

ESTUDIOS SOBRE COMPLEMENTO

II. MECANISMO DE LA HIPOCOMPLEMENTEMIA EN ANIMALES CON LESION HEPATICA EXPERIMENTAL POR TETRACLORURO DE CARBONO*

DR. JESÚS KUMATE**

DR. ABRAHAM KATASE**

DR. LÁZARO BENAVIDES**

DR. JOSÉ HIKIMURA**

UNO DE LOS EFECTOS producidos por los agentes hepatotóxicos es la disminución en la actividad del complemento sérico; la administración de dosis subletales de fósforo, tetracloruro de carbono^{1,2} o etionina³ —en forma de producir una intoxicación crónica que lleve finalmente a la cirrosis—, ha resultado regularmente en niveles de C' muy inferiores a los valores iniciales; en casi todos los estudios mencionados se ha tratado de asociar dichas disminuciones con el déficit de algunas fracciones protéicas, en especial albúmina y factores de coagulación. La observación de que en los enfermos con lesión hepática severa⁴ se encuentran con frecuencia valores bajos de C' , ha venido a sugerir que el hígado sea el órgano donde se originan las proteínas constituyentes de la actividad complementaria y que su disminución en los casos de lesión o intoxicación experimental refleja la interferencia o insuficiencia de sus mecanismos biosintéticos. El que la evisceración de ratas reduzca a menos del 5% los títulos de C' es un apoyo adicional a esa idea.⁵

Un aspecto importante poco explorado y que es necesario para aceptar la interpretación de la participación hepática es la precocidad con que se induce la disminución en la actividad del C' ; en experiencias preliminares observamos que al cabo de 18 horas se puede tener una disminución de más del 90%, lo cual planteaba duda con relación a la supuesta disminución en la producción

* Trabajo leído en la sesión del 8 de agosto de 1962; realizado con la ayuda del Fondo Rockefeller RF-61091, Partida 4 No. 1.

** Del Departamento de Infectología (Sección de Inmunoquímica), Hospital Infantil de México.

a nivel hepático; el hallazgo de un caso de hipocomplementemia idiopática⁶ en un niño nos permitió medir por primera vez la vida media del C' que resultó ser de 8 días, con lo cual descartamos el que la hipocomplementemia pudiera explicarse en base a biosíntesis deficiente.

En este trabajo se presentan datos que informan acerca de la dinámica en los títulos de C' durante las fases iniciales de intoxicaciones subletales por tetracloruro de carbono; la evolución de los 4 componentes y, en especial, la aparición de actividad anticomplementaria que puede explicar una disminución rápida de los niveles séricos así como los mecanismos probables de tal acción.

Material y métodos: Los animales objeto del estudio fueron ratas y cobayos intoxicados por vía intraperitoneal con tetracloruro de carbono a dosis de 1.0 a 1.25 c.c./Kg. de peso mezclado con aceite de parafina 1:2 v/v.

La determinación de C' se realizó según la técnica al 50% de hemólisis; diluyente amortiguado con tretanolamina a pH 7.40, $\text{Ca}^{++} 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $\text{Mg}^{++} 5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 30' de incubación y volumen de 1.5 ml.; el cálculo de la unidad 50% hemolítica se hizo empleando papel K & E 358-22, en el que el volumen se expresa logarítmicamente y el porcentaje de hemólisis en unidades de probabilidad.

Los componentes del C' se determinaron por las técnicas descritas en Kabat y Mayer⁷ con las siguientes peculiaridades:

Para C1 se utilizó "E" obtenido de suero de cobayo después de diálisis a 4°C contra amortiguador de fosfatos a pH 5.4 y $\mu = 0.02$; el reactivo se diluyó 1:20 y se adicionó de "H" 1:10 (suero humano calentado 20' a 56°C); el suero problema se diluyó 1:500.

Para C'2 se empleó "M" procedente de suero humano dializado igual que "E"; se guardó el precipitado, el cual fue diluido 1:20, se agregó "H" 1:10 y el suero problema fue diluido 1:50.

Para C'3 se usó R'3 proveniente de suero humano tratado con zimosano Fleischmann grado A; 1.35 mg/ml. de suero, 30' a 37°C; se usó diluido 1:5 y el suero problema 1:250.

Para C'4 se ocupó R'4 originado de suero de cuy, sobre el que actuó hidrazina 0.15 M; 0.2 ml./ml. de suero, 90' a 37°C; se diluyó 1:10 y el problema 1:20.

