

Valores hematológicos y de enzimas séricas en caballos inoculados con venenos de serpientes para la producción de antivenenos en Costa Rica

Ricardo Estrada, Fernando Chaves, Abel Robles, Ermila Rojas, Eduardo Segura y José María Gutiérrez

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

(Rec. 18-IV-1991. Acep. 4-X-1991)

Abstract: Blood components were studied in six horses immunized with snake venoms for the production of polyvalent antivenom in Costa Rica. No significant changes in hemoglobin or hematocrit throughout the immunization period were observed, whereas a significant increment in total serum proteins occurred in the second half of the immunization process, probably due to an increased synthesis of immunoglobulins. There were no significant changes in creatine kinase, but a slight increment was detected in both transaminases, although they did not exceed normal limits. These findings suggest the absence of relevant tissue damage in skeletal muscle, cardiac muscle and liver. In agreement with these results, horses did not develop signs of systemic poisoning, presenting only minor alterations at the site of venom injection, such as oedema, abscesses and fistules. The development of anti-phospholipase A2 antibody response showed a prominent individual variability, as previously described.

Key words: horse-venom-snake-immunization-enzymes-haematology.

La producción de antivenenos se basa en la inmunización de equinos, entre otros animales, con venenos (Latifi 1978). Dependiendo del tipo de veneno y del esquema de inoculaciones empleado, este proceso de inmunización puede causar alteraciones fisiopatológicas en los caballos, las cuales han sido poco estudiadas.

En el caso del antiveneno polivalente producido en Costa Rica, los caballos son inoculados con una mezcla de venenos de las especies *Bothrops asper*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus durissus* (Bolaños y Cerdas 1980). Estos venenos contienen toxinas capaces de producir lesiones tisulares locales y sistémicas, así como alteraciones hematológicas (Gutiérrez 1980, Gutiérrez *et al.* 1982, 1984, Chaves *et al.* 1989).

En el presente trabajo se investigó un grupo de caballos inmunizados por primera vez y se evaluaron los cambios en hematocrito, hemoglobina, proteínas séricas totales, así como en los niveles séricos de las enzimas creatina kinasa (CK), transaminasa glutámico-oxalacética (TGO) y transaminasa glutámico-pirúvica

(TGP). Simultáneamente se estudiaron los cambios clínicos y la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂ como un índice del desarrollo de la respuesta inmunológica en estos caballos.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron seis equinos adultos (3 a 9 años), clínicamente sanos, machos y hembras, raza criolla, entre 400 y 500 Kg. y que nunca habían sido inoculados con veneno. Antes de la inmunización, se les sometió a un período de tres meses de adaptación a la finca, alimentándolos con pasto de corta (*Pennisetum purpureum*), pasto Estrella (*Cynodon nlenfluencis*), heno de Pangola (*Digitaria decumbens*) y una mezcla de alimento balanceado en polvo. En este tiempo se integraron a un programa de control de enfermedades infectotransmisibles y de ecto- y endoparásitos.

El esquema de inmunización comprende dosis crecientes de la mezcla de venenos, administrándose cada diez días (Cuadro 1).

CUADRO 1

Esquema de inmunización utilizado para la producción del suero antiofidico polivalente

Días	Miligramos de veneno*	Coadyuvante
1	0.5	Freund Completo
15	1.0	Alginato de sodio
25	1.5	Alginato de sodio
35	3.0	Alginato de sodio
45	5.0	Alginato de sodio
55	10.0	Alginato de sodio
65	15.0	Alginato de sodio
75	30.0	Freund Incompleto
90	30.0	Alginato de sodio
100	50.0 **	Alginato de sodio

* Mezcla de partes iguales de los venenos de *B. asper*, *C. durissus durissus* y *L. muta*.

** Si no se ha logrado el título adecuado se repite esta dosis hasta alcanzarlo.

Para establecer el valor basal para cada animal, se tomaron muestras de sangre con anticoagulante (Citrato de Sodio) y sin anticoagulante (para obtener el suero) quince días antes de iniciar las inoculaciones con veneno, con intervalos de una semana. Para la determinación de los valores enzimáticos se tomaron las muestras de sangre sin anticoagulante 24 horas después de los inóculos, se separó el suero y se determinaron todos los valores enzimáticos en las siguientes 24 horas, manteniendo el suero en refrigeración a 4 °C. La determinación de enzimas séricas se realizó con el uso de reactivos Sigma (Sigma Chemical Co., Missouri, USA): CK (Kit 520; una unidad es producto de la fosforilación de un nanomol de creatina por minuto a 25 °C), TGP (Kit 59 UV; una unidad es producto de la formación de un micromol de NAD por minuto) y TGO (Kit 58 UV; una unidad es producto de la formación de un micromol de NAD por minuto).

