

Universidad de Costa Rica

Facultad de Microbiología

**Neutralización de los efectos locales generados por el veneno de la
serpiente Terciopelo (*Bothrops asper*), mediante la aplicación en forma
local de mezclas de antivenenos (IgG y Fab) y el agente quelante
CaNa₂EDTA**

Trabajo de investigación presentado como co-requisito del curso MC-2601 para optar por
el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica

Gilbert David Loría Masís

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

2000

A mis padres con amor (QdDg).

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento más profundo al Dr. Fernando Chaves Mora quién me guió durante el desarrollo práctico de este trabajo de una manera muy especial, brindándome desde el inicio su sincera amistad y guía académica.

A todo el personal del Instituto Clodomiro Picado que de una u otra manera colaboraron brindándome consejo, ayuda y amistad.

A mi familia por ser comprensivos, por brindarme su cariño que fue clave para el éxito de este trabajo.

A Adriana, por estar siempre a mi lado entregándome su cariño incondicional.

Al creador, sin el cuál nada hubiese sido realizado.

Este trabajo de investigación fue evaluado como co-requisito del curso MC-2601 para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica de la Universidad de Costa Rica por el comité responsable.

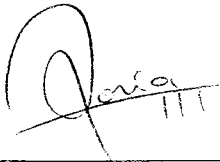


Dr. Fernando Chaves Mora. MQC, M.Sc.

Tutor

Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez. MQC, Ph.D.

Revisor



Gilbert David Loria Masís.

Candidato

INDICE

Portada	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	iv
Indice	v
Resumen	vii
CAPITULO I INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CAPITULO II ANTECEDENTES	4
2.1. El accidente ofídico	4
2.2. Los venenos	4
2.2.1 Toxinas del daño tisular local	7
2.2.1.1. Hemorragia y toxinas hemorrágicas	7
2.2.1.2. Mionecrosis y miotoxinas	9
2.2.1.3. Edema y toxinas inductoras de edema	14
2.3. Marcadores del daño local	15
2.4. CaNa ₂ EDTA como agente inhibidor de toxinas hemorrágicas	16
2.5. Terapia antiofídica	16
2.5.1. Biodinámica de la neutralización toxina-anticuerpo	17
2.5.2. Antivenenos	18
2.5.2.1. Producción de un suero antiofídico	20
2.5.2.2. Antivenenos constituidos por moléculas F(ab') ₂	21
2.5.2.3. Antivenenos constituidos por moléculas Fab	21
CAPITULO III MATERIALES Y METODOLOGÍA	23
3.1. Veneno	23

3.2. Plasma de carnero	23
3.3. Reactivos	24
3.4. Neutralización de la actividad hemorrágica en piel	24
3.5. Determinación de la concentración óptima de CaNa_2EDTA a utilizar	25
3.6. Neutralización de la actividad hemorrágica en músculo	25
3.7. Inhibición de la actividad mionecrótica	26
3.8. Análisis estadístico	26
CAPITULO IV RESULTADOS	27
4.1. Neutralización de la actividad hemorrágica en piel	27
4.1.1. Determinación de la dosis efectiva 50% (DE_{50})	27
4.1.2. Comparación de la neutralización de la actividad hemorrágica en piel de los antivenenos	27
Figura 1	28
4.2. Determinación de la concentración óptima de CaNa_2EDTA a utilizar	29
Figura 2	30
4.2.1. Acción del CaNa_2EDTA	31
Figura 3	32
4.3. Neutralización de la hemorragia en músculo utilizando sueros y mezclas	33
Figura 4	34
4.4. Inhibición de la actividad mionecrótica	35
Figura 5	36
CAPITULO V DISCUSIÓN	37
REFERENCIAS	40

RESUMEN

En este trabajo se estudio la capacidad neutralizante de los efectos locales inducidos por el veneno de *B. asper*, mediante la utilización de diferentes moléculas (Fab, IgG y CaNa₂EDTA), inyectadas independiente en el sitio de la aplicación del veneno.

La actividad antihemorrágica en piel demostrada por las dos moléculas de anticuerpo (IgG y Fab) no demostraron presentar diferencia alguna y al ser aplicadas 5 minutos después de la aplicación del veneno la neutralización se vuelve nula.

El CaNa₂EDTA demostró ser un agente muy efectivo en la neutralización de la hemorragia en músculo al ser aplicado de inmediato a concentraciones de 0.5 y 1 M, siendo esta última dosis la que demostró mayor actividad. A pesar de esto ya para cuando el CaNa₂EDTA 0.5 M es aplicado pasados 15 minutos la hemorragia no se ve disminuida en absoluto.

La hemorragia en músculo expresada en mg. de hemoglobina por gramo de músculo demostró ser una determinación más representativa del daño generado. Al comparar por este método la actividad antihemorrágica de las moléculas de anticuerpo (Fab y IgG) así como mezclas de estas con el CaNa₂EDTA, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre ellas a ninguno de los tres tiempos probados (0, 5 y 10 min.). No obstante sí se apreció una respuesta dependiente del tiempo de aplicación del antiveneno en cada uno de los intervalos evaluados.

La determinación de la enzima creatina quinasa como marcador de la mionecrosis, utilizada para analizar la capacidad neutralizante de las moléculas y mezclas antes mencionadas, demostró que hay diferencia ($p > 0.05$) entre la utilización del Fab y la IgG siendo la primera más efectiva para neutralizar este efecto local tanto a los 0 como a los 5 minutos. Además se observó una respuesta dependiente del tiempo de aplicación del antídoto. Las mezclas con CaNa₂EDTA más bien demostraron claramente generar mayor

liberación de la enzima. A pesar que el CaNa_2EDTA demostró ser efectivo en la neutralización de la actividad hemorrágica el efecto mionecrótico más bien se ve aumentado por su utilización.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Los sueros antiofídicos, desde su concepción hace más de 100 años, por el que hoy día se considera su padre Albert Calmette, siguen siendo el único tratamiento específico para el envenenamiento por la mordedura de serpiente (Bon, 1995).