La actividad del amboceptor se estudió según la técnica de Kent, en la que se varía la dilución del anticuerpo y se mantiene constante la cantidad de C'; el objetivo es averiguar más allá de que dilución del amboceptor no aumenta la hemólisis. El fraccionamiento proteico de las muestras de suero con actividad anti-C' se realizó con sulfato de amonio a saturaciones variables desde 34 hasta 68% con el propósito de separar gammaglobulinas, alfa y beta globulinas y albúminas. La concentración proteica se midió por la técnica del biuret.

La actividad anti-C' se investigó en muestras de suero calentadas a 54°C.

TABLE I

Actividad del C' y componentes (unidades 50%/mL.)														
Tiempo post-intoxicación (días)	C'			C'1			C'2			C'3		C'4		
	146 (34)	140 (5)	161 (5)	242 (7)	223 (5)	216 (5)	130 (7)	104 (5)	112 (5)	950 (17)	787 (5)	502 (5)	235 (5)	575 (5)
0														
1	15			33			22			926		27		
3		158			218			117			910		72	
6			352			580			211					322

() número de animales.

diluidas desde 1:10 hasta 1:500 en presencia de 1 unidad 50% hemolítica; el cálculo se hizo como en la titulación del C' al 50% de hemólisis.

La acción de la cortisona se estudió mediante inyección intraperitoneal de succinato de hidrocortisona (Solucortef "Upjohn") a dosis de 10 mg./animal durante 4 días consecutivas, al cabo de las cuales fueron intoxicados con la dosis habitual de tetracloruro de carbono o fueron dejados como control de la acción del corticosteroide sobre el C' sérico.

RESULTADOS

Los experimentos en los que se estudió el efecto de la intoxicación sobre el C' global y sus componentes se han agrupado en la Tabla I y Gráfica 1; en ésta se expresan los valores en forma porcentual comparativamente al nivel inicial.

Las experiencias para conocer la precocidad de la hipocomplementemia revelaron que a las 3 y 6 horas se tienen valores normales en relación a los controles.

La búsqueda de C'1 y C'2 en orina de ratas intoxicadas fue negativa, coincidiendo con valores bajos del C' sérico a las 24 horas postintoxicación.

La evolución del C' sérico en cobayos intoxicados se presenta en la Gráfica 2, con animales que sirvieron de controles individuales y sobrevivieron 5 días a la dosis del tóxico (1.0 c.c./Kg. de peso).

La aparición de actividad anti-C' se investigó en los mismos períodos que la determinación del C'; los sueros fueron estudiados inactivados por calor; se determinó el efecto de dichos sueros sobre la hemólisis producidos por 1 unidad 50% hemólisis producidos por 1 unidad 50% hemolítica de suero de cobayo; Tabla II.

La separación proteica mediante precipitación con sulfato de amonio produjo 5 fracciones que fueron analizadas de manera similar, respecto a su acción anti-C', y se expresó su actividad específica en función de su concentración; Tabla III.

El efecto de la fracción más activa (γ -globulina) sobre la titulación del amboceptor a diferentes pH se presenta en la Gráfica 3.

Los resultados del tratamiento previo con hidrocortisona (10 mg. intramusculares/día, durante 4 días) sobre la intoxicación con tetracloruro de carbono se presentan en la Tabla IV, así como los controles (tratados con hidrocortisona o con aceite de parafina).

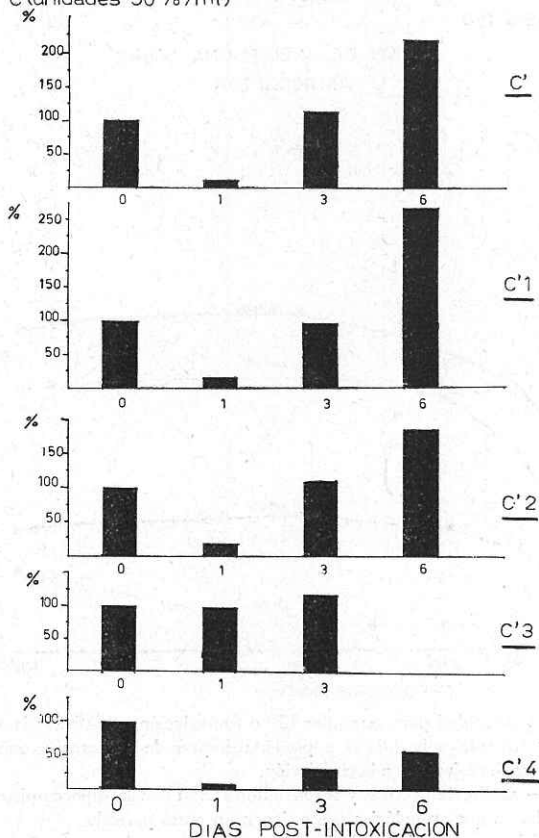
DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican muy claramente que el C' se afecta en etapas relativamente precoces de la intoxicación aguda por tetracloruro de carbono, ya que a las 18 horas se tienen valores inferiores al 10% del inicial; las determinaciones realizadas a las 3 y 6 horas no mostraron alteración en relación con los valores previos, lo cual señala la participación del tóxico a través de

