

COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ANTIVENENO CROTÁLICO

Fusco Luciano^{ab}, Acosta Ofelia^b, Leiva Laura^a

^aLabInPro. Facultad de Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura –Corrientes 3400. Argentina

^bCátedra de Farmacología, Facultad de Cs. Veterinarias, Corrientes.CP3400. Argentina

Correspondencia al autor: Luciano S. Fusco, Teléfono: +54-379-4457996. Int: 112. Fax: +54-379-4473930 Email: fuscoluciano@hotmail.com

Resumen

El veneno de *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.; cascabel) es una secreción neurotóxica que induce la muerte si la seroterapia no se aplica a tiempo. Esta consiste en la administración de antiveneno generado en equinos por inmunizaciones sucesivas de cantidades crecientes de veneno. En el presente trabajo se evaluó la eficacia de dos planes de inmunización en conejos con veneno de cascabel para la producción de antisuero, uno de ellos con bajas dosis de inoculación (Plan A) y otro con dosis iniciales 5 veces más altas (Plan B). Se inocularon conejos blancos de raza Nueva Zelanda de 3 kgs de peso, vía intramuscular y sub cutáneas en dosis según protocolos (Plan A: 0,1 – 0,2 – 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4,5 y 7 mg; Plan B: 0,5 – 1 – 2 – 4 y 8 mg.) y los títulos de anticuerpos anti-C.d.t. se determinaron por ELISA en plasma de sangre obtenida de vena caudal de la oreja. Como control de la calidad neutralizante del antiveneno producido se utilizaron ratones machos de 20 g. de peso en ensayo de letalidad. El plan B produjo un rápido aumento en el título de anticuerpos (2×10^7) a los 45 días, por el contrario, el plan A mostró una elevación progresiva, obteniéndose título similar recién a los 165 días, con equivalente capacidad neutralizante de la letalidad del veneno. No habiendo cambios orgánicos relevantes que comprometan la salud del animal, y considerando costos de manutención y de reactivos en la preparación de cada inóculo, resulta apropiada la aplicación de protocolos cortos basados en dosis que, aunque altas, induzcan a una rápida respuesta inmune.

Palabras claves: cascabel, seroterapia, anticuerpos, ELISA

Introducción

Los accidentes ofídicos constituyen un problema de salud pública en América central y del Sur por su impacto en la mortalidad y morbilidad [1]. La administración del antiveneno es fundamental para lograr la sobrevivencia del paciente intoxicado [2-4]. El tratamiento ante una mordedura de serpiente consiste en la administración de anticuerpos heterólogos obtenidos de animales inmunizados, generalmente caballos, que alcanzan altos títulos. Los anticuerpos o sus fracciones, son posteriormente purificados [5, 6].

A pesar de la importancia médica, pocos fueron los avances en la mejora para la prevención y el tratamiento de esta intoxicación [7]. Actualmente, el enfoque en la mejora del rendimiento de producción de suero antiofídico está centrado en optimizar el procesamiento del antisuero aplicando distintos métodos, precipitación salina, acción enzimática o calor y así obtener inmunoglobulinas puras con alto poder neutralizante o sus fragmentos $F(ab')_2$ [8, 9]. Siendo muy escasa la bibliografía que aborda la optimización de los protocolos de inoculación, se ve la necesidad de proponer variantes que mejoren los procesos de producción de antivenenos, acortando tiempos y reduciendo costos.

En el presente trabajo se evaluó un protocolo de inmunización alternativo para la preparación de suero anticrotálico, basado en dosis sensiblemente mayores a las convencionalmente empleadas, a fin de alcanzar una mayor eficiencia en los procesos de producción a gran escala.

Materiales y Métodos

Veneno: Se trabajo con mezclas de venenos desecados, homogeneizados y conservados a -20°C , de *Crotalus durissus terrificus*(C.d.t.) que fue obtenido del Serpentario de la ciudad de Corrientes.

