

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE UN ANTIVENENO FABOTERÁPICO
ELABORADO CON VENENO DE LA ESPECIE *Bothrops asper* DE COLOMBIA**



LAURA CATALINA RUIZ DUARTE
Estudiante de Microbiología Industrial

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de Microbióloga Industrial

Hugo Diez Ortega M.Sc, Ph.D.
Director

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C., COLOMBIA,
2019**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE UN ANTIVENENO FABOTERÁPICO
ELABORADO CON VENENO DE LA ESPECIE *Bothrops asper* DE COLOMBIA
ATENCIÓN GERIATRICA EN BOGOTÁ**



LAURA CATALINA RUIZ DUARTE

APROBADO

Hugo Diez Ortega, Ph.D.
Director

Karen Sarmiento
Jurado

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE UN ANTIVENENO FABOTERÁPICO
ELABORADO CON VENENO DE LA ESPECIE *Bothrops asper* DE COLOMBIA**



LAURA CATALINA RUIZ DUARTE

APROBADO

Concepción Judith Puerta, Ph.D.
Decana Facultad de Ciencias

Marcela Franco C., Ph.D.
Directora de Microbiología Industrial

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

Debido a las condiciones geográficas de Colombia, desde el año 2004 el accidente ofídico es de notificación obligatoria. Reportes del Instituto Nacional de Salud indican que en la región donde se registran más accidentes son Antioquia, Orinoquía y la región Amazónica. En América Latina, aproximadamente 70,000 personas son mordidas por serpientes del género *Bothrops*. En Colombia para el año 2019, se notificaron que 66,8% de los accidentes ofídicos son causados por las serpientes *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* [1,2]. La composición del veneno, así como de los antivenenos dependen de la especie, variabilidades geográficas, edad del animal, polimorfismo de las enzimas fosfolipasas y ontogenética, entre otros caracteres. [3]

El principal tratamiento para contrarrestar el envenenamiento por la mordedura de serpientes es el suero antiofídico polivalente, que al estar compuesto por varias proteínas de origen equino pueden generar efectos secundarios tales como: edemas, anafilaxia o trombocitopenia [4]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que, en la aplicación de estos tratamientos, debe existir un máximo de 15% de casos con reacciones adversas, en Colombia se presenta un 90% de estos casos [5]. Finalmente, hay que tener claro que Colombia no produce antivenenos faboterápicos que disminuyan los efectos colaterales.

2. JUSTIFICACIÓN.

La OMS, establece que para evaluar la calidad de un antiveneno faboterápico monovalente desarrollado con veneno de la especie *Bothrops asper* de Colombia; es necesario determinar la concentración de proteínas, su purificación mediante (SDS-PAGE), la dosis letal 50, dosis efectiva 50 y la neutralización de las actividades coagulante, amiloiditica, proteolítica y hemolítica [5]; para posteriormente compararlo con antivenenos polivalentes faboterápicos comerciales.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Marco Conceptual.

El accidente ofídico es la mordedura de serpientes, éstas pueden inocular veneno dependiendo de la especie involucrada, generando lesiones y alteraciones fisiopatológicas en la víctima [6]. En Colombia las serpientes venenosas con mayor importancia médica pertenecen a dos familias: *Viperidae* representadas por las "víboras" y *Elapidae* representadas por las "corales" o "coralillos" [7]. Más del 95% de los accidentes ofídicos son ocasionados por serpientes de la familia *Viperidae* destacándose *Bothrops asper* y *Bothrops atrox*. [3] El veneno de la familia *Viperidae* está compuesto por varias sustancias activas y un elevado contenido enzimático, que generan daños locales y sistémicos que incluyen edemas, hemorragias, trastornos en la coagulación sanguínea y necrosis [8,9]. Por otro lado, el veneno de la familia *Elapidae* es potencialmente mortal debido a la presencia de polipéptidos no enzimáticos con acción neurotóxica [10]

El género Bothrops sp. es el principal responsable de las mordeduras en la ecorregión Andina, Pacífica, Caribe, Orinoquia y Atlántica. Es una especie reactiva por su espacio de área vital. Los adultos pueden medir entre 140-180cm, las hembras tienen cuerpos más gruesos y pueden llegar a pesar hasta 6 Kg,

se encuentran por debajo de los 2600 msnm, tienen escamas brillosas y pupila elíptica vertical [11,12]. Las especies representativas en Colombia son *Bothrops asper* y *Bothrops atrox*.

Los venenos de las serpientes contienen una variedad de elementos no proteicos y proteicos. Dentro de los primeros están Zinc, Calcio, Magnesio, Potasio, Sodio, Fosforo, Hierro, Cobalto, Níquel, Sulfatos, cloratos y fosfatos entre otros, siendo relevantes en la toxicidad, el Zinc para la actividad anti colinesterasa; el calcio genera reacciones inflamatorias [13], igualmente hay péptidos de estructura primaria ricos en prolina, glicoproteínas, fosfatidil colina y aminas biogénicas. Dentro de las aminas aisladas son relevantes las asociadas al dolor, edema e hipotensión, tales como histamina, bradiquinina, serotonina y acetilcolina entre otras [13,14,15].