La concentración de proteínas séricas totales se determinó por el método modificado de Biuret, usando como patrón albúmina sérica bovina (Schosinsky *et al.* 1983). El hematocrito se determinó usando capilares heparinizados (Sáenz *et al.* 1981) y la medición de la hemoglobina se realizó por el método de cianometahemoglobina (Sáenz *et al.* 1981). Los valores estadísticos se refieren a la *t* de Student.

Para determinar el efecto neutralizante del suero, se sangraron los caballos de la vena yugular, inmediatamente antes de cada inoculación y

se separó el suero. Se estudió la neutralización del efecto hemolítico indirecto del veneno de *B. asper*, mediante la técnica de hemólisis radial en geles de agarosa (Gutiérrez *et al.* 1988). La Dosis Efectiva 50% se definió como la razón μl de suero/mg de veneno en que la actividad hemolítica se redujo en un 50%. Para mayor claridad gráfica, la capacidad neutralizante se expresa como $1/DE_{50} \times 10^5$.

RESULTADOS

Cambios en los niveles de enzimas séricas: En relación a la TGP se observó un pequeño pero significativo ($p < 0,05$) aumento después de la dosis de 1,5 mg. de veneno (Fig. 1), manteniéndose valores constantes hasta la segunda dosis de refuerzo de 50 mg. Solamente en la última dosis se dio un valor superior al ámbito normal (Fraser 1988, Blood *et al.* 1979, Howard y Matsumoto 1982).

Se observó un aumento significativo de TGO ($p < 0,05$) con respecto al valor basal, entre los días 14-98, así como el día 202 de la inmunización (Fig. 1), en tanto que los inóculos del intervalo comprendido entre los días 105-191 no produjeron elevaciones significativamente diferentes (Fig.1). Sin embargo, a pesar de que se observaron diferencias significativas (entre los días 14-98 y el día 202), ningún valor obtenido está fuera del ámbito normal (Fraser 1988, Blood *et al.* 1979, Howard y Matsumoto 1982).

Ningún valor de CK sufrió un aumento significativo con respecto al valor basal (Fig. 1). Además, en ningún punto fue superado el índice superior normal (Fraser 1988, Blood *et al.* 1979).

Cambios en los valores hematológicos: Los valores de hematocrito (29-36%) presentaron niveles inferiores a los ámbitos normales (Blood *et al.* 1979, Kolb 1979, Howard y Matsumoto 1982). Estos bajos valores se observaron incluso antes de iniciarse el esquema de inoculaciones. No hubo cambios significativos en el hematocrito durante la inmunización.

Los niveles de hemoglobina no mostraron fluctuaciones significativas; sus valores siempre estuvieron dentro de ámbitos normales (Kolb 1979, Howard y Matsumoto 1982, Blood *et al.* 1979).

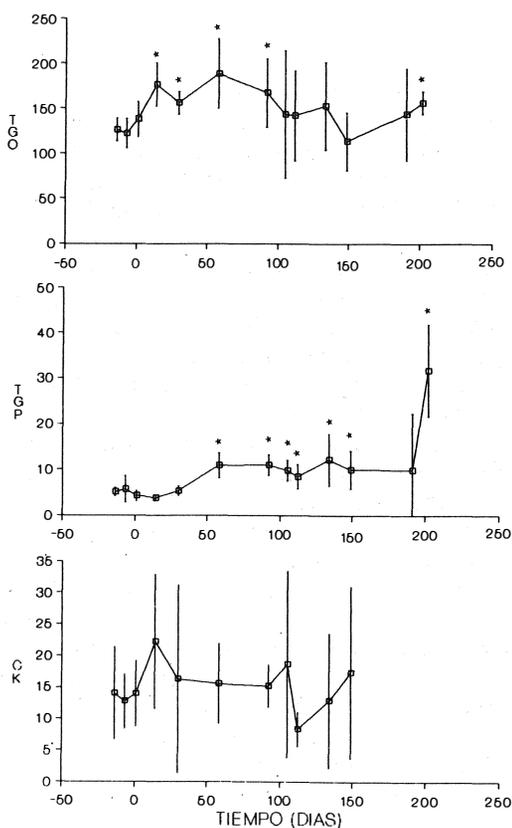


Fig. 1. Cambios en los niveles séricos de TGP, TGO y CK de 6 caballos durante el esquema de inmunización para la producción del suero antiofidico polivalente. La actividad enzimática de TGP y TGO se expresa en Unidades/litro, en tanto la actividad enzimática de CK se expresa en U/ml. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar. Solamente los valores con asterisco (*) fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los valores basales de los caballos antes de iniciar la inmunización.

