

EL SUERO ANTIOFIDICO POLIVALENTE PRODUCIDO EN COSTA RICA

ESTABILIDAD Y CAPACIDAD NEUTRALIZANTE

José María Gutiérrez, Bruno Lomonte, Gustavo Rojas, José A. Gené, Fernando Chaves,
Ricardo Estrada, Jorge Alvarado, Ermila Rojas y Abel Robles

Keyword index: Antivenom, snake venoms, neutralization.

RESUMEN

En este trabajo se revisan y discuten una serie de aspectos relativos a la producción, estabilidad y capacidad neutralizante del suero antiofídico polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado. Este suero hiperinmune, en su forma líquida, es estable por 3 años en refrigeración, en tanto que la forma liofilizada es estable por 5 años, sin requerir refrigeración. Los diferentes lotes de suero son uniformes en lo que respecta a su capacidad neutralizante contra las actividades tóxicas de los venenos. La capacidad neutralizante de este suero ha sido investigada mediante dos tipos de experimentos: (a) Aquellos en los que el suero se incuba con el veneno previo a su inoculación en animales de experimentación; y (b) aquellos en los que el suero se administra por la vía intravenosa a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación del veneno. Los resultados obtenidos señalan que el suero es eficiente en la neutralización de los efectos tóxicos y enzimáticos inducidos por las serpientes costarricenses de la familia Viperidae, cuando suero

y veneno se incuban previo a su inoculación. Esta neutralización también se ha demostrado contra venenos de serpientes de otros países de Centro y Sudamérica. Por otra parte, cuando el suero se administra después de inoculado el veneno, los efectos locales (mionecrosis, hemorragia local y edema) son neutralizados sólo parcialmente, en tanto que los efectos letal y desfibrinante se neutralizan con mayor eficacia. Estas observaciones se explican por el hecho de que los efectos locales se desencadenan con una rapidez tal que, cuando se administra el suero, ya se ha iniciado el desarrollo de estas alteraciones locales. Se concluye que el suero polivalente contiene anticuerpos eficaces en la neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de estos venenos; sin embargo, la neutralización de los efectos locales, en la práctica, se hace difícil, siendo necesaria una rápida administración de un volumen suficiente de suero antiofídico. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1988; 9(2): 155-169].

INTRODUCCION

Los sueros antiofídicos o antivenenos han constituido el recurso terapéutico fundamental para el tratamiento de los envenenamientos por mordeduras de serpiente, desde que Calmette produjo el primer «serum antivenimeux» a fines del siglo pasado (47). En el continente americano, el renombrado científico brasileño Osvaldo Vital Brazil fue quien produjo los primeros antivenenos en 1901(47), trabajando en el Instituto Butantán.

En Costa Rica, en la década de los 1920, el Dr. Clodomiro Picado Twilight se preocupó por estudiar, de una forma integral, el problema del ofidismo, logrando establecer un banco de sueros adquiridos del Instituto Butantán (41). Sin embargo, no fue sino hasta 1967 que se logró producir el primer lote de suero antiofídico en Costa Rica, gracias a un esfuerzo conjunto entre la Universidad de Costa Rica, el Ministerio de Salud y la Misión Militar Norteamericana (2). Posteriormente, en 1970, se fundó el Instituto Clodomiro Picado, adscrito a la Universidad de Costa Rica. Desde entonces, el suero antiofídico polivalente ha sido el principal recurso en el tratamiento del accidente ofídico en Costa Rica y se ha iniciado en años recientes su distribución a otros países del área. Dada la importancia de este producto en el tratamiento del accidente ofídico en Centroamérica, hemos preparado esta revisión sobre los aspectos de producción, control de calidad y estabilidad del mismo, así como sobre los resultados de una serie de investigaciones dirigidas al estudio de la capacidad neutralizante del suero.

PRODUCCION DEL SUERO ANTIOFIDICO POLIVALENTE

El suero polivalente se produce mediante la inmunización activa de caballos adultos sanos con una mezcla de partes iguales de los venenos de *Bothrops asper* (terciopelo), *Crotalus durissus durissus* (cascabel) y *Lachesis muta stenophrys* (cascabela muda o matabuey). El esquema de inmunización para caballos que no han sido inoculados con veneno se basa en inoculaciones subcutáneas de estos venenos, en cantidades crecientes, mezclados con coadyuvantes de Freund o alginato de sodio, con intervalos de 10 días entre las dosis, durante cuatro meses (2, 4, 7). En los primeros años, el esquema de inmunización se llevaba hasta dosis de 600 mg de veneno, lo que traía como consecuencia un deterioro evidente en la condición general de los caballos. Sin embargo, las investigaciones recientes han demostrado que es posible lograr el desarrollo de una respuesta inmune adecuada utilizando dosis menores. En el caso de caballos que ya han sido inmunizados y sangrados previamente, una sola dosis de refuerzo de 30 ó 50 mg es suficiente para inducir una nueva respuesta inmune. Recientemente, Estrada *et al* (7) estudiaron el desarrollo de la respuesta inmune en caballos utilizados en la producción del suero polivalente. Estos autores llegaron a las siguientes conclusiones: (A) Existe una gran variabilidad individual en el desarrollo de esta respuesta inmune, por lo que es fundamental llevar un seguimiento individual de los caballos; lo anterior ha permitido seleccionar un grupo de caballos con