A nivel de compuestos proteicos contienen una gran variedad de enzimas proteolíticas, algunas de acción inespecíficas como las endopeptidasas que afectan proteínas generales a nivel tisular y del sistema circulatorio y otras específicas que incluyen una serie de proteasas de alto grado de afinidad y especificidad a nivel de la coagulación como serino y metaloproteinasas, fosfolipasa A₂ y L-aminoácido-oxidasas [16]. El efecto coagulante produce micro coágulos de fibrina que se depositan en los capilares pulmonares, tubo digestivo y riñón generando necrosis isquémica y coagulación intravascular diseminada (CID) en pulmones, hígado y riñón. Por otro lado, el efecto anticoagulante, contiene diferentes proteínas y enzimas, tales como: fosfolipasas A₂ y lecitinasas, que actúan en la célula afectando la membrana celular, mitocondrias y la cadena de transporte de electrones. La hialuronidasa permite que el veneno se difunda más rápidamente por los tejidos. Entre las proteasas, se encuentran las hemorraginas que actúan sobre el endotelio vascular, ocasionando inicialmente un aumento en la permeabilidad y posteriormente una pérdida en la integridad del tejido, lo que lleva a una ruptura de los capilares; esto junto con las acciones de la enzima de tipo trombina, facilita el proceso hemorrágico [14,17,18,19].

La composición química de los venenos tiene un alto grado de complejidad y presenta variaciones intraespecie, polimorfismo en las enzimas que lo componen y variabilidad ontogénica [3]. Dicha variabilidad tiene implicaciones en el papel biológico de los venenos, en las características clínicas de los envenenamientos y en la selección de venenos que se utilizan en la inmunización de los animales para la producción de antídotos [14,15]. Por dicha razón, se ha sugerido que los diferentes antivenenos deben ser desarrollados con venenos propios de cada región [15].

Dentro de las alternativas para neutralizar la acción del veneno está la producción de los antivenenos específicos. Estos son considerados como terapia específica para el manejo del accidente ofídico y se definen como un producto cuya producción se basa en la inducción de inmunidad en un animal hospedero, una vez obtenido el suero hiperinmunizado purificado puede ser aplicado como antídoto en el paciente intoxicado con veneno de la serpiente [20,21].

Los antivenenos pueden clasificarse de acuerdo a su composición, proceso de producción y manufactura en primera generación compuestos por IgG y fracciones de albúmina, siendo estas las responsables de las reacciones alérgicas y la llamada enfermedad del suero, razón por la cual no se producen actualmente [22]. Los antivenenos de segunda generación son IgG purificadas; sin embargo, pueden conservar un 10% de fracciones proteicas de alto peso molecular, lo cual puede generar reacciones alérgicas [22]. Los de tercera generación y cuarta generación son llamados faboterápicos. Los antivenenos de tercera generación son antivenenos en la cual las IgG han sido enzimáticamente separadas y se ha obtenido los dos fragmentos F(ab)² de las mismas [22,23]. Actualmente se ha llegado a la producción de antivenenos de cuarta generación o faboterápicos monovalentes, en el cual el fragmento Fab es separado en sus fracciones monovalentes, tienen por ventaja un mayor volumen de

distribución en los tejidos, debido a su bajo peso molecular pueden llegar fácilmente a tejidos distales de difícil acceso, posee una vida media más corta comparado con los demás antivenenos y son fácilmente filtrados en riñón [23, 24, 25].

En la actualidad en Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) produce suero antiofídico polivalente, compuesto por inmunoglobulinas de origen equino con anticuerpos capaces de neutralizar el veneno de las serpientes de los géneros *Bothrops sp*, *Lachesis sp* y *Crotalus sp* [26]. Para neutralizar el veneno de las serpientes disminuyendo las reacciones de hipersensibilidad, se han desarrollado los antivenenos faboterápicos, una vez generados se requieren estudios de calidad del mismo, evaluando su caracterización, calidad microbiológica y capacidad neutralizante, razón por la cual se genera el presente estudio.

3.2. Antecedentes.

Los antivenenos faboterápicos incluyen faboterápicos de tercera y cuarta generación, están compuestos por el fragmento F(ab)² de la inmunoglobulina, resultante de la digestión pepsina de los anticuerpos, que carecen de las zonas efectoras de la molécula, pueden neutralizar el veneno y disminuir las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (anafilaxia) y de tipo tardío (enfermedad del suero) [22]. En Latinoamérica, México ha desarrollado faboterápicos contra el veneno de alacrán con los nombres de Alacramyn Faboterápico polivalente y faboterápico anti alacrán [27], se ha demostrado que dichos faboterápicos tienen mejor actividad neutralizante que los antivenenos completos, así como disminución de los efectos secundarios.

