

EFFECTO DEL SUERO ANTIOFIDICO SOBRE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DEL COMPLEMENTO HUMANO (IN VITRO) Y DE CONEJO (IN VITRO E IN VIVO)

Jenny Montero, Marianela Trejos y Bruno Lomonte

*Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,
Universidad de Costa Rica*

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó el efecto del suero antiofídico polivalente, producido en Costa Rica, sobre la actividad hemo-í-tica (CH50) del complemento sérico humano (in vitro) y de conejo (in vitro e in vivo). Mediante experimentos in vitro, se encontró actividad anticomplementaria significativa en ambas especies, tanto con suero antiofídico líquido como con suero liofilizado y reconstruido. Para determinar la relevancia in vivo del fenómeno observado in vitro, se utilizó un modelo experimental en conejos. Se inyectó a los animales una dosis de suero antiofídico de 2 ml/Kg por vía intravenosa, y sus niveles de complemento sérico se determinaron a los 0 (antes de la inyección), 15, 60 y 120 minutos. Se encontró una disminución significativa de la actividad del complemento sérico, evidente desde los quince minutos después de la administración del suero polivalente. También se investigó el efecto del suero antiofídico sobre el nivel del componente C3 en suero humano, in vitro. No se encontró variación significativa en este parámetro, mediante la técnica de inmunodifusión radial. La actividad anticomplementaria ejercida por el suero antiofídico podría explicar, al menos parcialmente, la aparición de reacciones adversas tempranas, de tipo anafilactoide, en algunos pacientes, luego de su administración en el tratamiento de mordeduras de serpiente. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1989; 10(1):).

INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, la utilización de antitoxinas de origen heterólogo con fines terapéuticos ha presentado el problema de las posibles reacciones adversas (8). La Organización Mundial de la Salud clasifica dichas reacciones como tempranas y tardías (18). Las reacciones tempranas se definen como las que ocurren dentro de las veinticuatro horas posteriores a la administración del suero (o sus fracciones) y su severidad varía desde reacciones leves hasta letales. Las reacciones severas tempranas son frecuentemente llamadas "anafilactoides", cuando hay hipotensión con o sin colapso u obstrucción de vías respiratorias. Estas reacciones inician pocas horas después de la administración intramuscular del suero, o mucho antes cuando se utiliza la vía intravenosa. A diferencia de otro tipo de reacciones tempranas, las anafilácticas verdaderas, no participa la IgE en su mecanismo de acción. Por otra parte, las reacciones tardías se presentan típicamente entre los cinco y veinticuatro días después de la administración del suero (o sus fracciones). Sus características clínicas incluyen fiebre, urticaria, artralgia, linfadenopatía, proteinuria o neuropatía (4, 15, 18). Las reacciones tempranas fueron consideradas en un tiempo únicamente como reacciones por hipersensibilidad inmediata (tipo I, mediadas por IgE) hacia las proteínas séricas heterólogas, por lo general equinas. Sin embargo, su prevalencia en poblaciones nunca expuestas al antígeno y la ausencia de hipersensibilidad cutánea

específica en la mayoría de los pacientes posteriormente reactivos, han sugerido la existencia de otros mecanismos adicionales (10). Entre los mecanismos citados para explicar estas reacciones adversas se encuentra la activación de complemento (1, 14). Sutherland (17) examinó nueve tipos de sueros antiofídicos equinos comerciales, de nueve distintos países, y encontró niveles significativos de actividad anticomplementaria *in vitro* en ocho de las muestras estudiadas. También encontró actividad anticomplementaria en antitoxinas de origen equino contra las exotoxinas de difteria, tétanos y gangrena. Según el autor, el hallazgo de una marcada actividad anticomplementaria *in vitro* implica que existe el potencial de que los antis ueros causen reacciones tempranas de tipo anafilactoide. Estas reacciones son impredecibles, dado que por no estar relacionadas con la exposición previa a la proteína heteróloga, no son detectadas por las pruebas cutáneas previas a la administración del antiveneno (17).