buena respuesta de anticuerpos contra los venenos. (B) La respuesta inmune llega a su punto más alto entre 100 y 130 días después de iniciada la inmunización, descendiendo luego. Esto implica que se debe seguir detenidamente el desarrollo del título de anticuerpos neutralizantes para detectar su momento óptimo y efectuar la sangría.

Una vez que se demuestra que un grupo de caballos ha desarrollado un título satisfactorio de anticuerpos neutralizantes, se efectúa la sangría de producción. Este título mínimo aceptable es de 3 mg de veneno de *Bothrops asper* neutralizados por 1 ml de suero. El fraccionamiento posterior del plasma equino se lleva a cabo mediante precipitación de las inmunoglobulinas por adición de sulfato de amonio.

Este procedimiento, es similar al que se utiliza en otros centros (28,45). Sin embargo, en algunos de estos laboratorios se utiliza, además, la digestión con pepsina (28), con el fin de obtener el fragmento F(ab')₂ en lugar de la inmunoglobulina completa. Con el uso del fragmento F(ab')₂ se disminuyen los problemas de hipersensibilidad inmediata:

El suero antiofídico producido en el Instituto Clodomiro Picado contiene, además de las inmunoglobulinas, pequeñas cantidades de otras proteínas séricas, tales como albúmina, alfa globulinas y beta globulinas (20). Una vez producido el suero, se efectúa un control de calidad siguiendo estipulaciones internacionales (4).

UNIFORMIDAD Y ESTABILIDAD DEL SUERO POLIVALENTE

La concentración del suero antiofídico se modifica, antes del envasado final,

de tal manera que tenga una capacidad neutralizante, o Dosis Efectiva 50%, de 3 mg de veneno de *Bothrops asper* neutralizados por cada ml de suero; lo anterior se hace para que los diferentes lotes tengan una potencia neutralizante similar, y así uniformar los protocolos de tratamiento. Dado que esta uniformidad se basa únicamente en la neutralización del efecto letal, y dado que los venenos de serpiente producen otros efectos farmacológicos relevantes, se estudió en cinco lotes diferentes de suero polivalente cuan uniformes son en cuanto a la neutralización de los efectos hemorrágico, proteolítico y defibrinante. Los resultados obtenidos permiten concluir que el ámbito de variación en la capacidad neutralizante de varios lotes es pequeño y que el suero es un producto bastante uniforme en su potencial terapéutico (Elizondo, J., Trabajo de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 1987; S. Quirós y J.M. Gutiérrez, comunicación personal).

Por otra parte, ya desde los años 60 se estableció que el suero polivalente líquido tiene un plazo de vencimiento de 3 años, en tanto que el suero liofilizado tiene un plazo de 5 años (5). En lo referente al suero líquido, Gené *et al.* (10) corroboraron el plazo de 3 años, demostrando incluso que la capacidad neutralizante del suero se prolonga durante varios meses posteriores a la fecha de vencimiento, siempre y cuando el producto se almacene a 4° C.

Más recientemente, Rojas *et al.* (43) estudiaron la estabilidad de este suero a diferentes temperaturas (4° C, 23° C, 30° C y 37° C) durante un año, encontrando que aún a 37° C el suero no pierde capacidad neutralizante al cabo

de un año de almacenamiento. No obstante, estos autores observaron la aparición de turbidez en los sueros almacenados a temperaturas de 23° C, 30° C y 37° C. Esta turbidez se debió a la formación de agregados de proteínas, tanto de IgG como de otras proteínas séricas. En conclusión, es recomendable mantener el suero líquido a temperaturas de refrigeración.

CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DEL SUERO

Se han efectuado una serie de estudios de carácter experimental tendientes a conocer la capacidad del suero polivalente para neutralizar varios efectos y actividades farmacológicas de los venenos. Inicialmente se demostró que este suero era eficaz en la neutralización del efecto letal inducido por los venenos de serpientes costarricenses de la familia Viperidae (2,4).