Animales: Ratonés Swiss de 20-22g de peso, machos y blancos fueron suministrados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE. Los ratones fueron alojados a 25°C con ciclos 12 horas de luz / oscuridad y tuvieron acceso libre a comida y agua. Conejos machos, blancos, New Zealand con peso de 3.5 kg fueron alojados individualmente con libre acceso a los alimentos y el agua.

Protocolo de inmunización: Los conejos se inmunizaron mediante el protocolo que se muestra en la Tabla 1.

Etapas	Día	Veneno entero (mg) Altas Dosis (Plan B)	Venenoentero (mg) BajasDosis (Plan A)	Adyuvante	Vía de inoculación
Etap 1	1	0.5	0.1	FCA*	s.c. e i.m. (m.p.d.)***
	15	1.0	0.2	FIA**	s.c. e i.m. (m.p.i.)
	30	2.0	0.5	FIA	s.c. e i.m. (m.p.d.)
	45	4.0	1.0	FIA	s.c. e i.m. (m.p.i.)
	60	8.0	2.0	FIA	s.c. e i.m. (m.p.d.)
Período de descanso (30 días)					
Etap 2	105	8.0	2.0	FIA	s.c. e i.m. (m.p.d.)
	120	12	3.0	FIA	s.c. e i.m. (m.p.i.)
	135	18	4.5	FIA	s.c. e i.m. (m.p.d.)
	150	27	7.0	FIA	s.c. e i.m. (m.p.i.)
	175	Sangrado Final			

Tabla 1. Protocolo de Inmunización de conejos con altas y bajas dosis de veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) * AdyuvanteCompleto de Freund. ** AdyuvanteIncompleto de Freund. ***Subcutánea e intramuscular. Miembro posterior derecho-izquierdo.

Anti-veneno: El nivel de anticuerpos en el suero fue monitoreado por inmunodifusión en gel [10] y ELISA [11]. Las muestras de sangre fueron colectadas de la vena marginal de la oreja y almacenada a 4°C . El suero fue separado por centrifugación y las alícuotas almacenadas a -70°C .

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA): Placas de microtitulación (96 pocillos) se sensibilizaron durante la noche a 4°C con $100\mu\text{l}$ de Veneno de C.d.t ($3\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en tampón fosfato salino (PBS). Las placas se lavaron tres veces con PBS y los sitios no unidos fueron bloqueados por 1 hora a temperatura ambiente con 2% de caseína bovina en PBS. Las placas se lavaron tres veces con PBS y utilizada inmediatamente para ELISA. Para medir los títulos de anticuerpos, $100\mu\text{l}$ de diluciones seriadas de suero se añadieron a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37°C . Las placas se lavaron con PBS que contenía 0,5% de Tween 20 (PBS / Tween) y se incubaron durante 1 h con $100\mu\text{l}$ de anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa producido en cabra (Sigma, 1:10.000 en PBS), seguido por lavado adicional. La solución de sustrato para el ensayo

de peroxidasa (H_2O_2/OPD) se añadió y la reacción enzimática permitió proceder durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo con $50\mu l$ de H_2SO_4 3N y la absorbancia se leyó a 492 nm con un lector de placas SpectraMax de 340 pocillos múltiples.

Neutralización de la Actividad Letal: La neutralización de la letalidad se llevó a cabo incubando diferentes mezclas de veneno y antiveneno a $37^\circ C$ por 30 min.

Luego 0.5 ml de las mezclas fueron inyectadas por vía i.p en los ratones que fueron observados por 48hs. Cada ratón recibió $8\mu g$ de veneno correspondiente a $4 \times DL_{50}$. La actividad Neutralizante fue expresada como DE_{50} definida como la cantidad de anti-veneno (en mg de proteínas) necesarias para reducir al 50% la potencia letal del veneno.

Control clínico del animal productor: los conejos fueron evaluados periódicamente a través de controles hematológicos, renales, estudios radiológicos, ecográficos y análisis clínicos a fin de constatar su estado de salud.