Existen alrededor del mundo, cientos de especies de serpientes venenosas capaces de generar algún daño e incluso la muerte al ser humano. Se calcula que anualmente causan más de 50 000 muertes, principalmente en la mayoría de los países tropicales y subtropicales (Warrel, 1995). En nuestro país es considerado un problema de importancia médica, donde la gran mayoría de los envenenamientos son debidos a una especie de la familia Viperidae denominada *Bothrops asper*.

La efectividad de la seroterapia depende de una serie de procesos, como por ejemplo el secuestro, la extracción-redistribución y eliminación de las toxinas por parte de los anticuerpos u otras moléculas. La relación entre el volumen de distribución del anticuerpo o sus fragmentos y las toxinas del veneno, pueden ser extremadamente variables dependiendo de su masa molecular relativa y del intervalo de aplicación del suero, esto nos orienta a pensar en las ventajas de utilizar fragmentos en lugar de las inmunoglobulinas completas (Scherrmann & Pepin, 1995).

Otra ventaja que presenta el péptido Fab sobre la inmunoglobulina completa es el hecho de que al carecer de la fracción constante (Fc) la vuelve menos inmunoreactiva, generando con ello menor frecuencia de reacciones adversas, pero con la desventaja de que es mucho más rápidamente eliminada por el riñón (Theakston, 1995).

Los fragmentos Fab al ser comparados con la IgG completa poseen una mayor resistencia a la desnaturalización por el calor, permitiendo su pasteurización lo que

resultaría en un producto de mayor bioseguridad, al reducir la contaminación por patógenos en el suero (Landon & Smith, 1995).

El daño local ocasionado por el envenenamiento es una de las principales causas de morbilidad e incapacidad generadas, quizás debido a que el suero antiofídico neutraliza solo parcialmente estos efectos, primero porque la aplicación del suero se lleva a cabo generalmente en un centro de salud a horas del sitio del accidente, y segundo por el tiempo que este dura en difundir hasta el sitio de la mordedura. Debido a esto, se podría pensar que una solución al problema sería la aplicación en el sitio anatómico de la mordedura, de suero antiofídico u otros compuestos que inhiban los daños locales.

Aún más interesante resultaría la posibilidad de utilizar un fragmento de la inmunoglobulina como el Fab, el cual nos va a dar la ventaja de difundir más rápidamente si es aplicado prontamente sobre el tejido lesionado, además, de que por su baja inmunogenicidad aminoraría el riesgo de generar una reacción adversa, la cual sería peligrosa sobre todo si se encontrase el paciente lejos de un centro de salud que le brinde un tratamiento eficaz en caso de una complicación.

Por otra parte, se tienen evidencias de que las toxinas hemorrágicas presentes en el veneno, las cuales son metaloproteinasas zinc dependientes, y que son responsables de una gran parte del daño generado, son inhibidas por agentes quelantes, como el EDTA. De tal forma que una aplicación local de este agente, disminuiría considerablemente los efectos patológicos asociados a estas toxinas.

Cada una de estas opciones representarían una alternativa terapéutica más para solucionar el problema del ofidismo de una manera fácil y económica mediante la formulación de un paquete de primeros auxilios eficaz, estable y seguro.

Objetivo general

Analizar la posibilidad de utilizar, de manera local en el sitio de la mordedura, sueros antiofídicos y otras sustancias, para lograr minimizar los efectos generados por el envenenamiento.

Objetivos específicos

Estudiar la inhibición de las actividades hemorrágica (en piel y en músculo) y mionecrótica del veneno de terciopelo, mediante la inyección local, en el sitio de la mordedura de las diferentes sustancias.

Analizar el grado de inhibición alcanzado por cada uno de los sueros y compuestos dependiendo del tiempo de aplicación del antídoto.

Investigar la capacidad de un agente quelante como el CaNa_2 EDTA para neutralizar las toxinas hemorrágicas presentes en el veneno, las cuales son metaloproteinasas zinc-dependientes.

Comparar los resultados obtenidos para determinar si existe alguna diferencia en la farmacocinética de los diferentes compuestos, debido a la diferencia de masa molecular que presentan sus constituyentes.

Analizar la posibilidad de la formulación de un equipo de primeros auxilios (aplicación pronta en el sitio del accidente), para lograr aminorar la pérdida de tejido y las secuelas generadas a nivel local por el veneno.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. El accidente ofídico

El envenenamiento que se da como resultado de la mordedura de una serpiente venenosa puede ser muy variado, es capaz de llegar a generar daños severos e incluso la muerte. Este problema de salud se presenta principalmente en las regiones tropicales y templadas, así como en los océanos calientes, donde se ubican en su mayoría naciones subdesarrolladas (Warrel, 1995).

Existen cuatro familias de serpientes venenosas –Atractaspididae, Viperidae, Elapidae y Hydrophiidae- con cerca de 500 especies, de las cuales menos de 200 han sido reportadas con capacidad de provocar un envenenamiento severo en humanos. Estas se pueden encontrar distribuidas desde el nivel del mar, hasta altitudes superiores a los 5 000 metros sobre el nivel del mar (*Agkistrodon/Gloydius himalayanus*) (Warrel, 1995).

Swaroop y Grab (1954) realizaron el único análisis estadístico de los datos de muertes causadas por mordeduras de serpientes desde una perspectiva global, reportando una estimación de 30 000-40 000 muertes al año, con las más altas cifras reportadas para Asia (25 000-30 000) y América Latina (3 000-4 000). La incidencia mundial de mordeduras de serpientes se estimó en 500 000 al año. Reportes más recientes indican que la mortalidad continua elevada. Warrel y Fenner (1993) estimaron en 20 000 las muertes anuales por mordeduras de serpiente en India, y en 50 000 a 100 000 las muertes anuales en el mundo (Lomonte, 1994).

Más recientemente Chippaux estimó en 1998, que anualmente ocurren 2 682 500 envenenamientos por mordeduras de serpientes en el mundo, con un total estimado de 125 345 muertes (Gutiérrez *et al.*, 1999).