Sin embargo, estos venenos inducen una serie compleja de efectos fisiopatológicos, entre los que destacan un severo cuadro de alteraciones locales (mionecrosis, hemorragia y edema), los cuales se desencadenan pocos minutos después de la mordedura (3, 5, 15, 37). Posteriormente, aparecen los efectos sistémicos, entre los que destacan la hemorragia, la defibrinación y otras alteraciones de la coagulación, el choque cardiovascular y la insuficiencia renal (5, 34, 37). Estos efectos son causados por diversos tipos de toxinas, que tienen propiedades químicas y farmacológicas muy disímiles (26, 46). La complejidad de este cuadro hace que sea insuficiente evaluar la capacidad neutralizante de un suero únicamente con base en la neutralización del efecto letal. La Organización

Mundial de la Salud recomienda un enfoque más integral en el estudio de los sueros y su capacidad neutralizante (48).

En el Instituto Clodomiro Picado se ha estudiado la capacidad neutralizante de los sueros mediante el uso de una metodología que incluye dos tipos de experimentos (Fig. 1) En el primer tipo, el suero se incuba con el veneno durante 30 minutos a 37°c, antes de inocular la mezcla en animales de experimentación. El objetivo es determinar cuantitativamente la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero, sin tomar en cuenta la farmacocinética del veneno y del suero. En el segundo tipo, se trata de reproducir el desarrollo natural de un envenenamiento, es decir, se inocular el veneno y, a diferentes intervalos de tiempo, se administra el suero. En este tipo de procedimiento sí se toma en cuenta la farmacocinética del veneno y del suero, así como la rapidez con que se desencadenan los efectos inducidos por el veneno.

NEUTRALIZACION DE LOS EFECTOS SISTEMICOS

Neutralización del efecto letal: Tradicionalmente, esta neutralización se ha estudiado mediante experimentos con preincubación de suero y veneno. Bolaños (2) y Bolaños y Cerdas (4) demostraron claramente que, en estas circunstancias, el suero polivalente es eficaz en la neutralización de los venenos de las doce especies costarricenses de la familia Viperidae.

Los estudios más recientes han permitido concluir que este suero es también eficaz en la neutralización del efecto letal de los venenos de *B. asper* y *B. nummifer* de Honduras (42), de *Agkistrodon bilineatus* y *Crotalus durissus*

de Guatemala (42), así como de *B. atrox* y *B. pictus* del Perú (A. Zavaleta, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú, comunicación personal) y de *B. atrox* de Colombia (E. Rojas, Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica comunicación personal). Por otra parte, cuando los estudios de neutralización se efectúan mediante inoculación independiente de veneno y suero se observa, en el caso del veneno de *Lachesis muta melanocephala*, que aún administrando el suero con un retraso de varias horas, se logra una adecuada neutralización de la letalidad (21). Nuestras observaciones indican que la situación es similar con otros venenos de la familia Viperidae.

Alteraciones en la coagulación: Los venenos de serpientes de la familia Viperidae afectan al mecanismo de la coagulación sanguínea de varias maneras (3, 11). La mayoría de estos venenos contienen enzimas tipo trombina, capaces de convertir el fibrinógeno en fibrina (3, 46). Además, algunos venenos contienen enzimas que activan el Factor X (24). En el organismo, estos venenos inducen un síndrome de desfibrinación, con disminución de los niveles de fibrinógeno, aparición de los productos de degradación de la fibrina y prolongación de los tiempos de coagulación y de protrombina (1). La determinación del tiempo de protrombina se ha venido utilizando como un índice para seguir el curso del envenenamiento (40). Experimentalmente, todos los venenos de serpientes costarricenses de la familia Viperidae inducen desfibrinación, con las excepciones de los venenos de *Bothrops lateralis* (lora), *B. picadoi* (mano de piedra), *B. nasuta* (tamagá) y *B. ophryomegas* (toboba chinga) (11). El suero antiofídico polivalente es efi-

caz para neutralizar los efectos coagulante, fibrinolítico, fibrinogenolítico y desfibrinante de los venenos de estas serpientes costarricenses (11). Por otra parte, y en contraste con las observaciones de la neutralización de efectos locales, el suero polivalente es eficiente en la neutralización de la actividad desfibrinante del veneno de *B. asper*, aun cuando se administre después del envenenamiento (6). Estos hallazgos concuerdan con observaciones clínicas efectuadas en varios hospitales de Costa Rica, en el sentido de que las alteraciones en el tiempo de protrombina se corrigen luego de administrado el suero antiofídico (3). El Cuadro 1 resume los hallazgos relativos a la capacidad neutralizante del suero polivalente contra los efectos del veneno de *Bothrops asper*.