Las observaciones sobre la actividad anticomplementaria de los sueros antiofídicos producidos en diversos países, nos motivaron a estudiar dicho efecto en los sueros producidos en Costa Rica, sobre los cuales no existía ninguna información al respecto. Para esto realizamos experimentos *in vitro*, con sueros humano y de conejo, y experimentos *in vivo* utilizando el conejo como modelo experimental.

MATERIAL Y METODOS

Muestras:

Se utilizaron muestras de suero fresco humano y de conejo, de individuos aparentemente sanos, de ambos sexos. Las muestras fueron extraídas por punción venosa (humanos) o arterial (conejos; arteria central de la oreja), se dejaron coagular por 30 mm y se centrifugaron por 10 mm a 500 xg. Seguidamente se separó el suero y se analizó en un tiempo no mayor de una hora desde la punción.

Suero antiofídico:

Se utilizó el suero polivalente de origen equino producido en el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica (lotes P-177 y P-170 líquidos, y P-170 liofilizado). La mezcla antigénica para producir este antiveneno incluye los venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* y *Lachesis muta stenophrys* (3).

Determinación de la actividad del complemento (CH50) en suero humano y de conejo:

Para determinar la actividad hemolítica del complemento sérico humano se utilizó un método de CH50 previamente descrito (11). La sensibilización de los eritrocitos de carnero se realizó con una dilución final de 1:600 de hemolisina de conejo anti-eritrocitos de carnero (lote 101; Instituto Clodomiro Picado). Para la determinación del complemento de conejo se utilizó el mismo método citado, pero con una dilución inicial de 1:5 del suero (en vez de 1:20) ya que su actividad hemolítica es menor que la del complemento humano. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las lecturas espectrofotométricas se procesaron mediante un programa en BASIC (9) para calcular la actividad CH50 en unidades/ml (U/ml), a partir de la línea de regresión log (Y/1-Y) vs. log (μ l de suero).

Efecto del suero antiofídico sobre el complemento humano in vitro:

Para determinar dicho efecto se realizó una prueba preliminar con el suero de dos donadores normales. Se agregó 0,2 ml de suero antiofídico (liofilizado/reconstituido o líquido) a 0,2 ml del suero humano, como parte de la dilución 1:20 del esquema normal de trabajo. Al control se le agregó 0,2 ml del amortiguador de barbital en vez del suero antiofídico. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 15 mm y posteriormente se analizaron por CH50, por duplicado. Como control, se demostró previamente que el suero antiofídico por sí mismo no posee acción lítica en el sistema de CH50 utilizado.

Para determinar si el efecto anticomplementario sigue una relación dosis-

respuesta, se analizaron las muestras de suero provenientes de cinco donadores. Cada muestra se probó con diferentes cantidades de suero antiofídico, para lo cual se agregó una cantidad constante (0,2 ml) de suero humano a cuatro tubos diferentes: al primero (control) no se le agregó suero antiofídico, a los restantes se les agregó 0,05, 0,10 y 0,20 ml del suero polivalente, respectivamente (a tres de las muestras se les agregó suero antiofídico liofilizado/reconstituido y a las otras dos se les adicionó suero antiofídico líquido). Todas las mezclas se llevaron a una dilución final de 1:20 en barbital, se incubaron por 15 mm a 37°C y se analizaron por CH50, por duplicado.

Efecto del suero antiofídico sobre el complemento de conejo in vitro:

Se utilizaron muestras de suero de cuatro conejos. Cada muestra se probó con diferentes cantidades de suero polivalente líquido, para lo cual se agregó una cantidad constante (0,8 ml) de suero de conejo a cuatro tubos: al primero (control) no se le agregó suero antiofídico, a los restantes se les agregó 0,2, 0,4 y 0,8 ml del suero antiofídico, respectivamente. Todos los tubos se llevaron a una dilución final de 1:5 en barbital, se incubaron 15 mm a 37°C y luego se analizaron por CH50, por duplicado.

