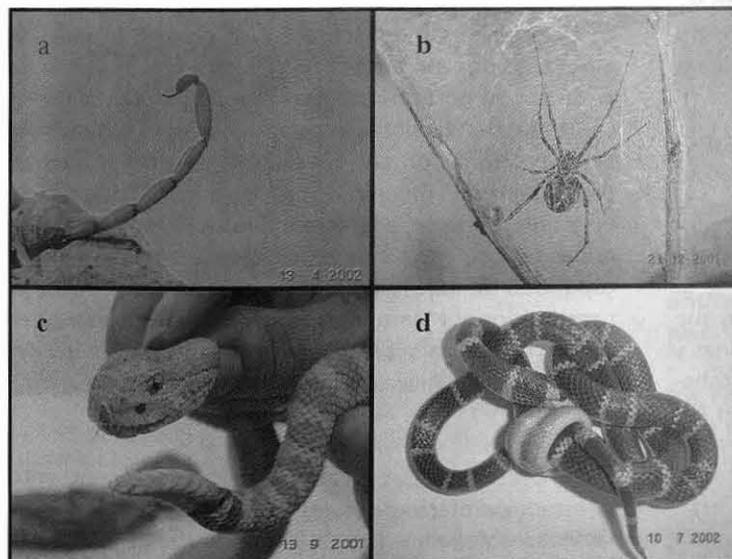


Figura 1. Algunos animales para los que existen antivenenos: (a) Posabdómen ("cola") de un alacrán *Centruroides*; el último segmento, o telson, posee dos glándulas venenosas cuya secreción desemboca en el aguijón. (b) Araña viuda negra o capulina (*Latrodectus mactans*); en la parte ventral del abdomen se localiza la marca característica de la especie: una silueta roja en forma de reloj de arena; la tela que tejen es muy desorganizada y es de las más resistentes. (c) Serpiente de cascabel del género *Crotalus*; nótese la lengua bífida, la cabeza triangular y la estructura al final de la cola que le da el nombre. (d) Coralillo de la especie *Micrurus browni* alimentándose de una culebra; esta especie posee el patrón colorido típico para este grupo de serpientes, el cual tiene varias excepciones que pueden resultar peligrosas

* Investigador titular C. Investigador nacional nivel III. Tiene más de 70 publicaciones y es experto en anticuerpos terapéuticos y diagnósticos, así como en toxinas de animales

por otro, también en 1894, inmunizaron caballos con veneno de serpientes europeas y cobras asiáticas, y demostraron la utilidad de los sueros equinos en el tratamiento de mordeduras de serpientes. Había nacido la seroterapia.

Cuando un paciente recibe un suero inmune se dice que ha sido inmunizado pasivamente, condición que contrasta con la inmunización activa que resulta de la exposición directa a un patógeno o toxina. Los principios activos de los sueros inmunes (antisueros) son los anticuerpos. Un anticuerpo es una proteína que se une específicamente a una sustancia en particular, su antígeno. Cada molécula de anticuerpo tiene dos sitios capaces de interactuar con el antígeno correspondiente; sin embargo, todos los anticuerpos tienen la misma estructura general y a su conjunto se les llama inmunoglobulinas (fig. 2). El papel principal de los anticuerpos es el de incrementar considerablemente la eficacia de los mecanismos normales de resistencia hacia un agente específico. Por ejemplo, un antisuero dirigido contra una bacteria contiene anticuerpos que cubren la superficie de la célula bacteriana y la vuelven más susceptible a la fagocitosis; en muchos casos, la cubierta de anticuerpos permite también que la bacteria sea destruida por el sistema del complemento.

Los anticuerpos protegen contra las invasiones bacterianas la acción de toxinas bacterianas y de ponzoñas de animales venenosos. Si un animal es inmunizado con una toxina, desarrollará anticuerpos capaces de combinarse con la misma y neutralizarla, esto es, la hará no tóxica. Un suero que contiene tales anticuerpos es llamado antitoxina (por ejemplo contra la toxina tetánica); un suero con anticuerpos dirigidos contra los diferentes componentes de un veneno animal es llamado antiveneno (por ejemplo, contra el veneno de alacrán).