3.3. Vacío de conocimiento.

En la actualidad, se desconoce la calidad, eficacia y capacidad neutralizante de un antiveneno faboterápico artesanal elaborado con veneno de la especie *Bothrops asper* de Colombia, producto de una investigación previa de la Pontificia Universidad Javeriana, en colaboración con la Fundación Universitaria Agraria de Colombia

3.4. Pregunta de investigación.

¿Cómo es la calidad de un antiveneno faboterápico artesanal elaborado con veneno de la especie *B. asper* de Colombia?

4. OBJETIVOS.

4.1. General.

Evaluar la calidad de un antiveneno faboterápico artesanal elaborado con veneno de la especie *Bothrops asper* de Colombia

4.2. Específicos.

- Evaluar la capacidad neutralizante de las actividades coagulante, amiloidítica, proteolítica y hemolítica del antiveneno faboterápico artesanal elaborado con veneno de la especie *Bothrops asper* Colombiana.
- Determinar la dosis efectiva 50 del antiveneno faboterápico artesanal elaborado con veneno de la especie *Bothrops asper* Colombiana.

5. METODOLOGÍA.

Se evaluó la eficacia preclínica de un antiveneno de tercera generación, producido contra el veneno de la serpiente *Bothrops asper* colombiana. El ensayo constó de dos fases experimentales. Una fase inicial, realizada por el grupo de investigación en el cual se obtuvieron datos preliminares de las características del faboterápico o antiveneno de tercera generación, y una segunda en el cual se evaluó la eficacia de dicho antiveneno; fase efectuada para la presentación de este trabajo.

5.1. Fase 1 – datos preliminares previos – Obtención y caracterización del veneno

Ensayos preliminares se realizaron para obtener el antiveneno y posterior fracción faboterápica a partir de muestras de veneno de diversos individuos de ambos sexos de la especie *Bothrops asper*. A dicho veneno se le realizó una caracterización biológica y química, en la cual se determinó la concentración proteica de los venenos, su actividad coagulante y la actividad hemolítica indirecta, su actividad amilolítica y caseinolítica y se realizaron ensayos *In vivo* para establecer la letalidad de la mezcla de los venenos mediante la DL-50 (dosis Letal-50) en ratones BALB-C.

El antiveneno de primera generación – antisuero fue obtenido mediante inmunización de ejemplar equino adulto siguiendo las condiciones sugeridas en la Guía para la Producción, Control y Regulación de inmunoglobulinas y antivenenos contra serpientes [5] protocolos de inmunización planteados por De Roodt [24]. La obtención de la fracción proteica del antisuero y el faboterápico derivado fue realizada mediante una digestión proteica con pepsina y posterior purificación mediante Columnas de cromatografía de DEAE-Sepahora FF (2x18cm Pharmacia) y las fracciones de cromatograma fueron evaluadas mediante SDS-PAGE en gel 10% acrilamida bajo condiciones reductoras por el método de Laemmli, 1970 [27]. El faboterápico se conservó en alícuotas a -20°C para su uso en la fase experimental de esta investigación.

5.2. Fase 2 – Fase experimental - Evaluación de la eficacia del antiveneno y faboterápico

Con el fin de cumplir con los objetivos específicos propuestos en el presente trabajo, se evaluó la capacidad neutralizante del antisuero y del faboterápico mediante métodos *In Vivo* y métodos *In Vitro*. La caracterización *In vitro* incluyó 4 pruebas básicas, en la cual el veneno a una concentración de 3DL-50 fue mezclado con tres concentraciones diferentes de faboterápico, y a cada mezcla se le evaluó la capacidad de bloquear la coagulación, hemólisis y lisis de caseína y almidón. Todas las pruebas *In vitro* se realizaron por triplicado e incluyeron 5 grupos de estudio en el cual se verificó el efecto patológico coagulante, hemolítico o proteolítico sobre caseína y amiloides. Los grupos de análisis utilizados fueron: grupo control positivo correspondiente a veneno puro; Control negativo correspondiente al faboterápico; y tres grupos muestrales correspondiente las tres concentraciones diferentes de antiveneno/veneno (mezclas en proporciones de 1; 0,5 y 0,25 μL antiveneno/mg veneno usando una dosis reto calculada de 3DL50).

5.2.1. Pruebas *In vitro*

Para verificar el efecto de neutralización, los antivenenos y cada una de las 3 concentraciones diferentes de veneno se pre incubaron por 10 min a 37C. Y a partir de ese material preincubado de mezclas, se tomaron las alícuotas para realizar los diferentes ensayos para valorar la eficacia.