Efecto del suero antiofídico sobre el complemento de conejo in vivo:

Se utilizó cinco conejos, de 1500 a 2000 g de peso corporal, a los cuales se les tomó una muestra de sangre en el tiempo cero (antes de la administración del suero antiofídico). Inmediatamente se les inyectó suero polivalente líquido, por vía intravenosa, en una dosis de 2,0 mlMg de peso. El suero se administró sin diluir, en un tiempo de 30-60 seg. La dosis fue escogida con el fin de equiparar o superar ligeramente las dosis utilizada en casos de envenenamiento severo en humanos. Posteriormente se tomó muestras de sangre a los 15, 60 y 120 mm, y se les determinó la actividad hemolítica del complemento, por duplicado.

Efecto del suero antiofídico sobre la fracción C3 del complemento humano:

Se utilizaron placas de inmunodifusión radial para la cuantificación de C3 humano (Immunoplate, Cooperbiomedical, Pennsylvania, E.U.A.). Esta prueba se realizó con suero de dos donadores, a tres distintas concentraciones de antiveneno. Se hicieron diferentes diluciones de las muestras agregando una cantidad constante de suero humano (0,2 ml) y diferentes cantidades de suero polivalente: control (suero humano solo), 0,025 ml, 0,050 ml y 0,10 ml del suero polivalente, completando el volumen a 0,3 ml con solución salina. Después de incubar 15 mm a 37°C, se analizó cada dilución por duplicado. Las concentraciones de C3 se calcularon con base en una curva de calibración realizada con los estándares internos del método.

Estadística:

Para la comparación de promedios se utilizó la prueba de *t* de Student, mediante el programa MICROSTAT (Ecosoft Inc., E.U.A.) para IBM.

RESULTADOS

Efecto sobre el complemento humano in vitro:

En la prueba preliminar (Fig. 1), se encontró que el suero antiofídico (líquido y liofilizado) causó una ligera pero estadística-mente significativa ($p < 0,01$) disminución en la actividad CH50, en ambas muestras de suero. En la Fig. 2 se muestra el efecto de disminución de la actividad de complemento en las muestras de suero, ejercido tanto por el suero polivalente líquido (Fig. 2a) como por el liofilizado (Fig. 2b).

Efecto sobre el complemento de conejo in vitro:

También con suero de conejo se dio una disminución en la actividad CH50. La disminución fue significativa a $p < 0,01$ en tres de los cuatro sueros probados y a $p < 0,05$ en el restante (Fig. 3).

Efecto sobre el complemento de conejo in vivo:

En la Fig. 4 se muestra el efecto producido sobre la actividad de complemento sérico en cinco conejos, luego de la administración intravenosa del suero antiofídico polivalente. Se observó una disminución en la CH50 desde los 15 mm después de haber administrado el suero. Dicha depleción se mantuvo relativamente estable a los 60 y 120 mm luego de la aplicación del suero antiofídico. A los 15 mm, el efecto fue significativo ($p < 0,01$) en cuatro de los cinco conejos.

Efecto sobre la fracción C3 del suero humano in vitro:

La concentración de C3 de las muestras control y de las muestras incubadas previamente con suero antiofídico a diferentes diluciones no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$).

DISCUSION

Los presentes resultados muestran que el suero polivalente antiofídico producido en Costa Rica, tanto líquido como liofilizado, posee actividad anticomplementaria sobre el suero humano *in vitro*. Este efecto es moderado pero significativo. En este sentido debe tomarse en cuenta que, por su naturaleza, el método de CH50 es poco sensible para detectar disminuciones del complemento, y probablemente requiera de un consumo sustancial del mismo para dar resultados bajos (7; 13). El hecho de que no se observara disminución en el componente C3 *in vitro* podría deberse al método empleado para su cuantificación, dado que la inmunodifusión radial no distingue entre componente funcional e inactivo. El hallazgo de actividad anticomplementaria en el antiveneno elaborado en Costa Rica coincide con las observaciones efectuadas por Sutherland (17) y Malasit *et al.* (10), quienes demostraron un efecto *in vitro* de los sueros antiofídicos producidos