Debido a esto, el envenenamiento por mordeduras de serpientes en Centroamérica constituye un problema de salud pública sumamente importante, en donde la mayoría de los accidentes están dados por especímenes de las familias Hydrophiidae, Elapidae y Viperidae, esta última es la familia más importante desde el punto de vista médico en la cual se incluyen a los géneros *Crotalus*, *Lachesis*, *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Cerrophidion* y *Porthidium*.

La especie responsable de la mayor cantidad de accidentes en Centroamérica es la *Bothrops asper*, con excepción de El Salvador donde es predominante la especie *Crotalus durissus durissus*.

La especie *B. asper* se distribuye en regiones tropicales húmedas, tanto en bosque primario como en regiones alteradas de uso agrícola o ganadero. En Costa Rica se estima que alrededor del 50% de los accidentes ofídicos son causados por esta especie, y una situación similar se da en Panamá, Nicaragua, Honduras, Guatemala y Belice. Otras especies que causan mordeduras con relativa frecuencia son *Porthidium nasutus*, *C. durissus* y las especies arborícolas del género *Bothriechis*. Mientras tanto el género *Micrurus* es responsable de apenas el 1% del total de mordeduras (Gutiérrez, 1999; Arroyo, Rojas & Gutiérrez, 1999).

2.2 Los venenos

Las especies pertenecientes a la familia Viperidae poseen dos glándulas de veneno especializadas, colocadas en la parte superior de la cabeza, las cuales son productoras de una secreción digestiva tóxica compleja o veneno, que está compuesto por proteasas,

fosfolipasas, hialuronidasas, nucleasas y otras proteínas (con o sin actividad enzimática), así como péptidos, iones y aminoácidos, entre otros componentes (Chaves, 1992).

Dichos componentes pueden generar una amplia variedad de actividades farmacológicas y tóxicas. Históricamente, los venenos de una familia pueden ser clasificados de acuerdo con su principal actividad farmacológica como neurotóxicos, hemotóxicos y hemorrágicos, entre otras.

Esta clasificación es muy simplista, y falla en representar la complejidad de las actividades de los venenos y su heterogeneidad entre las diferentes especies de una misma familia.

Las diferentes actividades de un veneno pueden frecuentemente ser atribuidas a un componente particular o toxina, aunque también es posible que varios componentes actúen sinérgicamente en la inducción de un efecto dado o incluso, que una toxina contribuya en más de una actividad (Lomonte, 1994).

El veneno de *B. asper* induce un cuadro clínico muy complejo y variado, debido a la variedad de componentes presentes. Dentro de las principales características que se han observado en el sitio de la inyección del veneno se encuentra una respuesta inflamatoria aguda, edema prominente, equimosis, flictenas hemorrágicas, lesiones vasculares y una necrosis muscular drástica (Chaves, 1992).

Por otro lado, los efectos sistémicos incluyen hemorragias en diferentes tejidos y órganos, hemólisis intravascular, alteraciones en la coagulación, choque cardiovascular e insuficiencia renal (Chaves, 1992).

2.2.1 Toxinas del daño tisular local

En la literatura actual se considera que, el daño tisular local es resultado de la actividad de tres componentes principales presentes en el veneno, a saber toxinas hemorrágicas, miotoxinas y toxinas formadoras de edema (Lomonte, 1994).

2.2.1.1 Hemorragia y toxinas hemorrágicas

La hemorragia ha sido uno de los efectos inducidos por venenos que ha recibido más atención, tanto a nivel clínico como experimental (Chaves, 1992; Franceschi, 1999).

Muchas toxinas capaces de inducir hemorragia en el sitio de inyección o a distancia han sido purificadas, siendo en su totalidad proteínas, cuya mayoría pertenece a la familia de las metaloproteinasas cuya actividad depende de Zn^{2+} .

Los venenos de vipéridos poseen un alto contenido de metaloproteinasas dependientes de zinc, las cuales presentan similitud estructural y funcional con las metaloproteinasas de matriz extracelular. Hasta 1995 se habían aislado y caracterizado 102 metaloproteinasas de venenos de 35 especies de serpientes, de las cuales cerca de 70 de ellas poseen actividad hemorrágica comprobada. Estas toxinas son, en su mayoría, glicoproteínas de carácter ácido o ligeramente básico, con pesos moleculares que oscilan entre 20 y 100 kDa. (Bjarnason & Fox, 1995).

Todas estas toxinas demuestran grados variables de actividad proteolítica *in vitro*, sobre sustratos como la caseína, dimetilcaseína, la cadena β de la insulina, “hide powder azure”, entre otros (Lomonte, 1995; Franceschi, 1999).

En los últimos años, las secuencias parciales y totales (de la proteína o de su ADNc) de algunas de las metaloproteinasas de venenos de serpientes han sido determinadas, lo cual ha permitido proponer un esquema de clasificación.

Según la secuencia de nucleótidos del ADNc, las metaloproteinasas aisladas de venenos de serpiente se pueden clasificar en cuatro clases definidas. La clase N(nucleótidos)-I agrupa a aquellas que a nivel del ARNm codifican por una secuencia señal, por una pro-enzima y por una secuencia metaloproteinasa.

La clase N-II, agrupa aquellas toxinas cuyo ARNm codifica por la misma información que el ARNm de las N-I y una secuencia adicional conocida como “tipo disintegrina”. ARNm que codifican para proteínas con una secuencia señal, una pro enzima, la secuencia metaloproteinasa, la secuencia “tipo disintegrina” y una secuencia rica en cisteínas, se incluyen dentro de la clase N-III. Una cuarta clase de metaloproteinasas, la N-IV incluyen en su ARNm una secuencia extra conocida como dominio tipo lectina (Bjarnason & Fox, 1994; Franceschi, 1999).