5.2.1.1. Determinación de la actividad coagulante - El ensayo se realizó con dos tipos de sustratos para coagulación: Plasma humano citratado y fibrinógeno bovino a una concentración de 5 mg/mL en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Para la técnica, 100 μl de cada una de las mezclas preincubadas con veneno y de los controles, fueron enfrentadas a 200 μl de sustrato para coagulación, incubándose las muestras hasta obtener coágulo total y se midieron los tiempos de coagulación en segundos. Una unidad de actividad de coagulación (U) se definió como la inversa del tiempo de coagulación en segundos [28] y la capacidad de neutralización se evaluó como porcentaje de inhibición, tomando como 100% de actividad procoagulante del control positivo.

5.2.1.2. Determinación de la actividad amiloidítica - se utilizó como sustrato 2 ml benzoil-arginil-p-nitroanilida (BApNA) 9×10^{-4} M, 0,6 ml buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 8,1 y 0,1ml de las mezclas veneno/faboterápico. Las mezclas se incubaron 37°C por 10 minutos deteniéndose la reacción con 0,6ml de ácido acético al 60% y se determinó la su actividad a 405 nm [29]. Una unidad de actividad (U) es expresada como μmoles de *p*- nitroanilida liberados por minuto.

5.2.1.3. Determinación de la actividad proteolítica/caseína - Para la inhibición de la actividad proteolítica sobre caseína se siguió la metodología propuesta por Wang y Huang 2002 [30] en el cual 45 μ l de antiveneno de cada grupo se colocaron a reaccionar ante 250 μ l azocaseína (5mg/ml) al 1 % en PBS pH 7.2, y se incubaron 37°C por 90 minutos. La reacción se detuvo con 600 μ l de Acido tricloroacético al 5%, dejándose 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada a 3000rpm por 5 minutos, y 400 μ l del sobrenadante se mezclaron con 400 μ l de NaOH 0,5M. La actividad de degradación del sustrato fue medida a absorbancia de 450nm en un espectrofotómetro contra un blanco de reactivos. La actividad proteolítica es expresada como el cambio en absorbancia a 450nm/90 minutos de incubación ($\Delta_{450}/90\text{min}$) y los resultados se analizan como porcentaje de inhibición, tomando como 100% de actividad proteolítica la del control positivo.

5.2.1.4. Determinación de la actividad hemolítica - La inhibición de la actividad hemolítica se realizó mediante el método de agarosa - yema de huevo – eritrocitos, descrito por Gutiérrez y colaboradores [31]. Las mezclas fueron depositadas sobre el Agar y después de 24 horas a 37°C se analizó la presencia de halo de hemólisis. Se definió como dosis hemolítica indirecta mínima del veneno, aquella que genera un halo de hemólisis de 20 mm de diámetro, después de 20 horas de incubación.

5.3. Pruebas In vivo

5.3.1. Prueba de Neutralización In Vivo: Para determinar la neutralización del veneno *In vivo*, se determinó la Dosis Efectiva 50 (DE50) con 5 diluciones de antiveneno utilizando 5 ratones para cada una, teniendo en cuenta la recomendación de neutralización teórica de los antivenenos comerciales para las especies de la familia *Viperidae* en Colombia. Las dosis fueron escalonadas con un factor secuencial desde 117.8 μ g hasta 131,7 μ g de antiveneno. Se realizó una mezcla con 3DL50 de veneno, las dosis de antiveneno descritas y NaCl al 0.85% para completar alícuotas de 0.2ml, que fueron preincubadas durante 30 minutos a 37 °C cantidad inoculada por vía intravenosa en la vena lateral de la cola, según lo recomendado por la Guía Mundial de Producción de Antivenenos. Luego de 24 h se registró el número de animales vivos por dosis evaluada. Se obtuvo una sobrevivencia de 0–100% con las dosis descritas y la DE50 se determinó de acuerdo al método de Spearman-Kärber y el Análisis estadístico se realizó en el programa Prisma 3.1 software combinado Prisma-StatMate (GraphPad Inc., San Diego, CA).

6. RESULTADOS OBTENIDOS

6.1. Fase 1 – Ensayo preliminar

6.1.1. **Caracterización del veneno** – En un trabajo previo se determinó que la cantidad de proteína del veneno por el método de Lowry fue del 96.1% [32] la electroforesis en SDS-PAGE según método de Laemli evidenció bandas en el rango de 15 a 50 Kda [3] la DL50 en ratones BALbc de 18-20gr fue de 42,7 µg [33]. La dosis letal 50 fue de 57,5µg/ratón (2,8±0,3mg/Kg).

6.2. Fase 2 – Fase experimental - Evaluación de la eficacia del antiveneno y faboterápico

6.2.1. Pruebas In vitro

La tabla ilustra los resultados obtenidos para cada una de las pruebas en cada uno de los grupos utilizados.