en otros países sobre la actividad del complemento. Algunos investigadores han sugerido que este fenómeno podría ser una causa potencial de reacciones adversas tempranas, de tipo no anafiláctico (14, 17). Sin embargo, este punto ha sido difícil de demostrar en estudios clínicos. Existen dificultades importantes para realizar estudios clínicos controlados sobre los efectos adversos de los sueros antiofídicos, y en particular para evaluar la posible participación del complemento en los mismos. Por una parte, el paciente que recibe el suero antiofídico ha sido inoculado con alguna cantidad de veneno, y es sabido que una gran variedad de venenos pueden activar directamente el sistema de complemento (2). Por otra parte, los anticuerpos del suero antiofídico van a formar complejos inmunes con las toxinas del veneno, los cuales podrían activar el complemento (12), de tal modo que la interpretación de las alteraciones del complemento en la seroterapia antiofídica es compleja. Una situación especial se da en el caso de la seroterapia con preparaciones de inmunoglobulinas homólogas (por ejemplo, en pacientes con agamaglobulinemia o hipogamaglobulinemia), ya que, a diferencia de los envenenamientos, no se tiene la formación de complejos antígeno-anticuerpo, ni la acción de componentes tóxicos. Day *et al.* (5) demostraron que la administración intravenosa de inmunoglobulinas humanas, en un grupo de pacientes con síndromes de inmunodeficiencia humoral, causó activación y consumo de complemento. Sin embargo, debe destacarse que esto no siempre correlacionó con la aparición de reacciones adversas en los pacientes.

En el presente estudio, investigamos el efecto anticomplementario *in vivo* del suero antiofídico en conejos, para determinar si el fenómeno observado *in vitro* puede tener relevancia o no. Los resultados indicaron que, por lo menos en esta especie, ocurre una clara disminución en la actividad global del complemento, minutos

después de la administración intravenosa de suero antiofídico. Aunque no podemos extrapolar con certeza estos resultados al humano, ellos sugieren que el efecto anticomplementario observado en las condiciones artificiales de la preincubación de suero humano y suero antiofídico *in vitro*, podría darse también en pacientes. Al respecto cabe citar las observaciones realizadas en Costa Rica por De Franco *et al.* (6), quienes hallaron una frecuencia de 21,8% de reacciones tempranas anafilactoides al suero antiofídico estudiado en el presente trabajo, al analizar ciento sesenta casos de envenenamiento ofídico en la región del Pacífico Sur. Solamente en un caso se presentó choque anafiláctico. Dichos autores describen también que las reacciones anafilactoides ocurrieron dentro de los primeros diez a quince minutos de la infusión del suero, el cual se administró diluido en solución salina fisiológica (6).

¿Puede afirmarse que la activación de complemento inducida por sueros antitóxicos u otras preparaciones de inmunoglobulinas cause reacciones adversas tempranas? Aunque diversos investigadores señalan que esto no ha sido claramente demostrado aún (5, 10), existe una tendencia general a producir preparaciones seroterapéuticas cada vez más refinadas, y a buscar métodos para disminuir la actividad anticomplementaria en las mismas (16, 18).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos las valiosas sugerencias del Dr. José María Gutiérrez durante el desarrollo de esta investigación, así como en la revisión del manuscrito. Los doctores Gustavo Rojas y Marco Luis Herrera aportaron también valiosas críticas y comentarios. Asimismo agradecemos al Sr. Javier Núñez por su excelente apoyo asistencial. Este estudio constituyó el trabajo de graduación de las doctoras M. Trejos y J. Montero en la carrera de Microbiología y Química Clínica. B. Lomonte fue miembro del programa financiero de apoyo a investigadores del Consejo Nacional de

Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) durante esta investigación.

ABSTRACT

The anticomplementary activity of polyvalent antivenom produced in Costa Rica was investigated on human (in vitro) and rabbit (in vitro and in vivo) serum complement. A significant effect was observed in both species in vitro, using either liquid or lyophilized antivenom. In order to explore the in vivo relevance of these findings, an experimental model in rabbits was utilized. Antivenom (2 ml/Kg body weight) was injected intravenously, and CH50 was measured before and 15, 60, and 120 minutes after injection. A significant decrease of complement activity occurred at 15 minutes and later periods. On the other hand, the effect of antivenom on human serum C3 concentration in vitro was not significant, when using radial immunodiffusion for quantitation. Anticomplementary activity of antivenom could explain, at least partially, the occurrence of early adverse reactions in some patients after treatment of snakebite envenomation.