MUCHOS ANTIVENENOS SON INMUNOGLOBULINAS PURIFICADAS

Los seroterápicos de primera generación, como los de Behring y Roux, se utilizaron hasta los primeros años de la década de los treinta, si bien aún quedan productores que los siguen preparando. Hasta entonces, las antitoxinas y antivenenos eran los sueros crudos provenientes de caballos hiperinmunizados. Es decir, a los pacientes se les administraban multitud de proteínas séricas irrelevantes que acompañaban a los anticuerpos. Con tales seroterápicos, las reacciones alérgicas y la enfermedad del suero eran muy frecuentes; por ejemplo, se estima que la frecuencia

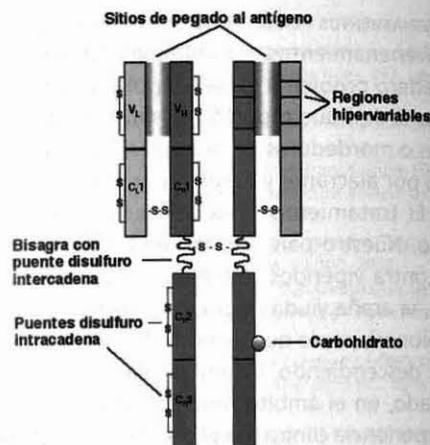


Figura 2. Esquema de la estructura de una molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas están formadas por cuatro cadenas, dos pesadas (H, en azul) y dos ligeras (L, en amarillo). La cadena pesada tiene cuatro dominios (uno variable y tres constantes) mientras que la ligera tiene dos (uno variable y otro constante). Cada dominio variable, tanto de la cadena L como de la H, posee tres regiones hipervariables que son las que directamente establecen los contactos moleculares para pegarse al antígeno correspondiente. Dada la simetría de la molécula cada anticuerpo tiene la capacidad de reconocer a dos moléculas de antígenos. Varios puentes disulfuro ayudan a estabilizar la estructura. La región de la bisagra de las cadenas H es altamente flexible

de la enfermedad del suero en los cientos de miles de niños tratados con antitoxina diftérica fue de alrededor de 50 por ciento. Esta incidencia se redujo sustancialmente con el fraccionamiento de las inmunoglobulinas mediante su precipitación con diversas sales y otros agentes precipitantes. El proceso de precipitación separa, de manera muy eficiente, a las inmunoglobulinas de otras proteínas séricas, entre las que destaca la albúmina por su capacidad de inducir reacciones adversas. Los productos constituidos por inmunoglobulinas altamente enriquecidas son la base para la seroterapia de segunda generación, que todavía se utiliza ampliamente en el mundo.

ANTIVENENOS MÁS SEGUROS: LOS FIBROTÉRICOS

Posteriormente, en las décadas de los cuarenta y cincuenta, se estudió el efecto de varias enzimas proteolíticas sobre las inmunoglobulinas (fig. 3). El resultado principal de estas

investigaciones fue el conocimiento de que la función neutralizante de los anticuerpos (la que interacciona con las toxinas y moléculas de los venenos) puede disociarse de las llamadas funciones efectoras de los anticuerpos (que son las responsables de varios de los efectos secundarios de la seroterapia). La modificación proteolítica, además, reduce el tamaño de las inmunoglobulinas y sus propiedades inmunogénicas y antigénicas. Las inmunoglobulinas purificadas y digeridas con pepsina, es decir, como fragmentos $F(ab')_2$, constituyen el estado del arte en la seroterapia de tercera generación o faboterapia. El uso de faboterápicos prácticamente ha eliminado las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (anafilaxia) y de tipo tardío (enfermedad del suero). En más de 250 mil pacientes tratados en el IMSS con faboterápicos (Alacra-