EL PROBLEMA DE LA NEUTRALIZACIÓN DE LOS EFECTOS LOCALES (HEMORRAGIA, EDEMA Y MIONECROSIS)

Hemorragia: Uno de los efectos que aparecen con mayor rapidez luego de inocular venenos de serpientes de la familia Viperidae es la hemorragia local (15, 37). Este fenómeno se origina en la alteración drástica de la microvasculatura, especialmente capilares y vénulas, por la acción directa de ciertos componentes de los venenos (37, 38). Estas «hemorraginas» son proteínas de un peso molecular relativamente alto, muchas de las cuales tienen actividad colagenasa (46).

El efecto hemorrágico de los venenos se cuantifica en el laboratorio mediante la técnica de Kondo *et al.* (27), basada en la inoculación intradérmica del veneno y la subsecuente medición del área hemorrágica en la piel. Por

otra parte, Ownby *et al.* (39) desarrollaron un método que cuantifica la hemoglobina presente en el tejido, asumiéndose que el efecto hemorrágico va a resultar en un aumento en la cantidad de hemoglobina presente en el tejido.

Los estudios de Gutiérrez *et al.* (14, 18, 21) han demostrado que el suero polivalente es eficaz para neutralizar este efecto en experimentos con preincubación de suero y veneno, incluso cuando el antiveneno se incubaba con venenos que no son utilizados en la mezcla antigénica para producir el suero polivalente. Este fenómeno también ha sido observado con otros venenos y antivenenos en otras partes del mundo (33, 35, 39, 44). Estos resultados señalan claramente que las toxinas hemorrágicas son muy antigénicas, capaces de inducir una respuesta elevada de anticuerpos neutralizantes en los caballos y que las hemorragias de venenos de diferentes especies presentan epitopos comunes.

Sin embargo, cuando los experimentos se efectúan con inoculación independiente de suero y veneno, los resultados son diferentes.

En estos experimentos, se observó una neutralización sólo parcial del efecto hemorrágico local cuando el suero se administró en los primeros minutos posteriores al envenenamiento, en tanto que casi no hubo neutralización cuando la seroterapia se atrasó (14, 18).

La explicación de este fenómeno se basa en la rapidez con la que se desencadena la hemorragia local una vez que el veneno se ha inoculado intramuscularmente (13, 17, 37). En cuestión de minutos se observa extravasación, lo que obviamente dificulta la neutralización de este efecto por los anticuerpos del suero, los cuales probablemente llegan al tejido afectado cuando el veneno ha ejercido su efecto

vasculotóxico (14, 18). Además, es factible que las alteraciones drásticas que produce el veneno en los vasos sanguíneos dificulten el acceso y distribución de los anticuerpos al área afectada. La explicación de esta situación aparentemente paradójica es clara: el suero tiene anticuerpos neutralizantes contra las toxinas hemorrágicas, pero la acción de éstas es tan rápida que se dificulta mucho la neutralización en circunstancias en donde el veneno y el suero se administran por separado.

La necrosis muscular. Los venenos de serpientes de la familia Viperidae originan alteraciones muy drásticas en el tejido muscular (25). Estos venenos poseen «miotoxinas», es decir, proteínas que afectan directamente las células musculares. La mayoría de estas toxinas actúan directamente sobre la membrana plasmática de los miocitos (12). En el caso de los venenos de las serpientes costarricenses *Bothrops asper* y *B. nummifer*, se ha aislado varias miotoxinas, las cuales inducen un cuadro patológico similar (16, 17, 19, 22). Por otra parte, los venenos que inducen un efecto hemorrágico afectan también al tejido muscular al inducir isquemia, resultante de la disminución en la perfusión sanguínea que sobreviene como consecuencia de la destrucción de la microvasculatura (17, 37).

Tradicionalmente, el efecto miotóxico de los venenos se ha evaluado mediante histología (25). En años recientes, se ha introducido la determinación de los niveles séricos de la enzima creatina kinasa como un índice cuantitativo de la necrosis muscular inducida por venenos (8, 13). Dada la especificidad que presenta esta enzima para detectar alteraciones en tejido

muscular, ha sido de suma utilidad para el estudio del efecto miotóxico inducido por venenos y de la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos (14, 21).

En experimentos con preincubación, el suero polivalente es eficaz en la neutralización del efecto miotóxico inducido por los venenos de *Bothrops asper* y *Lachesis muta* (14, 21), no ha sido investigada su capacidad neutralizante contra otros venenos. En el caso del veneno de *B. asper*, especie que produce accidentes caracterizados por una mionecrosis evidente con lesiones permanentes, se ha demostrado que el efecto miotóxico se debe a un grupo de cuatro miotoxinas con pesos moleculares de alrededor de 14.000 daltons y composición de aminoácidos muy similar (16, 30, 31). Lomonte *et al* (32) lograron aislar, mediante cromatografía de inmunoafinidad, anticuerpos antimiotoxina del suero polivalente, que neutralizan el efecto miotóxico del veneno de *B. asper* cuando se preincuban con este veneno antes de inocularse. Los resultados experimentales obtenidos indican, por lo tanto, que el suero polivalente contiene anticuerpos eficaces en la neutralización del efecto miotóxico del veneno de terciopelo.