BIBLIOGRAFIA

1. Anónimo. Antivenom therapy and reactions [editorial]. *Lancet* 1980; i:1 909-1910.
2. Birdsey, V., Lindorfer, J. y Gewurz, H. Interaction of toxic venoms with complement system. *Immunology* 1971; 21: 229-310.
3. Bolaños, A. y Cerdas, L. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol. Of. Sanif. Panam.* 1980; 88: 189-196.
4. Corrigan, P., Russell, F. E. y Wainschel, J. Clinical reactions to antivenin. *Toxicon* 1978; 16 (Suppl. 1): 457-465.
5. Day, N. K., Good, R. A. y Wahn, V. Adverse reactions in selected patients following intravenous infusions of gamma globulin. *Am. J. Med.* 1984; 76:25-32.

6. De Franco, D., Alvarez, I. y Mora, L. A. Terapia de la mordedura de ofidios venenosos en niños en la región Pacífico Sur. Análisis en ciento sesenta casos. *Acta Méd. Cost.* 1983; 26: 76-80.
7. Gewurz, H. y Suyehira, L. A. Complement. *Manual of Clinical Immunology*. Rose, N. R. y Friedman, H., Eds. American Society for Microbiology, Washington, 1976; 36-47.
8. Kojis, F. G. Serum sickness and anaphylaxis. *Am. J. Dis. Child.* 1942; 64: 93-143 y 313-348.
9. Lomonte, B., Robles, A., Mata, E. y Cerdas, L. Cálculo de la actividad hemolítica del complemento sérico mediante un programa en "BASIC": comparación con el método gráfico manual. *Rev. Méd. Hosp. Niños Costa Rica* 1986; 21: 179-186.
10. Malasit, P., Warrel, D. A., Chanthavanich, P., Viravan, Ch., Mongkolsapaya, J. y Singthong, B. Prediction, prevention, and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. *Br. Med. J.* 1978; 7:25-33.
11. Mata, E. y Lomonte, B. Determinación cuantitativa de la actividad lítica del complemento sérico (CH50) en adultos costarricenses. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1986; 7: 41-47.
12. Nielsen, H., Sørensen, H., Faber, V. y Svehag, E. Circulating immune complexes, complement activation kinetics and serum sickness following treatment with heterologous anti-snake venom globulin. *Scand J. Immunol.* 1978; 7:25-33.
13. Organización Mundial de la Salud. Uso y abuso de ocho procedimientos de diagnóstico muy difundidos en inmunología clínica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 1983; 94: 83-102.
14. Reid, H. A. Antivenom reactions and efficacy. *Lancet* 1980; i: 1024-1025.
15. Rosenblatt, H. M. y Lawlor, G. J. Anaphylaxis. En: *Manual of Allergy and Immunology, Diagnosis and Therapy* (Lawlor, G. J. y Fischer, T. J., Eds.). 1981. p. 215. Little, Brown and Co., Boston.
16. Stephan, W. Undegraded human immunoglobulin for intravenous use. *Vox. Sang.* 1975; 28:422-437.
17. Sutherland, S. K. Serum reactions: An analysis of commercial antivenoms and the possible role of anticomplementary activity in de-novo reactions to antivenoms and antitoxins. *Med. J. Aust.* 1977; 1: 613-615.
18. World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO Offset Publication No. 58. 1981.