Grupo	Procoagulante		Amiloiditica U/mg	Proteolítica (U/mg)	Hemolítica %
	Plasma Humano U/mg	Fibrinógeno Bovino U/mg			
Control positivo (Veneno puro)	0,60	0,20	0,019	25.0	100
Control negativo (Faboterápico puro)	0.0	0.0	0,0	0.0	0
Muestra 1 (1ug Fab/mg Veneno)	0,0	0,0	0,0	0.5	0
Muestra 2 (0,5ug Fab/mg Veneno)	0,00	0,0	0,0	1.5	0
Muestra 3 (0,25ug Fab/mg Veneno)	0,01	0,00	0,0	2.5	2

6.2.1.1. Determinación de la actividad procoagulante – Los resultados mostraron que el veneno es capaz de tener una actividad procoagulante de 0,60 U/mg en plasma citratado humano y de 0,20 en fibrinógeno bovino, y los resultados obtenidos indican que éste fue totalmente efectivo en la neutralización de las

actividades, observándose solo un 1% de actividad a una concentración de 0,25ug de Faboterápico.

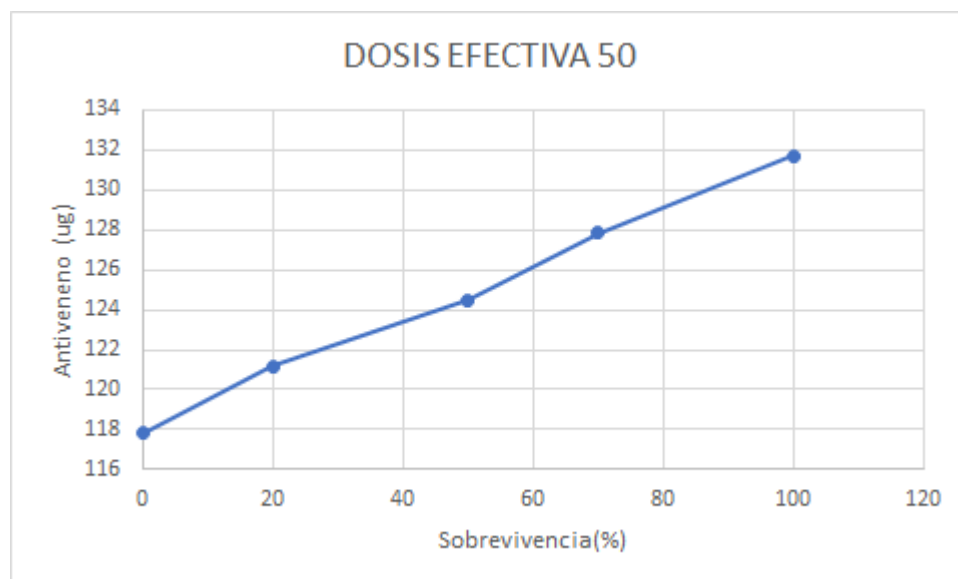
6.2.1.2. Determinación de la actividad amiloiditica – el control positivo – veneno puro es capaz de producir una actividad amiloiditica de 0,019U/mg la cual es inhibida en un 100% por las diferentes concentraciones de faboterápico utilizado.

6.2.1.3. Determinación de la actividad proteolítica/caseína – Los resultados evidenciaron que el veneno solo es capaz de tener una actividad de 25U/mg (100%) y esta se disminuye notablemente con las concentraciones del faboterápico usado, inhibiendo en un 90%(2,5U/mg) cuando se usa 0,25µg/mg y llegando a una inhibición del 98%(0,5U/mg) cuando se usa 0,25µg/mg .

6.2.1.4. Determinación de la actividad hemolítica – Los resultados mostraron que el efecto hemolítico indirecto inducido por el veneno fue neutralizado en un 100% a concentraciones de 0.5-1.0ug faboterápico y se inhibió en un 98% a 0.25ug/mg.

6.3. Pruebas In vivo

6.3.1. **Prueba de Neutralización In Vivo:** se encontró una capacidad neutralizante (DE50) de 124.5 µg (117.8-131.7) correspondientes a 3DL50 del veneno de la especie *Bothrops asper*.



7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Las serpientes del género *Bothrops* sp. causan altas tasas de mortalidad en gran parte de Norte y Sur América; registros hospitalarios indican que, en la región Amazónica de América Latina, aproximadamente 70,000 personas son mordidas por serpientes de este género [2]. Debido a las condiciones socioculturales y demográficas de Colombia, la mordedura de serpiente es de notificación obligatoria; aproximadamente el 66.8% de los casos de accidente ofídico en nuestro país son producidos por serpientes *Bothrops asper*., la mayoría de ellos se presentan en Antioquía, Bolívar y Santander [1]; sin embargo, muchos de estas de estas cifras subestiman la incidencia real del envenenamiento [34].

Actualmente los antivenenos se consideran el pilar en el tratamiento de la intoxicación por mordedura de serpiente debido a su eficacia en la neutralización de las toxinas de acción sistémica [35], existen diversas tecnologías para producir estos tratamientos, tales como, la digestión con pepsina, termo coagulación, cromatografía de intercambio iónico, precipitación con sulfato de amonio o ácido caprílico [34]. Para la evaluación preclínica del antiveneno se debe determinar tanto *in vivo* como *in vitro* la capacidad neutralizante de las actividades coagulante, amiloiditica, proteolítica o caseinolítica y hemolítica del faboterápico y la letalidad *in vivo* del producto [34].