GRÁFICA 1

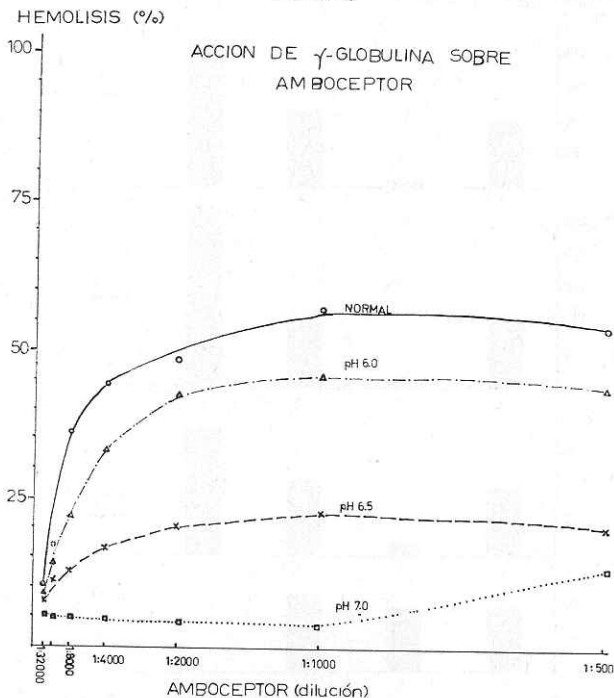
EFECTOS DE LA INTOXICACION POR CCl_4 SOBRE
COMPLEMENTO

C'(unidades 50%/ml)



mecanismos indirectos, ya que la concentración máxima se alcanza en hígado a los 90'. Estudios^{8,9} para aclarar la secuencia de eventos patológicos en hígado han revelado que a las 3 horas de postintoxicación hay esteatosis y salida de enzimas como las deshidrogenasas isocítrica y málica sin lesión mitocondrial

GRÁFICA 2



(juzgada por la capacidad para acumular K^+ o fosforilación oxidativa); la alteración en esas partículas subcelulares se presenta después de 12 horas y coincide con necrosis y escape enzimático a la circulación.

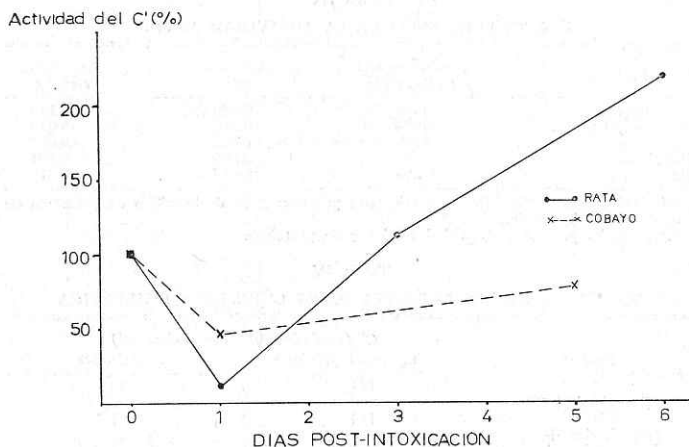
Parece lícito asociar la necrosis y lesión mitocondrial con la hipocomplementemia observada, ya que cronológicamente siguen un curso paralelo.

En cuanto al comportamiento de los 4 componentes se observaron 3 patrones de respuesta:

- a) C'1 y C'2, así como la actividad total C' disminuyen hasta valores < 10% del original al cabo de 18-22 horas para recuperarse totalmente al cabo de 72 horas y sobrepasar la actividad previa en más del doble al terminar el 5º o 6º día.
- b) C'3 no se afecta, ya que las variaciones observadas pueden deberse al error experimental.
- c) C'4 que disminuye como C'1 y C'2, pero que a lo largo de los 6 días siguientes no logra llegar a los títulos originales a pesar de la tendencia franca al aumento.