Sin embargo, cuando se efectúan experimentos con inoculación independiente de veneno y suero, la neutralización de la miotoxicidad es sólo parcial (6, 14). Esto indica que, al igual que en el caso de la hemorragia, las miotoxinas tienen una acción tan rápida y drástica que dificulta muchísimo el éxito del tratamiento, si el antiveneno no se administra rápidamente.

Recientemente, Lomonte y Kahan (30) produjeron siete anticuerpos monoclonales contra las miotoxinas del veneno de *B. asper*, algunos de los cuales de-

mostraron tener capacidad neutralizante. Ello plantea la posibilidad de utilizar la tecnología de hibridomas en el desarrollo de recursos terapéuticos inmunológicos más eficaces para neutralizar actividades tóxicas de los venenos.

El efecto edematizante: Los venenos de serpientes de la familia Viperidae inducen un pronunciado edema local, pocos minutos después de la inoculación (13, 20). Este edema es causado, por un lado, por toxinas que afectan directamente la integridad de los vasos, originando un aumento en la permeabilidad. Pero además, los venenos inducen la liberación de varios autacoides, entre los que se destacan la histamina, las prostaglandinas y la bradikinina (23), aunque también el complemento podría desempeñar un papel de importancia. Experimentalmente, el edema se cuantifica mediante el aumento de peso de la pata de un ratón inoculada con veneno, comparándose con el peso de la otra pata, la cual se inyecta con solución salina (20, 49).

Gutiérrez *et al.* (20) efectuaron un estudio detallado sobre la capacidad del suero antiofídico polivalente para neutralizar el edema inducido por los venenos de serpientes costarricenses de la familia Viperidae. Los experimentos clásicos de preincubación de suero y veneno no fueron de utilidad, ya que se observó que las proteasas del veneno actuaban sobre proteínas presentes en el suero antiofídico, liberándose como consecuencia péptidos capaces de inducir edema (20). Se desarrolló entonces un método alterno que consiste en inyectar el suero por la vía intravenosa y, cinco minutos más tarde, administrar el veneno en la almohadilla plantar de los ratones, cuantificándose el edema posteriormente de la forma descrita (20). Mediante

este procedimiento se demostró que el suero es eficaz en la neutralización de la actividad edematígena de los venenos de *Bothrops asper*, *B. schlegelii*, *B. lateralis*, *B. nummifer*, *Agkistrodon bilineatus* y *Lachesis muta* (14, 20, 29), siendo ineficiente en la neutralización del edema inducido por la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (20, 29, 42).

Se ha propuesto que los venenos cuya actividad edematígena es mal neutralizada podrían contener toxinas de bajo peso molecular, incapaces de inducir formación de anticuerpos cuando los venenos son inoculados en caballos (20, 42). Sin embargo, pese a que efectivamente existen componentes de bajo peso molecular capaces de inducir edema, la mayor parte del edema inducido por venenos costarricenses de la familia Viperidae es debido a toxinas de un peso molecular relativamente alto (20). Es importante profundizar en el estudio de este fenómeno, para obtener una mejor comprensión de las causas de esta deficiente neutralización.

Cuando el estudio de la neutralización del edema se ha efectuado mediante experimentos en los que el suero se administra a diferentes intervalos de tiempo posteriores al envenenamiento, los resultados han sido similares a los descritos para hemorragia y mionecrosis: la neutralización del efecto es sólo parcial, incluso cuando el suero se administra de inmediato (14, 21). En síntesis, la neutralización de los efectos locales (hemorragia, mionecrosis y edema) inducidos por los venenos de serpientes de la familia Viperidae plantea un problema de difícil solución. Los hallazgos expuestos señalan claramente que el suero polivalente tiene anticuerpos que neutralizan estos efectos, con la excepción del

edema inducido por el veneno de cascabel. Ello indica que la gran mayoría de las toxinas hemorrágicas, miotóxicas y edematizantes son inmunogénicas y que los caballos inmunizados desarrollan un buen título de anticuerpos contra ellas. Sin embargo, estos efectos se desarrollan con una rapidez tal, una vez inoculado el veneno, que cuando la administración del suero se efectúa a *posteriori*, como ocurre en condiciones naturales, la neutralización de estos efectos patológicos es sólo parcial. Esto se debe, posiblemente, a que cuando los anticuerpos neutralizantes llegan al tejido afectado, ya se ha producido buena parte de la destrucción tisular y de las alteraciones vasculares. Como explicación alternativa, podría ser que la drástica destrucción de la vasculatura por el veneno dificulte el acceso de los anticuerpos a los sitios afectados. Esto indica que la rapidez con la que se inicie la seroterapia es un factor fundamental en la neutralización de los efectos locales y en la disminución de las posibles secuelas de estos efectos. Por otra parte, nuestros hallazgos experimentales han confirmado algo que se había observado en la experiencia clínica: la administración del suero por la vía intravenosa es mucho más eficaz que por la vía intramuscular para la neutralización de la mionecrosis, hemorragia y edema. Por ende, no se justifica administrar el suero intramuscularmente, bajo condiciones de hospitalización.

NEUTRALIZACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS VENENOS

En nuestros laboratorios, se ha estudiado también la capacidad del suero polivalente para neutralizar algunas

actividades enzimáticas de los venenos de serpientes de Costa Rica. Las observaciones efectuadas indican que el suero contiene anticuerpos que neutralizan los efectos proteolítico (sobre diversos sustratos como caseína, fibrinógeno y fibrina), hialuronidasa y fosfolipasa A₂ (9, 11, 18, 42).

En el caso de la neutralización de la actividad fosfolipasa A₂, Moreno *et al.* (36) demostraron que el suero es más eficaz contra ciertas isoenzimas que contra otras. Aunque la neutralización de las actividades enzimáticas no necesariamente se relaciona con actividades fisiopatológicas, su estudio permite una mejor comprensión de la capacidad neutralizante de los sueros. Por otra parte, se ha propuesto que la actividad hialuronidasa de los venenos juega *in vivo* el papel de factor de difusión degradando glicosaminoglicanos del tejido conectivo y facilitando la difusión del veneno (46). Por ello, el estudio de su neutralización es importante.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Desde su desarrollo, a fines del siglo pasado, la administración de sueros hiperinmunes ha demostrado ser el instrumento terapéutico más seguro para el tratamiento de los envenenamientos ofídicos. Los estudios inmunológicos descritos en esta revisión demuestran que el suero polivalente producido en Costa Rica posee una capacidad neutralizante adecuada contra una serie de actividades tóxicas y enzimáticas de los venenos de serpientes centroamericanas de la familia Viperidae.

Actualmente, en el Instituto Clodomiro Picado se está trabajando en varios proyectos de investigación cuya finalidad es mejorar aún más la calidad de

este suero mediante la introducción de procedimientos alternos, que hagan más eficaz la purificación de las inmunoglobulinas equinas. Simultáneamente, se continúa estudiando la capacidad neutralizante del suero sobre otros venenos, así como sobre toxinas purificadas. De esta manera, el desarrollo de investigación tecnológica, unida a los estudios básicos sobre caracterización y mecanismo de acción de toxinas y a la experiencia clínica que se desarrolla en los hospitales, permitirán una mejor comprensión del accidente ofídico y abrirán nuevas posibilidades para mejorar el tratamiento de los envenenamientos por mordedura de serpiente.

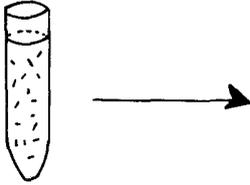
AGRADECIMIENTO

Gran parte de los estudios citados en esta revisión han sido financiados por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, proyecto 741 -84-82 y por la International Foundation for Science, proyectos F/883-1 y F/883-2. J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, J.A. Gené, G. Rojas y F. Chaves son miembros del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

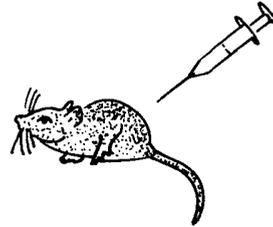
ABSTRACT

This review focuses on the production, stability and neutralizing capacity of the polyvalent antivenom produced at the Instituto Clodomiro Picado, in Costa Rica. Antibodies are purified, by ammonium sulfate fractionation, from plasma obtained from horses immunized with a mixture of the venoms of Bothrops asper (terciopelo), Crotalus durissus durissus (cascabel)

EXPERIMENTOS CON PREINCUBACION DE SUERO Y VENENO

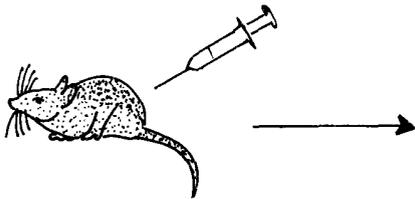


Suero y veneno se incuban a 37° C durante 30 min previo a la inoculación.

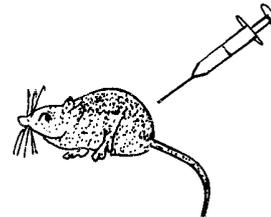


Las mezclas de suero y veneno se inoculan en animales experimentales.