De igual manera, las metaloproteinasas de venenos de serpientes se clasifican de acuerdo con su secuencia de aminoácidos en cuatro grupos básicos de P-I a P-IV. P-I incluye proteínas pequeñas de pesos moleculares entre 20 y 30 kDa, las cuales poseen únicamente un dominio catalítico con una región conservada de unión al zinc. Proteínas con pesos moleculares intermedios (30 a 50 kDa) se incluyen dentro del grupo P-II las cuales poseen además del dominio metaloproteinasa el dominio “tipo disintegrina”.

P-III agrupa aquellas proteínas con los dominios antes mencionados junto con un dominio adicional en el extremo carboxilo rico en cisteínas y cuyos pesos moleculares van desde los 50 hasta los 80 kDa. Proteínas con estructura similar a estas pero cuyos pesos moleculares van por arriba de los 80 y hasta los 100 kDa debido a un dominio tipo lectina adicional pertenecen al grupo P-IV (Franceschi, 1999).

Los venenos de *Bothrops sp.* son ricos en metaloproteinasas dependientes de zinc las cuales al degradar enzimáticamente componentes de la lámina basal de los capilares inducen hemorragia. Esta acción afecta la interacción de la lámina basal con las células endoteliales lo que trae como consecuencia el desarrollo de lesiones en dichas células que

eventualmente causan la aparición de rupturas en su continuidad, a través de las cuales ocurre extravasación. Es posible, por estudios *in vitro*, que factores hemodinámicos sean responsables de dichas alteraciones (Gutiérrez *et al.*, 2000).

2.2.1.2 Mionecrosis y miotoxinas

Miotoxinas son aquellas toxinas que inducen la degeneración de las células del músculo esquelético, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en los venenos de serpientes.

Los daños ocasionados al músculo esquelético son, en la mayoría de los envenenamientos, irreparables, y clínicamente este efecto causa las secuelas más importantes del accidente ofídico inducido por serpientes de la familia Viperidae (Chaves, 1992).

Las toxinas que generan daño muscular han sido clasificadas dentro de dos a cuatro grupos según el investigador. Dentro del grupo 1 vamos a encontrar a las miotoxinas pequeñas, altamente básicas que no poseen actividad enzimática conocida, las cuales están constituidas por una cadena simple de 42 a 45 aminoácidos.

Los cambios histopatológicos tempranos del músculo esquelético expuestos a estas toxinas incluyen una vacuolización que progresa hasta la necrosis a las 48 horas después de la inyección. Esta vacuolización parece estar dada por la dilatación del retículo sarcoplásmico y del espacio peri nuclear.

El mecanismo molecular de acción de estas toxinas no se conoce completamente, pero con la crotamina del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laure, 1975) y la miotoxina *a* de *C. viridis viridis* (Ownby *et al.*, 1978; Cameron & Tu, 1977) se ha demostrado que actúan sobre el canal de Na⁺, aumentando la permeabilidad de la

membrana a este ión, ocasionando con esto una entrada de agua la cual podría causar el hinchamiento del retículo endoplásmico, y eventualmente, la necrosis de la célula muscular.

Otro mecanismo propuesto es, que estas miotoxinas actúan directamente sobre el retículo endoplásmico, basados en evidencia *in vitro* de que interactúan con la ATPasa del retículo sarcoplásmico (Volpe *et al.*, 1986), pero no han sido reportadas evidencias de la internalización de la miotoxina por parte de las fibras musculares intactas que respalden esta hipótesis.

Dentro del grupo 2 podemos encontrar a las denominadas cardiotoxinas, también conocidas como citotoxinas, toxinas de membranas y factores líticos directos. Son un grupo de proteínas básicas de 60 a 62 aminoácidos, sin ninguna actividad enzimática conocida, y estructuralmente homólogas a las neurotoxinas post-sinápticas o α -neurotoxinas. Su estructura tridimensional es básicamente similar a una α -neurotoxina a pesar de sus diferentes actividades biológicas.

El nombre cardiotoxina se origina de su habilidad de generar fallo cardiaco *in vivo* e *in vitro*.

Estudios microscópicos de tejidos después de la inyección de cardiotoxina-1 de *Naja naja atra* revelan una prominente mionecrosis, con ruptura de la membrana plasmática en el área con lesiones de forma de cuña (lesiones delta), y condensación de las miofibrillas dentro de densas agrupaciones, alternadas con zonas claras conteniendo algunos elementos del sistema sarcotubular y mitocondrias dañadas. La lámina basal de las células musculares se observa intacta durante todo el proceso degenerativo.

Las bases moleculares de la acción citotóxica de las cardiotoxinas han sido estudiadas intensivamente, pero la naturaleza de su receptor de membrana o su sitio de unión no ha sido dilucidado.

El tercer grupo lo conforman las miotoxinas con actividad fosfolipasa A₂ (PLA₂) y las cuales pueden ser divididas dentro de dos grupos principales, las neurotóxicas y las no neurotóxicas.

Las fosfolipasas son proteínas que pueden ser de naturaleza acídica o básica que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo muy abundantes en los venenos de serpientes.

Las fosfolipasas A₂ dependen específicamente de calcio para ejercer su actividad enzimática, y actúan hidrolizando el enlace ester en la posición 2 de los glicerofosfatos produciendo de esta forma un ácido graso libre, que puede ser ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas y leucotrienos; además de un lisofosfolípido con actividad surfactante –lisolecitina- (Chaves, 1992).

a) miotoxinas fosfolipasa A₂ presinápticamente neurotóxicas

Algunas de estas toxinas han sido muy bien caracterizadas, las cuales demuestran una potente acción presináptica, lo cual se refleja en su alta actividad letal.

Estas toxinas inducen un prominente daño del músculo esquelético, los cambios morfológicos del daño muscular inducidos por ambos grupos de PLA₂ son generalmente similares.

La degeneración de las fibras musculares ocurre rápidamente. Las alteraciones iniciales que se presentan son la hipercontracción de sarcómeros y la aparición de lesiones en la membrana a manera de cuña (lesiones delta). La mitocondria también muestra signos de daño, como hinchazón, degeneración folicular y ruptura. La creatina quinasa y otras enzimas son rápidamente liberadas de las células dañadas, y sus elevaciones son detectadas en plasma (Lomonte, 1994).