GRÁFICA 3

EVOLUCION DE LOS NIVELES DE COMPLEMENTO
DURANTE LA INTOXICACION POR CCl_4



Los resultados relacionados por Rice y col.^{1,3} en cobayos sometidos a intoxicación crónica mostraron disminución global de los 4 componentes, siendo C'4 el más afectado; nuestras observaciones en relación a ese componente son similares.

La recuperación del nivel normal de C' total en presencia de valores sub-normales de C'4 o la disminución del título global coincidiendo con C'3 normal son indicaciones de que la actividad total es la resultante de los 4 componentes, pudiendo estar normal uno de ellos (en nuestro caso C'3) y resultar nula la acción final por la deficiencia de uno o más de ellos; la normalización a pesar

de niveles bajos de C'⁴, señala que este componente existe en exceso al necesario para la acción del conjunto.

Independientemente de la explicación que se quiera dar a la disminución transitoria del C' y de algunos de sus componentes, no puede sostenerse que sea

TABLA II
ACTIVIDAD ANTI-C' DURANTE LA INTOXICACION

<i>Tiempo post-intoxicación</i>	<i>Número de animales</i>	<i>Suero inactivado (unidades/ml.)*</i>
24 hs.	8	43
72 hs.	5	13
144 hs.	5	7

* Cantidad que produce 25% de hemólisis en presencia de 1 unidad 50% hemolítica.

TABLA III
FRACCIONAMIENTO DE LA ACTIVIDAD ANTI-C'

<i>Proteínas</i>	<i>Saturación del (NH₄)₂SO₄</i>	<i>Actividad total</i>	<i>Actividad específica</i>
—globulinas	34%	0.089	0.113
—globulinas	40%	0.040	0.017
—globulinas	50%	0.022	0.007
albúminas	62%	0.040	0.004
albúminas	68%	0.017	0.019

Actividad total: Cantidad necesaria para producir 25% de hemólisis en presencia de 1 unidad 50% hemolítica.

Actividad específica: Actividad total/mg de proteínas.

TABLA IV
ACCION DE HIDROCORTISONA SOBRE C' EN LESION HEPATICA

<i>Grupos</i>	<i>C' (unidades 50% hemolíticas/ml)</i>	
	<i>Controles previos</i>	<i>Intoxicadas</i>
I (intoxicadas)	161	15
II (intoxicadas + hidrocortisona)	144	2
III (hidrocortisona)	128	113
IV (controles normales)	112	150

debida —básicamente— a una biosíntesis deficiente; tal situación requeriría una vida media de 3 horas, difícil de aceptar si consideramos que en el humano es de 8 días y aún dejando un margen grande para considerar el metabolismo más acelerado de la rata y cobayo, la vida media no puede disminuir más de lo observado con otras proteínas.¹⁰

La posibilidad de actividad anti-C' fue explorado al descartar una vía de escape urinaria tal como se describe un síndrome nefrótico;¹¹ los resultados apoyan su existencia correlacionando muy estrechamente la disminución de los títulos de C' con valores elevados de tal acción anti-C'; así, el máximo 43 unidades/ml, coexiste con la depresión máxima del C' y una actividad mínima al cabo de 6 días asociada a valores de más del doble original en el título global de C'. Tal como era de esperarse la mayor actividad anti-C' se aisló en la fracción gammaglobulina, aunque en las porciones de albúminas también se localizó acción importante; no se ha probado esa actividad en albúminas y es muy probable que se trate de otros componentes proteicos contaminantes. A pesar del evidente efecto anti-C' de las gammaglobulinas, su concentración no aumenta tan desproporcionadamente como la acción inhibidora y da oportunidad para pensar también en proteínas contaminantes; los estudios de Marcus¹² con gammaglobulina absorbida en bentonita que enseñan a C'2 como el componente menos afectado durante la acción anti-C', pueden aducirse como argumento adicional para no aceptar que la hipocomplementemia esté mediada exclusivamente por gammaglobulinas anti-C'.

La intervención de esteroides anti-inflamatorios en lesión hepática es muy discutida; en estudios previos^{13, 14} se ha encontrado que los escapes enzimáticos se exageran en animales intoxicados y tratados con cortisona y los exámenes histológicos en la actividad inflamatoria al cabo, revelan necrosis similar a los no tratados y retraso de 24 horas; estas peculiaridades nos hicieron pensar en analizar su acción en la hipocomplementemia; los resultados son idénticos a los registrados por Rice¹⁵ en intoxicaciones crónicas con etionina en los que la cortisona no modificó los niveles bajos de C'; en nuestra serie se estudió el efecto de la administración previa a la intoxicación y, como puede verse en la Tabla IV, no se encontró efecto alguno sobre la baja del C', en tanto que las ratas tratadas con hidrocortisona permanecieron con los mismos títulos.