Resultados y Discusión

Los anticuerpos producidos contra los componentes del veneno de *Crotalus durissus terrificus* mostraron altos títulos al finalizar ambos planes de inoculación. Estos anticuerpos, detectados y cuantificados por diferentes ensayos, un método inmuno enzimático y la neutralización de la DL_{50} , mostraron ser capaces de reconocer epitopes presentes en el veneno crotálico, que les dieron origen y de esta forma neutralizar su acción.

La Figura 1 muestra los títulos de anticuerpos presentes en los conejos inmunizados con el veneno crotálico crudo. El plan B produjo un rápido aumento en el título de anticuerpos (2×10^7) a los 45 días, por el contrario, el plan A mostró una elevación progresiva, obteniéndose un título similar recién a los 165 días.

Los conejos fueron sangrados en los periodos de descanso y además del test de ELISA se realizó como control de la calidad neutralizante ensayos *in vivo* de neutralización de la acción del veneno de cascabel. Para ello se utilizaron ratones machos de 20-22g. de peso y las muestras de suero fueron tomadas en el primer periodo de descanso (75 días) y al finalizar el protocolo de inoculación. Se pudo demostrar que a los 75 días, los conejos inoculados con veneno C.d.t mediante el plan "B" (plan altas dosis) lograron una menor DE_{50} que utilizando el protocolo "A". Tabla 2

Tanto el Plan A como el B producen cantidades similares de anticuerpos al finalizar el plan de inmunización.

La examinación clínica y bioquímica de los conejos sometidos a planes de inmunización mostraron un estado saludable tanto en los animales inmunizados con bajas como con altas dosis.

Los resultados demuestran que no es necesario prolongar por tanto tiempo la inmunización. Aplicando altas dosis, tolerables por el animal, sin compromiso de su salud, es factible alcanzar títulos apropiados tan solo a los 45 días de desarrollo del protocolo.