EXPERIMENTOS CON INOCULACION INDEPENDIENTE DE SUERO Y VENENO



Animales experimentales son inoculados con una dosis de reto de veneno.



A diferentes intervalos de tiempo posteriores al envenenamiento, se inocula suero polivalente por la vía intravenosa.

FIG. 1: Esquema que resume los dos tipos de experimentos utilizados en el estudio de la capacidad neutralizante del suero antiofídico polivalente.

CUADRO 1. Capacidad neutralizante del suero antiofídico polivalente hacia diferentes actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops asper* (terciopelo), en experimentos con preincubación de suero y veneno.

Actividad	Capacidad neutralizante (Dosis efectiva 50%)*	Referencia
Hialuronidasa	2 µl suero/mg veneno	10
Proteolítica	90 µl suero/mg veneno	18
Hemorrágica	135 µl suero/mg veneno	18
Fibrinolítica	278 µl suero/mg veneno	11
Coagulante	293 µl suero/mg veneno	11
Hemolítica indirecta en tubo	332 µl suero/mg veneno	10
Letal	333 µl suero/mg veneno	14
Edematígena	460 µl suero/mg veneno	14
Desfibrinante	600 µl suero/mg veneno	11
Miotóxica	900 µl suero/mg veneno	14

* La capacidad neutralizante se expresa como Dosis Efectiva 50%, definida como la razón µl de suero por mg de veneno en la que la actividad del veneno es neutralizada en un 50%.

and *Lachesis muta* (cascabela muda). Antivenom comes in two presentations: liquid, with a shelf life of 3 years in refrigeration, and lyophilized, with a shelf life of 5 years, not requiring refrigeration. Different batches of antivenom are uniform in terms of their neutralizing capacity.

Two types of experiments have been performed in order to study the ability of polyvalent antivenom to neutralize toxic and enzymatic effects induced by snake venoms: (a) Those in which venom and antivenom are incubated prior to injection in experimental animals; and (b) those in which antivenom is administered intravenously at different time intervals after venom injection. Experimental findings clearly indicate that the antivenom is efficient in neutralizing toxic and enzymatic effects induced by Costa Rican viperid venoms when «preincubation type» of experiments are performed. This has been also observed with venoms from other Central and South American snakes. On the other hand, when venom and antivenom are injected independently, results vary depending on the toxic effect being tested. In the case of local effects (myonecrosis, hemorrhage and edema) neutralization is only partial, whereas in the case of lethal and defibrinating effects neutralization is more efficient. This discrepancy is due to the fact that local effects develop rapidly after envenomation, thereby making neutralization by antivenom more difficult. It is concluded that polyvalent antivenom contains antibodies effective in the neutralization of toxic and enzymatic activities induced by Central American viperid venoms. However due to the rapid onset of local effects, neutralization of local tissue damage is difficult, requiring an early administration of antivenom.

BIBLIOGRAFIA

1. Barrantes, A., Solís, V, Bolaños, R. Alteración de los mecanismos de la coagulación en el envenenamiento por *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1985; 23: 399-408.
2. Bolaños, R. Nuevos recursos contra el ofidismo en Centroamérica. San José: Ministerio de Salubridad Pública y Universidad de Costa Rica, 1971; 1-29.
3. Bolaños, R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte: aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1982; 3: 165-184.
4. Bolaños, R., Cerdas, L. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 1980; 88: 189-196.
5. Bolaños, R., Rojas, O., Ulloa, C.E. Aspectos biomédicos de cuatro casos de mordedura de serpiente por *Lachesis muta* (Ophidia; Viperidae) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1982; 30: 53-58.
6. Chaves, F., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Cerdas, L. Local and systemic pathological effects induced by injection of *Bothrops asper* (terciopelo) in mice, and neutralization by polyvalent antivenom. *Toxicon* 1989 (en prensa).
7. Estrada, A., Gutiérrez, J.M., Alvarado, J. Robles, A., Avila, C., González, N. Desarrollo de la respuesta de anticuerpos antifosfolipasa A₂ en caballos inoculados con veneno para la producción del suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1989 (en prensa).
8. Fabiano, R., Tu, A.T. Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from prairie rattlesnake venom. *Biochemistry* 1981; 20: 21-27.
9. Gené, J.A., Gómez, M., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1985; 23: 1015-1018.