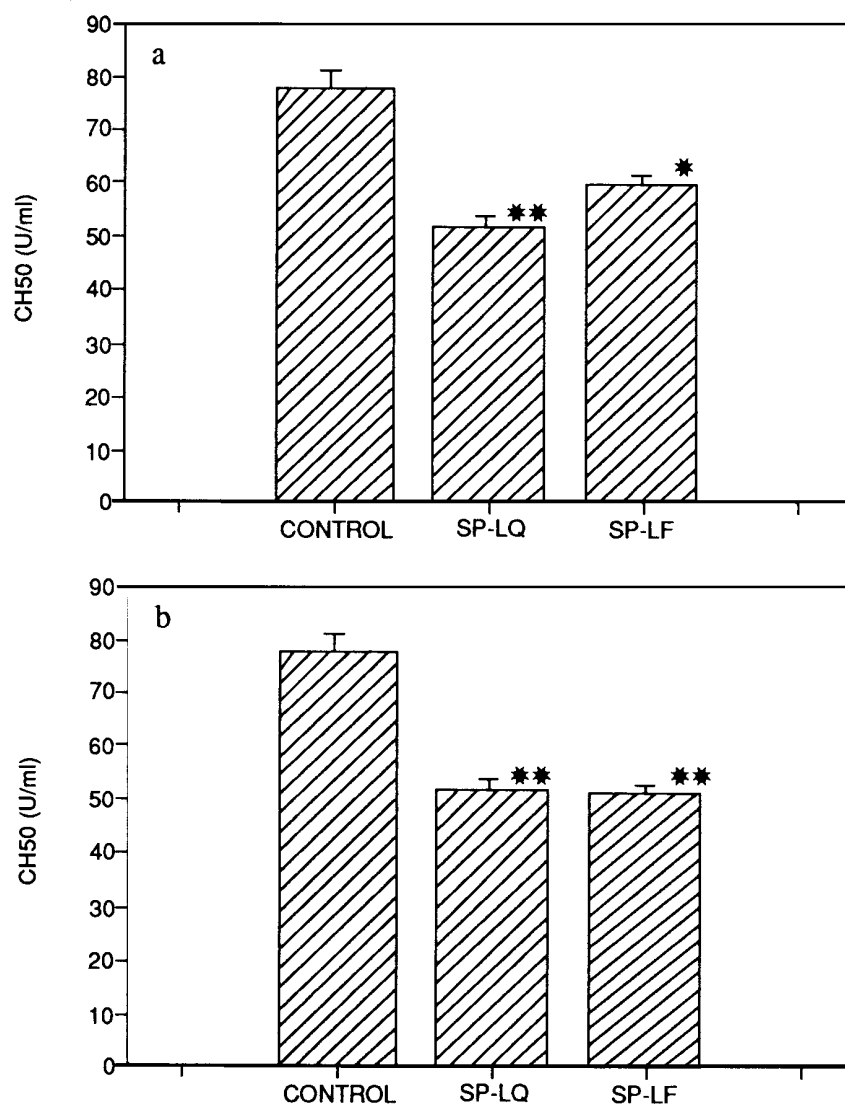


Figura 1: Efecto del suero antiofídico polivalente sobre la actividad hemolítica del complemento humano *in vitro*. Ay B representan dos muestras de suero humano. La actividad CH50 se determinó luego de mezclar estas con suero antiofídico líquido (SP-LQ), liofilizado (SP-LF), o con amortiguador (control). Cada barra representa el promedio de dos determinaciones \pm 1 desviación estándar. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