La neutralización de la actividad coagulante del veneno depende de la presencia y acción de enzimas tales como trombinas y metaloproteinasas [15,36,37], como se puede observar en la **tabla 1** la actividad hemorrágica se vio neutralizada con la aplicación de 1µg y 0,5 µg del faboterápico tal como se presenta en [15], sugiriendo que la alta concentración y rápida aplicación de este antiveneno genera una mayor capacidad neutralizante de esta actividad, también que independiente de la mezcla de varios venenos de serpientes *B.asper*, el faboterápico elaborado pudo neutralizar esta actividad generada por la inoculación del veneno, afirmando un elevado título de anticuerpos contra las toxinas responsables de esta actividad [17]. Sin embargo, hay que tener presente que a una concentración de 0,25 µg de faboterápico se desarrolla 1% de dicha actividad; en un estudio desarrollado con venenos de *B. asper* de México y Costa Rica se puede concluir que la neutralización del antiveneno depende en gran medida de la naturaleza y acción de los componentes de los venenos que se utilizaron [36], así como a medida que la concentración de faboterápico aumenta la neutralización de la actividad se comporta de la misma manera; pero, en el

caso, del estudio realizado con *B. brazili* la neutralización parcial se da a la concentración más baja, siendo esto contrario a nuestro estudio [38]. La OMS, afirma que es necesario calentar (37°C) el antiveneno previa a la evaluación de la neutralización de la actividad, esto con el fin de simular la temperatura interna normal de los ratones BALB-C que se utilizaran para las pruebas *in vivo* [5], en el estudio realizado con el veneno de serpientes peruanas, se observó que en el momento del calentamiento, la capacidad neutralizante se vio afectada disminuyendo de 100% a 82%, sugiriendo que este producto puede ser afectado por la falta de una cadena de frío y para preservarlo se necesitan temperaturas menores a los 25°C [15].

Para el caso de la actividad amiloidítica se presenta un 100% de neutralización por parte del faboterápico, indicando que este posee una acción bloqueadora total de la actividad de la enzima kalikreina que es responsable del descenso brusco de la presión arterial ya que libera péptidos hipotensores como bradikina y calidina [15]. Tal como se puede observar con el antiveneno producido por el Instituto Nacional de Salud, luego de calentar a 37°C el suero se mostró una ligera pérdida de su actividad inhibitoria [15,37]. Como se ha mencionado la neutralización de la actividad amiloidítica se ve alterada por el elevado nivel de variación intraespecífica de los venenos utilizados, tal como se observó en [15]; en este caso al presentar una total neutralización de esta actividad se demuestra que estas variaciones no alteran el fin último de este antiveneno utilizado.

La neutralización de la actividad proteolítica o caseinolítica por parte de faboterápico no fue el 100% efectiva, como se puede observar a mayor concentración de faboterápico 1 µg se presenta un 95% de neutralización y a medida que la concentración del suero disminuye la neutralización de la actividad proteolítica es menor [39], siendo necesario confrontar concentraciones mayores a 1 µg de faboterápico para observar la total neutralización de esta actividad. La neutralización de esta actividad se ve alterada por la temperatura a la cual se sometieron las mezclas faboterápico/veneno, ya que varía de 59,6% a 95,6% de neutralización, esto debido a que cuando se someten las proteínas a temperaturas superiores a la óptima empiezan un proceso de pérdida de la actividad catalítica debido a la desnaturalización de las proteínas [40], aumentando la neutralización de esta actividad. Se ha observado que el variable contenido de proteasas podrían corresponder a las distintas estrategias de alimentación y sobrevivencia; en el caso de [15] se utilizaron

serpientes que se encontraban en cautiverio y con una alimentación monitoreada, siendo una posible causa de la neutralización total de esta actividad.

La actividad hemolítica es neutralizada en un 100% tanto 1 μg y 0.5 μg de la mezcla faboterápico/veneno, pero cuando esta concentración es igual o menor a 0.25 μg la neutralización se encuentra en un 98%, indicando un menor título de anticuerpos contra los constituyentes del veneno responsables de esta actividad [17]; este resultado podría considerarse de menor relevancia clínica, debido a la baja incidencia de este efecto *in vivo*, de acuerdo a algunos estudios es tan solo el 1% [17, 41]. Es necesario tener en cuenta que las distintas concentraciones de la fosfolipasa A_2 afectaría la neutralización de esta actividad [15]. Así mismo, para poder indicar la dosis mínima efectiva para neutralizar esta actividad es necesario incubar concentraciones entre 0.5 y 0.25 μg de la mezcla de faboterápico/veneno; afirmando que la actividad hemorrágica se puede neutralizar mediante la aplicación de faboterápicos [17][42]. Por otro lado, se obtuvo una dosis efectiva 50 de 124,5 μg (117,8 – 131,7) necesaria para neutralizar 3DL50 de veneno de la especie *Bothrops asper* tal como lo plantea la OMS [5], esta concentración se encuentra muy relacionada con la caracterización inicial del veneno utilizado, así como la neutralización de las actividades mencionadas anteriormente [43].