Los valores de proteínas totales se mantuvieron dentro de lo normal, aunque observamos un índice superior levemente mayor (6.93-9.37 g/dl). No existió diferencia significativa en los valores observados entre los días 1-58, en tanto que en el intervalo comprendido entre los días 58-200 hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) con respecto a los valores basales.

Desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂: Se observó una gran variabilidad individual en el desarrollo del título de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂. Todos los caballos lograron su mayor título alrededor del

día 191 (ese día los valores de la expresión $1/DE_{50} \times 10^5$ fueron: 84, 100, 61, 300, 114 y 38; promedio : 116; DS : 94).

Alteraciones clínicas: Las lesiones locales aparecieron con marcadas diferencias individuales en tiempo y gravedad; en general, el edema se observó en cinco caballos el día 14 del esquema de inmunización; el sexto caballo desarrolló un edema hasta el día 112. Todos presentaron abscesos y/o fistulas entre los días 105-202 del esquema de inmunización. En ningún caso se observaron alteraciones sistémicas como sangrados menores o síndromes hemorrágicos, deshidratación, hipotensión o choque.

DISCUSION

La toma de muestras de sangre para el estudio de las alteraciones de las enzimas séricas se realizó 24 horas después de los inóculos, considerando que los venenos inoculados van disueltos en adyuvantes que permiten una liberación lenta del antígeno. Por otra parte, hemos observado que en algunos caballos que han presentado signos posteriores a la inoculación, éstos han aparecido entre 12-36 horas después de la inyección de la mezcla antigénica.

La determinación de enzimas séricas como TGP ayuda a diagnosticar lesión hepática, pues esta enzima está presente en el hígado en cantidades mucho mayores (Kolb 1979). De acuerdo a lo observado en este trabajo, no ocurre lesión en tejido hepático durante esta primera fase de inmunización, aunque no se descarta la posibilidad de que ésta ocurra en un plazo mayor que el de este estudio, como efecto de inoculaciones crónicas de veneno.

La TGO es un indicador del daño en tejido muscular, aunque un aumento en ésta puede indicar tanto un daño muscular como hepático, por lo que su especificidad y confiabilidad es mucho menor que para la CK (Kolb 1979). El hecho de que la TGO no superara los valores normales sugiere la ausencia de lesión tisular en hígado, miocardio y músculo esquelético.

La actividad de la CK es la técnica de laboratorio más comúnmente usada en el diagnóstico de distrofias musculares y de infarto de miocardio, ya que es altamente específica para

detectar daño de músculo esquelético y cardíaco (Blood *et al.* 1979). Debido a las observaciones anteriores sobre las enzimas CK y TGO, y considerando estos resultados, se concluye que el daño muscular y cardíaco inducido por estas dosis de veneno inoculado es muy leve o inexistente.

Los cambios detectados en hematocrito y hemoglobina fueron realmente muy leves, y aunque el hematocrito se detectó en niveles menores a los ámbitos normales, pueden considerarse aceptables para el caballo criollo que usamos y para equinos productores de antivenenos. Además, estos niveles bajos estaban ya presentes en los caballos previamente a la inoculación del veneno.

La aparición de valores de proteínas totales mayores a los informados por varios autores (Blood *et al.* 1979, Kolb 1979, Howard y Matsumoto 1982), se podría explicar por el aumento de la síntesis de inmunoglobulinas, sobre todo después del día 58, cuando empezó a aumentar el nivel de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂. Hallazgos similares fueron descritos por Estrada *et al.* (1991), en donde se describió un aumento en las proteínas totales y una inversión en la relación albúmina:globulina en el curso de la inmunización.