El proceso degenerativo es acompañado por un edema temprano sin hemorragia y por un infiltrado de células fagocíticas, y al cabo de 12-24 hrs la fibra muscular está

completamente destruida. A través de todo este proceso la lámina basal se preserva intacta, como también la microvasculatura. Las células satélite localizadas entre la lámina basal y la membrana plasmática de la fibra muscular, también se encuentra sin daño alguno; esto es de relevancia ya que se considera que estas células son responsables de la formación de los mioblastos, miotubos y de la eventual regeneración del músculo esquelético después de la necrosis, si las condiciones son las adecuadas (Lomonte, 1994).

Los receptores y los mecanismos por los que estas fosfolipasas A_2 inducen la necrosis de la célula muscular, se mantienen sin aparente respuesta.

b) miotoxinas fosfolipasas A_2 no neurotóxicas

La carencia de neurotoxicidad se refleja en su baja actividad letal, y más bien se ha asociado con mioglobinuria y fallo renal.

Como se mencionó anteriormente los cambios morfológicos provocados por estas toxinas en el músculo dañado son similares a los generados por aquellas toxinas que poseen actividad neurotóxica.

Sin embargo se encuentran dos diferencias notables con las PLA_2 neurotóxicas en cuanto al daño del músculo; abriendo la posibilidad de que las miotoxinas no neurotóxicas pueden utilizar un mecanismo diferente para la miotoxicidad. Primero, para algunas miotoxinas de este grupo, se ha demostrado actividad citotóxica directa sobre células musculares inmaduras en cultivo celular en contraste con las neurotóxicas. Segundo, un número de variantes naturales de la toxina (isoformas) que se han encontrado, las cuales, mientras que claramente posee una estructura de PLA_2 , son incapaces de hidrolizar fosfolípidos, debido a cambios en los residuos de aminoácidos que son esenciales para los mecanismos catalíticos. A pesar de ello, estas isoformas mantienen la habilidad de dañar la célula muscular, con lo que queda claro que estas

miotoxinas no requieren de actividad catalítica para inducir la mionecrosis (Lomonte, 1994).

Con solo una excepción, todas las miotoxinas enzimáticamente inactivas que han sido secuenciadas, poseen un residuo de lisina sustituyendo una aspartato en la posición 49, y es por ello que se les conoce también como fosfolipasas A₂ Lys-49.

Poco progreso se ha logrado en cuanto al mecanismo de acción de este grupo de miotoxinas. Al igual que las neurotóxicas, el sitio de acción inicial se cree que es la membrana plasmática de las células musculares. Esto debido a que el análisis ultraestructural de las lesiones tempranas se observan rupturas o discontinuidades de la membrana muscular, segundo por el aumento de la concentración del calcio intracelular en el tejido muscular, por la inmunodetección de las miotoxinas en la membrana muscular, también por la habilidad de las miotoxinas de romper varios tipos de liposomas y finalmente por la incapacidad de los agentes bloqueadores de la endocitosis (cloruro de amonio y cloroquina) de detener el efecto citotóxico de las miotoxinas *in vitro* (Lomonte, 1994).

Interesantemente, se ha visto que los eritrocitos son resistentes a la acción de las miotoxinas PLA₂, tanto para las variantes Lys-49 como para las Asp-49. No obstante, si es posible inducir la hemólisis de los eritrocitos, si sus membranas son enriquecidas con fosfatidilserina, un fosfolípido cargado negativamente. La escasez de lípidos cargados negativamente en la parte externa de la membrana del eritrocito podría explicar su resistencia a la acción de las miotoxinas PLA₂, a la vez que podría explicar como estas toxinas utilizan a los lípidos cargados negativamente como sitios de unión (Díaz, 2000).

El cuarto grupo de factores miotóxicos, no actúa directamente sobre la fibra muscular para inducir su degeneración y posterior necrosis. En este grupo se incluyen toxinas que inducen un daño muscular local de una manera secundaria al daño a la microvasculatura, alteraciones del flujo sanguíneo y desarrollo de isquemia.

Aquí se suele incluir algunas toxinas hemorrágicas a las que se les suele atribuir cierto grado de daño muscular. La mionecrosis observada después de la inyección de estas toxinas aparece más lentamente que la generada por las miotoxinas, tomando a la isquemia como la causa de la degeneración muscular.

La morfología de las fibras musculares que han sido dañadas por toxinas hemorrágicas es diferente, muestran una apariencia más hialina, la cual es conocida como necrosis de tipo coagulativa (Lomonte, 1994).

2.2.1.3 Edema y toxinas inductoras de edema.

La inyección del veneno de *B. asper* despierta, en el músculo del ratón, una respuesta inflamatoria aguda, que incluye un edema prominente que alcanza su máximo nivel luego de una hora, y que podría contribuir con los procesos de isquemia y necrosis en el tejido muscular.

Se han formulado varias hipótesis que tratan de explicar el desarrollo del edema en casos de envenenamiento y aparentemente, este fenómeno puede ocurrir por a) acción de componentes del veneno que actúan directamente sobre los vasos sanguíneos, alterando la permeabilidad capilar, y permitiendo así una salida de fluidos hacia el espacio intersticial; este es el caso de las hemorraginas que degradan la laminina y el colágeno tipo IV de la lámina basal que rodea los capilares; b) indirectamente mediante la acción de productos farmacológicamente activos que permiten la liberación de sustancias autacoides como histamina, bradiquinina y serotonina; c) por síntesis de prostaglandinas y leucotrienos a causa de la liberación de ácido araquidónico a través de la acción de las fosfolipasas A₂ presentes en el veneno o en los tejidos afectados (Chaves, 1992).

Debido a que el edema inducido por los venenos de serpientes tienen un origen multifactorial, no es de esperar que un único inhibidor o droga sea capaz de neutralizar este efecto.