10. Gené, J.A., Gómez, M., Cerdas, L. Estudio sobre la estabilidad de la actividad neutralizante del suero antiofídico contra veneno de terciopelo (*Bothrops asper*). *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1986; 7: 3-5.
11. Gené, J.A., Roy A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. Comparative study on coagulant, defibrinating and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* (en prensa).
12. Gutiérrez, J.M., Cerdas L. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Rev. Biol. Trop.* 1984; 32:213-222.
13. Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Bolaños, A. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*. 1980; 18: 603-610.
14. Gutiérrez, J.M. Chaves, F., Bolaños, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon*. 1981; 19: 493-500.
15. Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., Arroyo, O., Rojas, E., Lomonte, B., Gené, J.A. Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente *Bothrops asper*. *Acta Méd. Cost.* 1982; 25:255-262.
16. Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L.; Odell, G.V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*. 1984; 22:115-128.
17. Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., Odell, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.* 1984; 40:367-379.
18. Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Rojas, G., Cerdas, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1985; 23: 887-893.
19. Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Cerdas, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon*. 1986; 24:885-894.
20. Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A., Cerdas, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986; 85C: 171-175.
21. Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Cerdas, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon*. 1987; 25: 713-720.
22. Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Gené, J.A., Lomonte, B., Camacho, Z., Schosinsky, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon*. 1989 (en prensa).
23. Hawgood, B.J. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In *Rattlesnake Venoms, Their Actions and Treatment* (Tu, A.T., Ed), New York, Marcel Dekker. 1982, 121-162.
24. Hoffman, H., Dumarey, C., Bon, C. Blood coagulation induced by *Bothrops atrox* venom: Identification and properties of a factor X activator. *Biochimie* 1983; 65:201-210.
25. Homma, M., Tu, A.T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br. J. exp. Pathol.* 1971; 52:538-542.
26. Karlsson, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: *Snake Venoms* (Lee, C.Y., Ed.). Berlin, Springer-Verlag. 1979, 159-212.
27. Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., Ohsaka, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 1960; 13: 43-49.
28. Latifi, M. Commercial production of antisnakebite serum (antivenin). In: *Biology of the Reptilia* (Gans, C., Ed.). London Academic Press. 1978; 8: 561-588.

29. Lomonte, B. Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1985; 23: 173-176.
30. Lomonte, B., Kahan, L. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. *Toxicon*. 1988; 26: 675-689.
31. Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1989 (en prensa).
32. Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Mata, E. Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 1985; 23:807-813.
33. Mandelbaum, F.R., Serrano, S.M.T., Sakurada, J.K., Rangel, H.A., Assakura, M. Immunochemical comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the Crotalinae and Viperinae subfamilies. *Toxicon*. 1989; 27: 169-177.
34. Mebs, D. Pharmacology of reptilian venoms. In: *Biology of the Reptilia* (Gans, C., Ed.). London, Academic Press. 1978; 437-560.
35. Mebs, D. Pohlmann, S., Tenspolde, W.V. Snake venoms hemorrhagins: Neutralization by commercial antivenoms. *Toxicon* 1988; 26: 363-371.
36. Moreno, E., Alape, A., Sánchez, M., Gutiérrez, J.M. A new method for the detection of phospholipase A₂ variants: Identification of isozymes in the venoms of newborn and adult *Bothrops asper* (terciopelo) snakes. *Toxicon*. 1988; 26: 363-371.
37. Ownby, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: *Rattlesnake Venoms. Their Actions and Treatment* (Tu, A. T., Ed.). New York, Marcel Dekker. 1982; 163-209.
38. Ownby, C.L., Bjarnason, J., Tu, A.T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Am. J. Pathol.* 1978; 93: 201-218.
39. Ownby, C. L., Colberg, T., Odell, G. V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: Ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon* 1984; 22: 227-233.
40. Peña-Chavarría, A., Villarejos, V.M., Zomer, M. Clinical importance of prothrombin time determination in snake-venom poisoning. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1970; 19: 342-344.
41. Picado, C. Serpientes venenosas de Costa Rica. Sus venenos. Seroterapia antifídica. San José, Imprenta Alsina. 1931.
42. Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Gómez, M., Cerdas, L. Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1987; 35: 59-67.
43. Rojas, G., Espinoza, M., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. Effect of storage temperature on the stability of polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 1989 (en prensa).
44. Russell, F.E., Ruzic, N. González, H. Effectiveness of antivenin (Crotalidae) polyvalent following injection of *Crotalus* venom. *Toxicon*. 1973; 11:461-467.
45. Sullivan, J.B. Past, present, and future immunotherapy of snake venom poisoning. *Annals of Emergency Medicine* 1987; 16: 938-944.
46. Tu, A.T. *Venoms. Chemistry and Molecular Biology*. New York, John Wiley. 1977: 1-560.
47. Vital-Brazil, O. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Memorias Instituto Butantan* 1987; 49: 7-20.
48. World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. W.H.O. offset publication N°58. 1981:9-11.

49. Yamakawa, M., Nozaki, M., Hokama, Z. Fractionation of sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities

of the fractions. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins* (Ohsaka, A., Hayashi, K., Sawai, Y., Eds.) New York, Plenum Press. 1976; 1: 97-109.