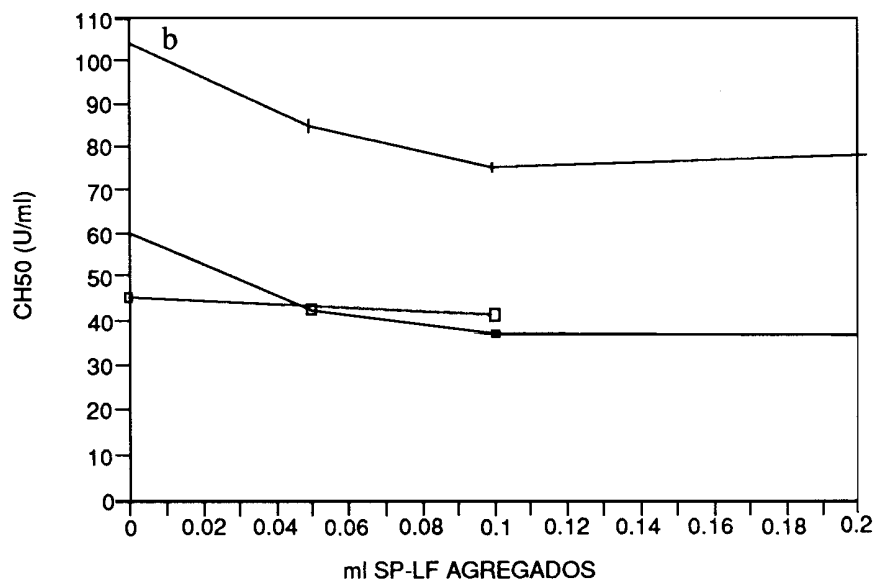
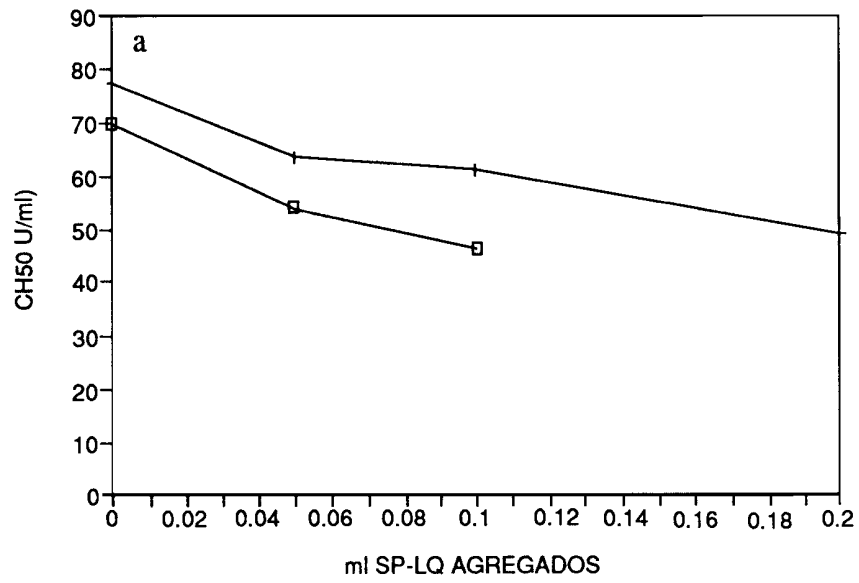


Figura 2: Relación dosis-respuesta en el efecto del suero antiofídico polivalente sobre la actividad hemolítica del suero humano *in vitro*. La actividad CH50 se determinó luego de mezclar las muestras con cantidades variables de suero antiofídico líquido (SP-LQ) o liofilizado (SP-LF). Cada línea representa una muestra y cada punto es el promedio de dos determinaciones. Todas las diferencias respecto al control son significativas o altamente significativas. Las desviaciones estándar son menores de 2 U/ml en todos los puntos.