Entre los varios mecanismos descritos en la inducción del edema por componentes purificados del veneno están: la liberación de histamina/serotonina por degranulación de los mastocitos, reclutamiento y llegada de leucocitos polimorfonucleares con la formación de radicales superóxido, inducción de prostaglandinas y leucotrienos en los mastocitos, liberación de bradiquinina y otros péptidos vasoactivos diferentes de la bradiquinina, inducción de óxido nítrico por la estimulación del endotelio vía bradiquinina, potenciación de la bradiquinina por péptidos inhibidores de las enzimas convertasas de angiotensina, entre otros (Lomonte, 1994).

2.3 Marcadores del daño tisular local

Existen muchos métodos para evaluar la actividad miotóxica de un veneno o toxina, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Uno de los métodos más utilizados debido a su alta reproducibilidad, capacidad de cuantificación, sencillez y rapidez así como lo altamente representativos del daño muscular, es la cuantificación de marcadores bioquímicos de daño al músculo esquelético. Estos incluyen la determinación en plasma o suero de enzimas intracelulares específicas liberadas después del daño celular.

Su determinación se puede llevar a cabo por el aumento de su actividad en plasma o por disminución de la actividad en el contenido intracelular del tejido afectado.

Entre estas enzimas la creatina quinasa (CK; EC 2.7.3.2.) ha sido frecuentemente utilizada. Esta enzima se presenta como tres isoformas electroforéticamente diferentes, MM, MB y BB, las cuales son preferencialmente expresadas en el músculo esquelético, músculo cardíaco y sistema nervioso central respectivamente.

Cuando se utiliza la cuantificación de CK total en el análisis del daño al músculo esquelético dado por un veneno o toxina específica, es importante verificar que el incremento dado es por la isoenzima MM. También es importante seleccionar el tiempo óptimo de muestreo debido a que parámetros farmacocinéticos como la distribución y vida media pueden influenciar significativamente los resultados. No obstante Gutiérrez (1984), Melo & Suarez-Krutz (1988) y Chaves (1989) han demostrado que en general que el pico sérico de CK ocurre entre 1 y 3 horas después de la inyección y que caen rápidamente después de esto (Lomonte, 1994).

2.4 CaNa₂EDTA como agente inhibidor de toxinas hemorrágicas

El CaNa₂EDTA es un agente quelante de iones metálicos que ha demostrado ser, un potente inhibidor de las toxinas hemorrágicas de los venenos de serpientes, las cuales son metaloproteinasas zinc dependientes.

Varios compuestos sintéticos han sido estudiados en cuanto a su capacidad de neutralizar la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper*, algunos han sido más efectivos que el CaNa₂EDTA, como el Na₄EDTA el cual es capaz de inhibir la actividad hemorrágica a una concentración de 0.5 mM; mientras que el CaNa₂EDTA para lograr dicho efecto debe ser aplicado a una concentración tres veces mayor (1.5 mM).

No obstante, la mayoría de los compuestos son tóxicos *in vivo*, excepto el CaNa₂EDTA el cual es utilizado comúnmente como un agente para la preservación del sabor y color de algunos alimentos, el cual no presenta ninguna actividad tóxica evidente en ratones a dosis relativamente altas (0.15 M) (Borkow, 1997).

2.5 Terapia antiofidica

El descubrimiento de la terapia antiofidica puede ser colocado en 1894, cuando Albert Calmette se interesó en los envenenamientos en Viet Nan (hoy villa de Hô-Chi-

Minh) al ser enviado ha fundar el primer Instituto Pasteur fuera del continente europeo. El trabajo en la manera de detoxificar los venenos de las cobras para posteriormente inmunizar diferentes tipos de animales, publicando para esta fecha en la revista Annales de l' Institut Pasteur las bases de la terapia antivenenos.

La terapia antiofidica fue y sigue siendo hoy el único tratamiento específico contra el envenenamiento (Bon, 1995).

2.5.1 Biodinámica de la neutralización toxina-anticuerpo

La inmunotóxico-terapia se define como el simultáneo secuestro, extracción o redistribución y eliminación de una toxina por parte de sitios activos de unión de moléculas de anticuerpos. El fracaso en la terapia usualmente puede ser atribuido a uno de estas tres respuestas en la interacción antígeno-anticuerpo.

El secuestro de la toxina va a ser resultado de tres condiciones ha saber; primero, va a depender de los volúmenes respectivos de distribución de la toxina y el anticuerpo, segundo del tiempo en que alcancen el equilibrio en su espacio de distribución, y por último del número neto de ciclos que establezca el anticuerpo a través del intersticio y regiones celulares de cada órgano. El secuestro de la toxina ocurre en el espacio de distribución común al anticuerpo, y la distribución de la molécula neutralizante está limitada por la difusión la cual está extremadamente relacionada con la masa molecular respectiva. Los volúmenes de distribución de los sueros en humanos van desde los 5 (IgM y IgG) hasta los 30 litros (Fab), mientras que el de las toxinas puede variar desde los varios cientos de litros para aquellas de baja masa molecular, hasta únicamente el volumen de líquido extracelular en las de alta masa molecular

El equilibrio de la IgG y Fab₂ intravascular en el espacio intersticial requiere de 12 a 24 horas, mientras que la molécula Fab se distribuye en un volumen de distribución mucho mayor en menos de 4 horas. Esto hace que el Fab por su tamaño molecular sea un elemento más eficiente para el secuestro de toxinas ampliamente distribuidas.

Con esto, es de esperar que la preparación de fragmentos menores al Fab, como lo es el fragmento Fv llevarían a una más rápida y amplia distribución pero con una aclaración más rápida, lo que disminuiría los tejidos expuesto al anticuerpo.

La redistribución o extracción de la toxina ocurre en el espacio de distribución de la molécula neutralizante pero, además envuelve la distribución de las moléculas de toxina unidas al receptor hacia el espacio de distribución del anticuerpo. Por lo que dos factores limitantes son la unión irreversible de la toxina al receptor y la constante de disociación del complejo toxina-receptor.

La eliminación de la toxina se ve fuertemente modificada por el secuestro de la toxina. Aunque las toxinas que no se unen a los anticuerpos no modifican sus características de eliminación iniciales, las moléculas de toxina de bajo peso molecular adquieren las propiedades de eliminación de los anticuerpos.