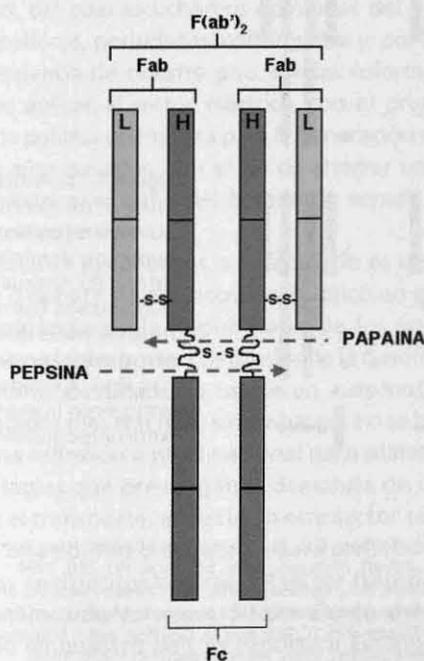


Figura 3. Modificación enzimática de las inmunoglobulinas. La región bisagra es muy susceptible al ataque de enzimas proteolíticas. La papaína corta de manera tal que genera dos fragmentos Fab (con capacidad de reconocer a su antígeno) y uno Fc. La pepsina corta por abajo del puente disulfuro de la bisagra dejando a los dos fragmentos Fab unidos covalentemente en lo que se conoce como el fragmento $F(ab')_2$, mientras que degrada al fragmento Fc

myn® y Antivipmyn®) no ha habido una sola reacción aguda grave o alguna enfermedad del suero, aun entre los varios miles de pacientes tratados con múltiples dosis o los varios cientos tratados en varias ocasiones en un mismo año (Maraboto-Martínez, *et al.*, 1997). Las estadísticas de la Cruz Roja de León, Gto., con varias decenas de miles de pacientes picados por alacrán, confirman la seguridad de los faboterápicos (Calderón-Arana, *et al.*, 1996). Otra ventaja de los fragmentos $F(ab')_2$ sobre las inmunoglobulinas es que llegan mejor al compartimento extravascular, lo que permite la neutralización eficiente de muchos componentes de los venenos que actúan fuera del torrente circulatorio.

Hace casi cuatro años propuse los términos *faboterapia* y *faboterápico* para remplazar los de *seroterapia* y *antisuero*, asociados por médicos y pacientes a reacciones secundarias de alta peligrosidad. Junto con un grupo de expertos clínicos, epidemiólogos y productores, hicimos la solicitud a las autoridades correspondientes; recientemente la faboterapia logró ya un lugar propio en la farmacopea mexicana. Este cambio conceptual ha favorecido su empleo en muchos casos en que su utilidad para salvar vidas, reducir sufrimientos o limitar secuelas es indiscutible.

LAS GRANDES AVENIDAS PARA LOS ANTIVENENOS DEL FUTURO

Actualmente, la industria biotecnológica tiene más de una centena de anticuerpos recombinantes en ensayos clínicos. Sólo en terapias contra el cáncer hay más de 40 anticuerpos en evaluación por la Food & Drug Administration (FDA). De éstos, unos diez anticuerpos ya están en fase III de estudio. Así, varios de ellos seguramente se sumarán al arsenal terapéutico de las dos docenas de anticuerpos recombinantes ya aprobados para su uso abierto por la FDA.

Si bien los antivenenos existentes son eficaces y seguros, tienen algunas limitantes. La principal es que, de origen, son heterólogos. Esto conlleva el riesgo, si bien minimizado en los faboterápicos, de posibles reacciones de hipersensibilidad inmediata o tardía. Otra limitante, no menos importante, es que se cae dentro de la respuesta inmune variable individual, es decir, hay caballos que

responden muy bien y otros que no; además, no se garantiza (incluso con esquemas de inmunización optimizados) una respuesta inmune adecuada y sostenida en los caballos.

Dentro de este marco resulta difícil y dispendioso uniformar la producción de antivenenos. Otra desventaja es el número enorme de ratones que son utilizados para el seguimiento y control de calidad de la producción de antivenenos. La tendencia actual en la producción, control de calidad de fármacos y biológicos es la reducción del número de animales involucrados. Son de esperarse, por tanto, legislaciones y reglamentos que restrinjan cada vez más la utilización de caballos como fuente de anticuerpos y de ratones en su valoración. Otro problema asociado al uso de cualquier mamífero como fuente de anticuerpos terapéuticos es la posibilidad, si bien baja, de transmitir virus y priones a los pacientes; por eso es cada vez mayor la lista de virus de los que hay que demostrar su ausencia en los caballos productores. Finalmente, ciertos venenos (como el de abeja) no inducen a una respuesta policlonal protectora adecuada, dada la pobre inmunogenicidad de algunos de sus componentes, por lo que es difícil producir los antivenenos respectivos.