El rápido desarrollo de los efectos clínicos en los individuos mordidos por serpientes *Bothrops asper* hace que la neutralización *in vivo* de los antivenenos sea solo parcial; sin embargo, es importante que estos tratamientos desarrollen una capacidad neutralizante *in vitro* para demostrar así la reducción de las actividades de las toxinas responsables de las patologías, así como el daño local [44]. Tal como se observó en las distintas actividades evaluadas tanto con el veneno, el faboterápico y la mezcla de ambos no se generó una neutralización al 100% de estas, si bien se presenta un avance muy importante en cuanto a neutralización de venenos de serpientes, es necesario tener en cuenta que los antivenenos – faboterápicos deben ser seguros y efectivos para que puedan ser usados en humanos y animales. Finalmente, se sabe qué factores como la temperatura, el tiempo de aplicación de este suero y la cadena de frío al cual debe estar sometido, son factores importantes en cuanto a la neutralización de efectos secundarios; se propone que este suero sea liofilizado, si bien realizar este proceso es complejo por las condiciones necesarias, al encontrarse en esta presentación se puede prescindir de una cadena de frío y se aseguraría que la máxima capacidad neutralizante no se altere y sea eficaz en el

momento de aplicación de este suero, ya que muchas veces los accidentes ofídicos ocurren en zonas en donde tener una cadena de frío para estos productos es algo inasequible.

8. CONCLUSIONES

- El faboterápico artesanal presentó un 100% de neutralización de la actividad amiloidítica; para el caso de la actividad coagulante se observó una neutralización total con las concentraciones 1 y 0,5 µg de Fab/mg veneno, con la concentración de 0,25 µg de Fab/mg veneno la neutralización fue del 99%. Para la actividad hemolítica, las concentraciones de 1 y 0,5 de µg de Fab/mg veneno presentaron una inhibición total, pero para 0,25 µg de Fab/mg veneno fue del 98%. La neutralización de la actividad proteolítica se llevo a cabo entre un 95 a 99%.
- La dosis efectiva 50 del faboterápico necesaria para neutralizar 3DL50 es de 124,5 µg (117,8 – 131,7).
- El faboterápico artesanal elaborado con veneno de la especie *Bothrops asper* de Colombia, cumple con los requisitos de control de calidad necesarios para su producción.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud. Gobierno de Colombia [Internet]. Informe del evento de accidente ofídico 2019; [citado 16 Febrero 2019] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ACCIDENTE%20OF%20C3%8DDICO%202017.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Mordedura de serpientes venenosas; [citado 23 febrero 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
3. Terán M, Lomonte B. Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica, 37: 25-30,2016
4. Otero R, Silva J, Barona M, Toro M, Quintana J, Díaz A, Vásquez I. Accidente bothropico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri, un veneno polivalente producido en México, 20: 244-262,2007.
5. WHO [Internet]. WHO guidelines for the production control and regulation of Snake antivenom immunoglobulines. 2010; [citado 23 febrero 2018]. Disponible en: http://www.who.int/biologicals/ECBS_2016_BS2300_WHO_Guidelines_antivenom_clean1.pdf

6. Ministerio de Salud. Gobierno de Colombia [Internet]. Accidente Ofídico; [citado 23 febrero 2018]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/PServicios/Paginas/accidente-ofidico.aspx>
7. Ministerio de Salud. Gobierno de Colombia [Internet]. Informe del evento de accidente ofídico 2018; [citado 16 Febrero 2019] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2046.pdf>.
8. De serpientes. [Internet]. *Viperidae*; [citado 16 febrero 2019] Disponible en <https://deserpientes.net/viperidae/>
9. Yarlequé M, Ortiz C, Morante Y, Yarlequé A. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. 78: 27 – 36,2012
10. De serpientes. [Internet]. Elapidae – cobras, mambas y corales; [citado 16 de febrero 2019] Disponible en <https://deserpientes.net/elapidae/>
11. Serpentario Nacional de Colombia [Internet]. *Bothrops asper* (talla equis, pudridora o cuatronarices); [citado 20 abril 2018]. Disponible en: <http://www.serpientesdecolombia.com/bothrops-asper-talla-equis-pudridora-o-cuatronarices/>
12. Serpentario Nacional de Colombia [Internet]. *Bothrops atrox* (mapaná, mapanare, marba amarilla, pudridora); [citado 20 abril 2018]. Disponible en: <http://www.serpientesdecolombia.com/bothropsatrox-mapana-mapanare-barba-amarilla/#1483904926213-c5a46caa-de09>
13. Soler D, Rodríguez D. Aspectos Toxinológicos Y Clínicos De La Mordedura Por Serpientes Venenosas En Animales Domésticos. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 53:105-115, 2006
14. Sánchez E, Girón M, Guerrero B, Uzcátegui N, Rodríguez A. Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops Colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. 67: 213-230,2015.
15. Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yarlequé A. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “jergón”, de tres zonas geográficas del Perú. 29: 198-205, 2012.
16. Sarmiento K. Aspectos biomédicos del accidente ofídico. Uni Méd Bogotá. 53: 68-85, 2012.
17. Duque C, Fernández I, Vargas A, López J, Scannone H. Caracterización toxinológica del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, endo Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. 24: 355-362, 2014