El intestino, riñón, hígado, bazo y nódulos linfáticos son sitios potenciales para el catabolismo de los anticuerpos. El intestino es el sitio más eficiente, pero el riñón juega un papel importante, especialmente con moléculas que pesan menos de 60 kDa. Los fragmentos Fab circulantes son filtrados a través del glomérulo y son rápidamente reabsorbidos y catabolizados por las células del túbulo proximal.

La mayoría de la toxinas siguen la vía de aclaramiento extrarenal, la cual representa cerca del 60-70% del aclaramiento corporal total. Son aclarados principalmente por órganos con una alta permeabilidad capilar como el hígado y el bazo (Scherrmann & Pepin, 1995).

2.5.2 Antivenenos

Las cualidades esenciales de cualquier droga deben ser efectividad y seguridad, además de economía y fácil administración. La eficacia de una antiveneno está influenciada por muchos factores, es esencial entender que la unión de este a los

componentes del veneno, no necesariamente significa neutralización. Idealmente el antiveneno debe penetrar hasta el sitio de deposición del antiveneno y neutralizar sus componentes antes de que se produzca el daño local o se llegue a distribuir por la circulación sistémica. Un factor físico-químico que influencia la penetración es la pequeña masa molecular relativa.

Una vez que se han producido anticuerpos neutralizantes efectivos, la seguridad del producto se vuelve importante, estos no deben de producir reacciones agudas o retardadas, para ello es necesario purificarlos eliminando componentes del suero indeseables e innecesarios para neutralizar el veneno.

Los contaminantes entre los que se incluyen moléculas de IgM, albúmina y otros componentes del suero de caballos, son excelentes inductores de reacciones alérgicas, las cuales caen dentro de dos categorías: anafilaxis, una reacción de hipersensibilidad tipo I y la enfermedad del suero, una hipersensibilidad tipo III. Todos los sueros heterólogos son capaces de generar una reacción anafiláctica, una cascada de eventos que pueden producir una variedad de efectos incluyendo broncoconstricción e hipotensión. Este efecto ha sido reportado muchas veces desde que se inició con la administración de los antivenenos, aunque la incidencia exacta no se conoce bien probablemente ocurre en menos de una 15% de los casos, pero constituye el principal temor de los médicos con respecto al antiveneno (Dart & Horowitz, 1995).

El suero puede contener muchos componentes capaces de generar una reacción anafiláctica. En un individuo sensibilizado, las proteínas heterólogas son reconocidas y unidas a inmunoglobulinas. Las moléculas de IgE del individuo, se une a la superficie de mastocitos, jugando un papel central en el proceso. La unión de un antígeno por una IgE lleva a la unión cruzada de otra molécula de IgE en la membrana de un mastocito sensibilizado activándolo. Esto causa la degranulación del mastocito, generando una cascada de efectos que terminan en una respuesta inflamatoria inmediata. Esta reacción alérgica puede ser localizada o sistémica. Todo esto debido a que la molécula de IgE se une con una alta afinidad a los receptores del Fc en los mastocitos y neutrófilos.

Un proceso relacionado con este es la reacción anafilactoide. Este es un proceso por el cual los mastocitos son directamente estimulados a liberar los mediadores, por proteínas no neutralizantes como agregados de IgG o componentes como el complemento del suero inmune (Dart & Horowitz, 1995).

2.5.2.1 Producción de un suero antiofídico

Una vez que se tiene el veneno liofilizado es reconstituido en solución salina, mezclado con adyuvantes o potenciadores de la respuesta inmune e inyectado en animales, los cuales pueden ser caballos por su facilidad de manejo y los grandes volúmenes de sangría que permite. Cada animal se somete a un esquema de inmunización que dura aproximadamente 3-4 meses; durante este tiempo se inyecta cada 10 días dosis crecientes del veneno, por la vía subcutánea.

Al final del esquema de inmunización se realizan sangrías de prueba a cada animal con el fin de determinar si el título de anticuerpos neutralizantes es el adecuado. Si el título es satisfactorio se realizan sangrías de producción en recipientes estériles y utilizando un anticoagulante de citrato. Posteriormente se separan los glóbulos rojos del plasma, los cuales son retornados a los animales.

Son varios los métodos para la purificación de las inmunoglobulinas entre los que encontramos los procesos cromatográficos, y los de precipitación salina. Una nueva metodología utiliza la precipitación con ácido caprílico, proceso que permite obtener una mayor pureza y calidad. El suero obtenido así se ajusta a una potencia neutralizante estándar, decontaminado por filtración en membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm y posteriormente son envasados (Gutiérrez, 1999).

2.5.2.2 Antivenenos constituidos por moléculas F(ab')₂

El desarrollo de la tecnología desde hace más de un siglo cuando se empezó por primera vez a trabajar con la seroterapia, ha permitido llegar ha desarrollar sueros antiofídicos hiperinmunes, que desarrollan un mínimo de reacciones adversas de hipersensibilidad tipo I y III mediante la utilización de novedosos procesos de purificación, reduciendo la cantidad de proteínas heterólogas inyectadas, eliminando agregados y complejos inmunes y eliminando el fragmento Fc de la inmunoglobulina con el fin de reducir la activación celular y del complemento por complejos veneno-antiveneno formados de *novo*.

La digestión péptica remueve la región Fc de la inmunoglobulina y deja un fragmento de unión a antígenos denominado F(ab)₂, mucho más resistente a la desnaturalización por el calor que la inmunoglobulina completa y que otras proteínas del suero. (Grandgeorge, *et al.*, 1995) Alfred Nisonoff fue el primero en describir como la digestión leve de la inmunoglobulina G con la enzima pepsina genera en un único fragmento de 100 kDa compuesto de dos fragmentos Fab al cual denominó como F(ab)₂, los cuales son claramente capaces de precipitar antígenos y a la vez, posterior a la digestión el fragmento Fc no puede ser recuperado por ser digerido en múltiples fragmentos (Kuby, 1997).