Algunos de los desarrollos tecnológicos de los últimos años pudieran aplicarse al campo de los antivenenos, si bien para aquellos venenos con múltiples componentes tóxicos aún es muy difícil hacerlo. El uso de anticuerpos recombinantes humanos (o lo más humanizados posible) eliminaría muchas de las limitantes antes mencionadas. Se puede partir de anticuerpos monoclonales (fig. 4a) de ratón cuya capacidad neutralizante esté bien valorada; mediante técnicas de ingeniería genética es posible lograr quimeras en las que el reconocimiento del antígeno está dado por los dominios V murinos y el resto del anticuerpo es de origen humano (fig. 4b). También es posible "humanizarlos" aún más (fig. 4c). Otra alternativa es generar construcciones de anticuerpos a partir de bibliotecas de genes que codifican para dominios V humanos. El despliegue en fagos (*phage display*) brinda esta posibilidad (Burton y Barbas, 1994). En su versión más frecuente los anticuerpos se expresan como Fabs o Fvs (sólo las regiones V_H y V_L) sobre la superficie de un fago filamentos. Los Fabs o Fvs de interés se aíslan a través de rondas de selección contra el antígeno deseado. Por un proceso llamado selección por pegado específico de los fago-

anticuerpos al antígeno unido a una fase sólida, lavado exhaustivo y elución de los mismos (*biopanning*), los fagos recuperados llevan la información genética del anticuerpo con lo que puede llevarse a bacterias para su producción.

Las bibliotecas de anticuerpos humanos pueden construirse a partir del ARN que codifica para anticuerpos de linfocitos presentes en la sangre de individuos inmunizados naturalmente contra algún veneno; por ejemplo, hay cuidadores de colmenas que son resistentes al ataque de cientos de abejas y que tienen cantidades muy grandes de anticuerpos.

Como puede verse, aún no se ha dicho la última palabra sobre antivenenos.

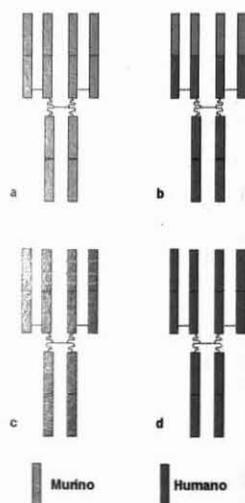


Figura 4. (a) Anticuerpo murino. (b) Anticuerpo quimérico (dominios C humanos, dominios V de ratón). (c) Anticuerpo humanizado (las regiones hipervariables que reconocen al antígeno de ratón han sido injertadas en un anticuerpo humano). (d) Anticuerpo humano

REFERENCIAS

- Burton, D.R. y Barbas, C.F., III, "Human antibodies from combinatorial libraries", *Advan. Immunol.*, núm. 57, págs. 191-280, 1994.
- Calderón-Aranda, E.S., Dehesa-Dávila, M., Chávez-Haro, A., and Possani, L.D., "Scorpion stings and their treatment in Mexico", en *Envenomings and Their Treatments*, (C. Bon and M. Goyffon, eds.), Editions Fondation Marcel Mérieux, Lyon, Francia, págs. 311-320, 1996.
- Dehesa-Dávila, M., Alagón, A. C., y Possani, L.D., "Clinical Toxicology of scorpion stings", en *CRC Handbook of Human Toxicology Series* (Meier, J. & White, J. eds.), CRC Press, Nueva York, págs. 221-238, 1995.
- Maraboto-Martínez, J.A., Chávez-Haro, A., García-Willis, C. Rivas, M. y Alagón, A., "Mexican Institute of Social Security: Epidemiological data on scorpion and snake accidents and their treatment", 12th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, Cuernavaca, Mor. septiembre 21-26, 1997.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepiere, M. y Tytgat, J., "Scorpion toxins specific for Na⁺-channels", *Eur. J. Biochem.*, núm. 263, págs. 1-15, 1999.