18. Sousa S, Tomy S, Tavares F, Navajas L, Larsson M, Lucas S, Kogika M, Sano-Martins I. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Human & Experimental Toxicology*. 22: 491-500, 2003
19. Felicori L, Souza C, Velarde D, Magalhaes A, Almeida A, Figueiredo S, Richardson M, Diniz C, Sanchez E. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. *Protein Expression & Purification*. 30: 32-42, 2003.
20. Zuluaga O, Urán J, Villa J. Protocolo De Atención Prehospitalaria Para El Manejo Integral Del Accidente Ofídico Bothrópico En Colombia. Universidad CES. 1-43, 2013.
21. Bergillos F. Picaduras y mordeduras de animales: Tratado de toxicología clínica. 2: 631 – 640, 2013.
22. Cano A. Anticuerpos terapéuticos: el caso de los antivenenos. Instituto de Biotecnología, UNAM. 2001.
23. Vázquez H, Olvera F, Alagón A, Sevcik C. Production of anti-horse antibodies induced by IgG, F(ab')₂ and Fab applied repeatedly to rabbits. Effect on antivenom pharmacokinetics. *Toxicon*. 76: 362-369, 2013.
24. Roodt R, Litwin S, Estevez J, Gould E, Dolab J, Gould J. Comparación entre dos métodos de producción para la elaboración de antivenenos ofídicos. 18:10-20. 2010.
25. Instituto Nacional de Salud [Internet]. Inserto Suero Antiofídico Polivalente. 2017; [citado 16 febrero 2019]. Disponible en <https://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Produccion/SiteAssets/Paginas/suero-antiofidico-polivalente/Inserto%20Suero%20Antiof%3%ADdico%20Polivalente.pdf>
26. Luján B, Riaño L, Possani L. Bancos de anticuerpos recombinantes de origen humano: una fuente ideal de anti-venenos modernos contra la picadura de alacrán. *Revista Digital Universitaria*. 15: 1-14, 2014.
27. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
28. Yarlequé A, Campos S, Escobar E, Lazo F, Sanchez N, Marsh N, *et al*. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). *Toxicon*, 27:1189-1197,1989.
29. Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*, 95: 271-278,1961.
30. Wng WJ, Huang TF. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thromb Haemost*, 87:641-650,2002.
31. Gutierrez J, Avila C, Rojas C, Cerdas L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 26: 411-413, 1988.

32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biochem*, 193:165-275, 1951.
33. WHO [Internet]. Blood products and related biologicals, Snake Antivenom Immunoglobulins. 2010.
34. Garcia P, Yarlequé A, Bonilla C, Pessah S, Vivas D, Sandoval A, Lazo F. Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno botrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25:386-390, 2008.
35. Abdel S, Wanas S, Abdel G, Helmy M. Efficacy of IgG, Fab, and F(ab')₂ fragments of horse antivenom in the treatment of local symptoms after *Cerastes cerastes* (Egyptian snake) bite. *African Journal of Biotechnology*, 2: 189-193, 2003.
36. Segura A, Herrera M, Villalta M, Vargas M, Uscanga A, Ponce L, Gutiérrez J. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon*, 59: 158-162, 2012
37. Yarlequé A, Vivas D, Inga R, Rodríguez E, Sandoval G, Bonilla C, Pessah S. Acción del antivenenos botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25: 169-173, 2008.
38. Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez J. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Trópica*, 93: 85-95, 2005
39. Lomonte B, Gutierrez J. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Bio Trop*, 31: 37-40, 1983.
40. López A, Luna C, Buenrostro F, Hernández R, Huerta S, Escalona H. Efecto del pH, temperatura y fuente de proteína y carbohidratos en la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* en cultivo sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15: 1-10, 2016.
41. Hadd J. Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Mem Inst. Butantan*, 44: 403-423, 1981.
42. Rojas G, Gutierrez J, Gené J, 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. *Biol Trop*, 35: 59-67, 1987.
43. Ferreira M, Moura A, Franca F, Cardoso J, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*, 30: 1603-1608, 1992.
44. Otero R, Núñez V, Barona J, Díaz A, Saldarriaga M. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *IATREIA*, 15: 5-15, 2002.