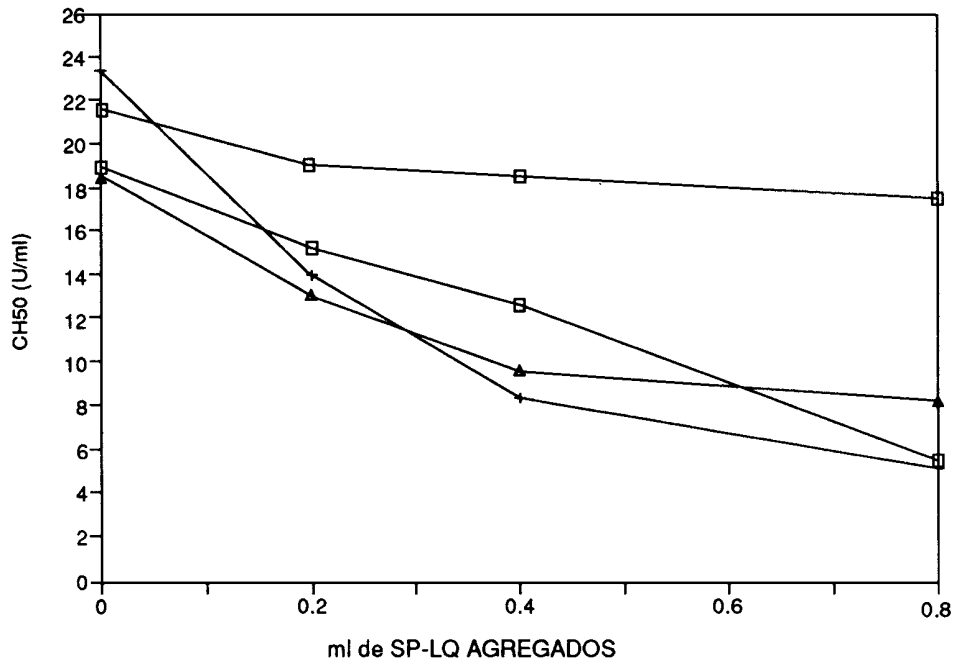


Figura 3: *Relación dosis-respuesta en el efecto del suero antiofídico polivalente sobre la actividad hemolítica del suero de conejo in vitro.* La actividad CH50 se determinó luego de mezclar las muestras de suero de conejo con cantidades variables de suero antiofídico líquido (SP-LQ). Cada línea representa una muestra y cada punto es el promedio de dos determinaciones. Todas las diferencias respecto al control son significativas o altamente significativas. Las desviaciones estándar son menores de 0,8 U/ml en todos los puntos.

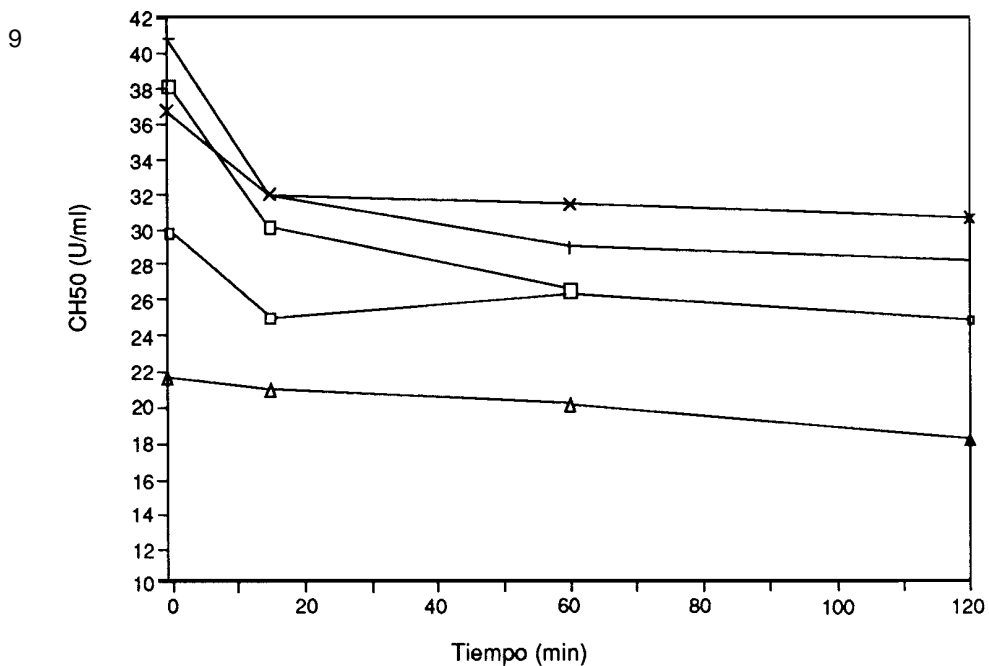


Figura 4: Efecto del suero antiofídico polivalente sobre la actividad hemolítica del complemento de conejo *in vivo*. Los conejos recibieron una dosis de 2 ml/kg de antiveneno por vía intravenosa. Su actividad CH50 se determinó antes de la administración (tiempo 0) y posteriormente a distintos intervalos. Cada línea representa un animal y cada punto es el promedio de dos determinaciones. Todas las diferencias respecto al valor inicial son significativas o altamente significativas. Las desviaciones estándar son menores de 1,0 U/ml en todos los puntos.