Finalmente, se investigó la acción de la fracción gammaglobulínica sobre la titulación del amboceptor; dicha proteína no altera la tendencia de la curva i.e. la hemólisis no aumenta a partir del título en que se estabiliza dicha acción en ausencia de inhibidores; se puede inferir que la acción es puramente anti-C' sin que la supersensibilización pueda mejorar la deficiencia hemolítica.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. La intoxicación subletal de ratas y cobayos con tetracloruro de carbono induce una disminución de más del 90% al cabo de 18-22 horas, dichos niveles tienden a recuperarse en las siguientes 48 horas y al cabo de 5-6 días se hallan completamente restablecidos y ocasionalmente en zona superior a la normal.

2. De los 4 componentes sólo C'3 no es afectado y permanece con variaciones mínimas.
3. C'1 y C'2 siguen la tendencia señalada para C' total.
4. C'4 a pesar de aumentos progresivos permanece en zona subnormal durante los 6 días siguientes a la intoxicación.
5. La disminución de C' aparece después de 6 y antes de 18 horas, por lo que se sugiere asociarla con lesión mitocondrial.
6. No hay fuga de C'1 o C'2 a orina.
7. Aparece actividad anti-C' localizada principalmente a gammaglobulinas guardando relación inversa con los niveles de C'.
8. La hidrocortisona administrada previamente a la intoxicación no altera el fenómeno de la hipocomplementemia.
9. La supersensibilización de los eritrocitos no modifica la acción inhibidora de la fracción gammaglobulínica a diferentes pH.

REFERENCIAS

1. Rice, C. E.; Boulanger, P., y Plummer, P. J. G.: *Parallel studies of complement and coagulation. IV. Effect of carbon tetrachloride*. Canad. J. Med. Sci. 29: 48-58, 1951.
2. Mohan Rangan, C., y Chandra, J.: *Guinea pig and human complement following liver injury*. J. Indian M. A. 28: 111-113, 1957.
3. Rice, C. E.; Boulanger, P.; Plummer, P. J. G., y Annau, E.: *Parallel studies of complement and blood coagulation*. J. Immunol. 68: 673-686, 1952.
4. Wiedermann, G., y Reinhardt, F.: *Zur klinischen Bedeutung des Serunkomplements*. Wien. Z. Inn. Med. 41: 121-129, 1960.
5. Gordon, P.: *Complement activity in the eviscerate rat*. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 89: 607-608, 1955.
6. Benavides, L.; Kumate, J., y Gutiérrez, G.: *Hipocomplementemia asociada a meningitis purulentas repetidas*. Bol. Méd. Hosp. Infant. (Méx.) en prensa.
7. Kabat, E. A., y Mayer, M. M.: *Experimental Immunochemistry*. 2a. edición. Springfield, Charles C. Thomas Pub., p.p. 159-165, 1961.
8. Share, L., y Recknagel, R. O.: *Effect of carbon tetrachloride poisoning on potassium, sodium and water content of liver mitochondria*. Am. J. Physiol. 197: 121-125, 1959.
9. Rees, K. R., y Spector, W. G.: *Reversible nature of liver cell damage due to carbon tetrachloride as demonstrated by the use of Phenergan*. Nature 190: 821-822, 1961.
10. Dixon, F. J., Talmage, D. W., Maurer, P. H., y Deichmiller, M.: *Half-life of homologous gamma-globulin (antibody) in several species*. J. Exp. Med. 96: 313-318, 1952.
11. Seifter, S., y Ecker, E. E.: *Complement and isohemoagglutinins in urinary proteins*. J. Clin. Invest. 25: 809-813, 1946.
12. Marcus, D. M.: *A study of the mechanism of the anticomplementary activity of gamma-globulin*. J. Immunol. 84: 273-284, 1960.
13. Manso, C.; Friend, C., y Wróblewski, F.: *The influence of 17-hydroxycorticosterone on viral hepatitis in mice*. J. Lab. & Clin. Med. 53: 729-736, 1959.
14. Kumate, J.: *Lesión hepática experimental. Metabolismo del escape enzimático de arginasa catalasa y esterases en la intoxicación por tetracloruro de carbono y radiaciones ionizantes en distintos animales*. Gac. méd. Méx. 89: 769-785, 1959.
15. Boulanger, P.; Plummer, P. J. G., y Rice, C. E.: *Parallel studies of complement and blood coagulation. XI. The effect of cortisone injection and partial adrenalectomy*. Canad. J. Comp. Med. 17: 406-413, 1953.