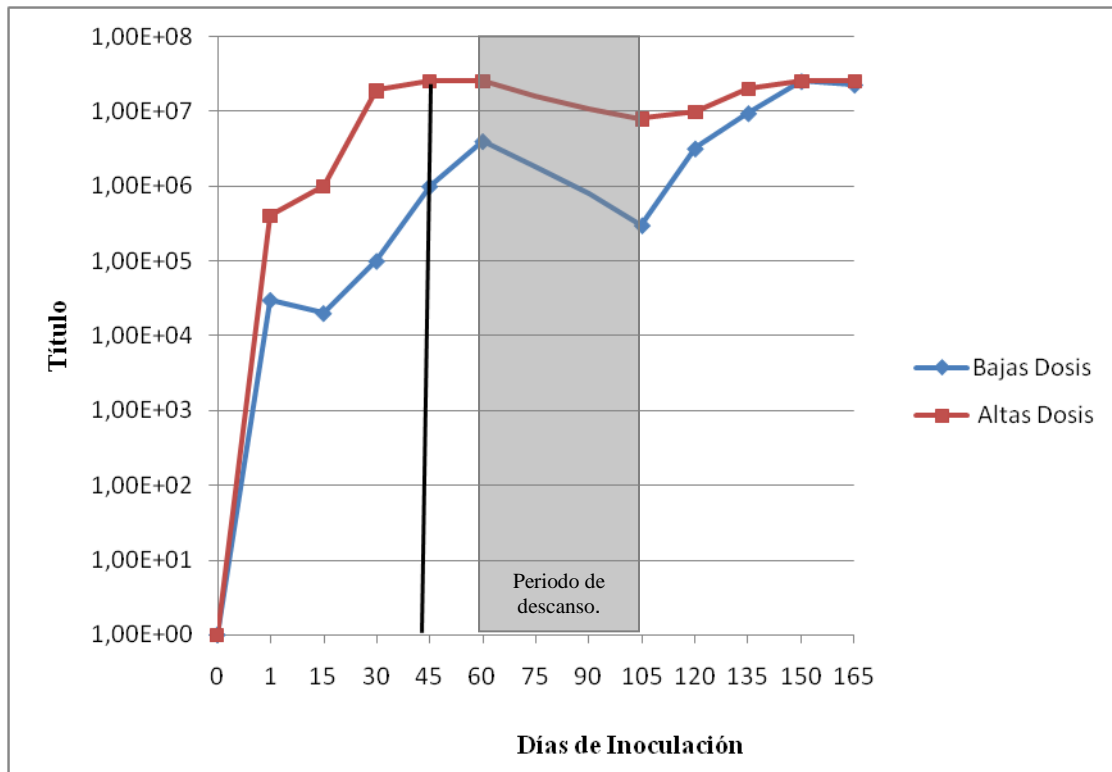


Figura 1: Variaciones del título anticuerpos neutralizantes contra veneno crotálico. El dosaje se realizó a los 7 días posteriores a cada inoculación. La línea marca instancia del protocolo en el cual el Plan B alcanza prematuramente el máximo título de anticuerpos.

	DE ₅₀ Día 75(mg)	DE ₅₀ Día 175(mg)
Plan "A"	4.32 ± 0.1	1.65 ± 0.3
Plan "B"	3.33 ± 0.2	1.62 ± 0.2

Tabla 2. Comparación de la Neutralización de la dosis letal con el suero del plan A y B en dos instancias diferentes: a los 75 y 175 días el plan de inmunización. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar, n = 4

Conclusiones

No habiendo cambios orgánicos relevantes que comprometan la salud del animal, y considerando costos de manutención y de reactivos en la preparación de cada inóculo, resulta apropiada la aplicación de protocolos cortos basados en dosis que, aunque altas, induzcan a una rápida respuesta inmune. Estos hallazgos constituyen un valioso aporte tecnológico al conocimiento sobre la producción de sueros antiofídicos en la región. Habiéndose demostrado en conejos, futuros trabajos permitirán valorar el grado de extrapolación a grandes animales productores como son los equinos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Secretaria General de Ciencia y Técnica – UNNE (SGCyT UNNE; PI B013/10). Luciano Fusco agradece la beca co-financiada otorgada por UNNE-CONICET.

Referencias:

1. GUTIÉRREZ, J. and J. MEIER, *Clinical toxicology of snakebite in Central America*. Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Florida CRC: Boca Ratón, 1995: p. 645-65.
2. BOLAÑOS, R., *Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos*. Revista Costarricense Ciencias Médicas, 1982. **3**: p. 165-184.
3. GUTIÉRREZ, J.M., et al., *EL SUERO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE PRODUCIDO EN COSTA RICA ESTABILIDAD Y CAPACIDAD NEUTRALIZANTE*. Revista Costarricense de Ciencias Médicas, 1988. **9**: p. 155-169.
4. MORAIS, V., *El suero antiofídico: antecedentes históricos, uso presente y perspectivas futuras*. Biomedicina, 2007. **3**(1): p. 47-53.
5. RICHARDSON, W.H., et al., *Crotalidae polyvalent immune Fab (Ovine) antivenom is effective in the neutralization of South American Viperidae venoms in a murine model*. Annals of emergency medicine, 2005. **45**(6): p. 595-602.
6. DE ROODT, A.R., et al., *Comparación entre dos métodos de producción para la elaboración de antivenenos ofídicos*. Acta toxicológica argentina, 2010. **18**(1): p. 10-20.
7. GUTIÉRREZ, J.M., R.D.G. Theakston, and D.A. Warrell, *Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership*. PLoS Medicine, 2006. **3**(6): p. e150.
8. CHERONI, A.P., *Producción de suero antiofídico en Uruguay*. Rev Med Uruguay 1994 **10**: p. 147-154.
9. GUTIÉRREZ, J.M., et al., *Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: Report of a workshop*. Toxicon, 2007. **49**(1): p. 30-35.
10. OUCHTERLONY, O., *Antigen-antibody reactions in gels*. Acta Path. Microbiol. Scand., 1949. **26**: p. 507-15.
11. THEAKSTON, R., D. Warrell, and E. Griffiths, *Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms*. Toxicon, 2003. **41**(5): p. 541-557.