El tipo y tiempo de aparición de las lesiones locales son generalmente similares a los observados en otras experiencias realizadas en este instituto (Estrada *et al.* 1989) y son congruentes con la descripción de los efectos locales inducidos probablemente por varias toxinas de los venenos que producen edema, hemorragia y necrosis del tejido adyacente al sitio de inoculación (Gutiérrez *et al.* 1982, 1984).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Bernardo Angulo, Alfredo Vargas y Rodrigo Sánchez (Instituto C. Picado) su colaboración. Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (741-89-057) y la International Foundation for Science (F/0883-3). F. Chaves y J.M. Gutiérrez son miembros del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

RESUMEN

Se estudiaron algunos componentes sanguíneos en un grupo de seis caballos inmunizados por primera vez con venenos de serpientes para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. No hubo cambios significativos en los valores de hematocrito y hemoglobina, aunque las proteínas totales sufrieron un pequeño pero significativo aumento en la segunda mitad del esquema de inmunización, probablemente relacionado con un aumento en la producción de globulinas. No hubo cambios significativos en los niveles de CK, mientras que las enzimas TGO y TGP aumentaron levemente, sin sobrepasar el límite superior normal. Estos resultados sugieren la ausencia de lesiones tisulares importantes en músculo esquelético, músculo cardíaco e hígado.

Los caballos presentan únicamente alteraciones locales en el sitio de inoculación del veneno, caracterizadas por edema, abscesos y fístulas. No se observó ningún tipo de alteración sistémica. Se observó una gran variabilidad individual en el desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂.

REFERENCIAS

- Arroyo, O., R. Bolaños & G. Muñoz. 1980. The bacterial flora of venoms and mouth cavities of Costa Rican snakes. *Bull. Pan. Health Org.* 14: 280-285.
- Blood, D.C., J.A. Henderson & O.M. Radostits. 1979. *Veterinary Medicine*. 5th. edition. Lea & Febiger. U.S.A. p. 205, 227, 329, 896-897.
- Bolaños, R. & L. Cerdas. 1980. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol. Ofic. Panam.* 88: 189-196.
- Chaves, F., J.M. Gutiérrez, B. Lomonte & L. Cerdas. 1989. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopele) venom in mice. *Toxicon* 27: 1085-1093.
- Estrada, R., J.M. Gutiérrez, J. Alvarado, A. Robles, C. Avila & N. González. 1989. Desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂ en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 37: 187-191.
- Estrada, R., A. Robles, J. Alvarado, E. Rojas, N. González, E. Segura & J.M. Gutiérrez. 1991. Development of antibody response and clinical and

- hematological alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenoms in Costa Rica. *Memorias del Instituto Butantán* (en prensa).
- Fraser, C.M. 1988. *El Manual Merck de Veterinaria*. Merck Madrid, España. p. 21, 1047-1049.
- Gutiérrez, J.M. 1980. Venenos de serpientes de América: Sus efectos en el organismo. *Ciencias Veterinarias* (Costa Rica) 2: 277-289.
- Gutiérrez, J.M., L. Cerdas, O. Arroyo, E. Rojas, B. Lomonte & J.A. Gené. 1982. Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente "terciopelo" (*Bothrops asper*). *Acta Médica Costarricense* 25: 255-262.
- Gutiérrez, J.M., C.L. Ownby & G.V. Odell. 1984. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Experim. Molec. Pathol.* 40: 367-379.
- Gutiérrez, J.M., C. Avila, E. Rojas & L. Cerdas. 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26: 411-413.
- Howard, E.B. & G. Matsumoto. 1982. Laboratory Procedures, p. 227-296. *In* E.J. Catcott (ed.). *Animal Health Technology*, Am. Vet. Publications, California, U.S.A.
- Kolb, E. 1979. *Fisiología Veterinaria*. Vol.1. Acribia, Zaragoza, España. p. 435-439, 454-460.
- Latifi, M. 1978. Commercial production of anti-snake bite serum (antivenin), p. 561-588. *In* C. Gans (ed.). *Biology of the Reptilia*, vol. 8. Academic Press, Londres.
- Sáenz, G., M. Alvarado, F. Atmetlla, R. Jiménez, G. Arroyo, E. Valenciano & K. Schosinsky. 1981. *Hematología Teórico-Práctica*. Editorial Universidad de Costa Rica, San José. 491 p.
- Schosinsky, K., M. Vargas, E. Vinocour, O.M. González, E. Brilla & A. Gutiérrez. 1983. *Química Clínica: Manual de Técnicas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica, San José. 224 p.