2.5.2.3 Antivenenos constituidos por moléculas Fab.

Porter fue el primero en estudiar como la digestión leve de las inmunoglobulinas G con papaína, resultaba en la hidrólisis de solo las uniones más susceptibles produciendo dos fragmentos idénticos cada uno de 45 kDa llamados fragmentos Fab, los cuales conservan su capacidad de unión a antígenos, y otro fragmento de 50 kDa denominado Fc por su característica de cristalizar durante su almacenamiento en frío (Kuby, 1997).

Se considera que los fragmentos Fab, pueden constituir un mejor producto terapéutico debido a su gran volumen de distribución cuando se compara con la IgG y el fragmento F(ab)₂, y a su habilidad para alcanzar los compartimientos tisulares en un menor tiempo (León *et al.*, 2000).

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOLOGIA

3.1 Veneno

Se utilizó un pool de veneno de más de 40 especímenes adultos de la serpiente *Bothrops asper*, colectadas en la región Pacífica de Costa Rica y mantenidas en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado. El veneno extraído es liofilizado y mantenido en refrigeración (2-4°C).

3.2 Plasma de carnero

Se utilizó una mezcla de plasmas de cuatro carneros inmunizados con cantidades crecientes de una mezcla de los venenos de las serpientes *Bothrops asper*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus*, siguiendo el esquema similar al utilizado por Angulo *et al.* (1997) en el Instituto Clodomiro Picado para la producción de suero antiofídico polivalente. Para obtener IgG completa, el plasma es fraccionado precipitándolo con ácido caprílico. (Rojas, 1994) El pH del plasma es ajustado a 7.0 y el ácido caprílico es agregado lentamente hasta una concentración final de 5% (v/v) seguido de una agitación vigorosa por 60 min. Una vez que el precipitado es separado por una filtración en papel Whatman 2V, el filtrado es dializado en solución salina tampón de fosfato (PBS) conteniendo 0.25g/0.1 L de fenol. Esta preparación es filtrada a través de una membrana de nitrocelulosa 0.22 µm.

El antiveneno Fab, se obtuvo al ajustar el pH del plasma a 7.0 seguido de la adición de 20 g/L de papaína (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) y 1 g/L de cisteína. La digestión fue llevada a 22-25 °C por 2 h., después de lo cual el ácido caprílico fue agregado a una concentración final de 5% (v/v). La mezcla fue agitada vigorosamente por 24 h y luego filtrada. El filtrado fue dializado con PBS con 0.25 g/0.1 L de fenol y decontaminado por filtración en membrana de nitrocelulosa 0.22 µm (León *et al.*, 2000).

3.3 Reactivos

Se utilizó etilendiaminotetra-acetato disódico, monocálcico (CaNa_2EDTA), como agente quelante de iones metálicos (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA).

Para la cuantificación de la hemoglobina en músculo se utilizó el reactivo de Drabkin modificado por Van Kampen y Zijlstra con la siguiente composición:

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	200 mg
KCN	50 mg
KH_2PO_4	140 mg
Sterox SE	0.5 mL
H_2O destilada	1000 mL

3.4 Neutralización de la actividad hemorrágica en piel

Se utilizó el método de Kondo *et al.* (1960), modificado por Gutiérrez *et al.* (1985). Se inyectaron grupos de 4 ratones de la cepa Swiss Webster (18-20 g), en la región ventral por la vía intradérmica con una solución de veneno en PBS. A los 5 minutos o a los 10 minutos según corresponda, se inyectaron 50 μL del suero a probar, justamente en el sitio donde se aplicó el veneno. Dos horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados, procediendo a remover la piel para la cuantificación del área hemorrágica. Grupos control fueron inyectados con la misma cantidad de veneno y a los tiempos determinados se inyectó solución salina tampón de fosfatos pH 7.0 (PBS), además de un grupo control negativo al que se le inyectó 100 μL de PBS.

La actividad neutralizante se expresa como la dosis efectiva 50% (DE_{50}), definida como la relación μL de antiveneno/ mg de veneno en la cual, el diámetro del área hemorrágica es reducido al 50% cuando se compara con el área inducida por el veneno solo. Esta determinación se utilizó para comparar el título neutralizante de los dos

antisueros a probar, para ello se preincubaron diferentes niveles de veneno/ suero a 37°C por 30 minutos.

En los experimentos de aplicación independiente del veneno y el antiveneno, los grupos fueron inyectados con 50 µg de veneno disueltos en 50 µL de PBS. Luego, a determinados intervalos de tiempo (inmediatamente, 5 y 10 minutos) se inyectó en el mismo sitio de la aplicación del veneno 50 µL del antiveneno a ensayar.

3.5 Determinación de la concentración óptima de EDTA a utilizar

Grupos de cuatro ratones Swiss Webster (18–22 g) fueron inyectados intramuscularmente, en el músculo gastronemio con una solución constante de veneno (50 µg / 50 µL), seguidos por la inyección inmediata de diferentes cantidades de CaNa₂EDTA (0.5 y 1.0 M). Luego de 3 horas se sacrificó a los animales y se determinó los g/ dL de hemoglobina por miligramo de músculo según la técnica que se describe a continuación. A la vez se ensayó la aplicación del CaNa₂EDTA (0.5 M) a diferentes intervalos después de la inyección del veneno.

3.6 Neutralización de la actividad hemorrágica en músculo

Utilizando el mismo esquema, se inyectaron en el músculo gastronemio de la pata derecha, 50 µL de la solución de veneno procedidos, según el tiempo a evaluar de 50 µL del suero o mezcla en estudio. A su vez y de igual manera al método anterior se prepararon los grupos controles de veneno y PBS.

Una vez transcurridas 3 horas se procedió a sacrificar a los animales y a la extracción quirúrgica del músculo que fue inyectado para determinar la hemoglobina según el método de Ownby *et al.* (1984), modificado por Gutiérrez *et al.* (1987). Estos músculos fueron pesados en balanza analítica y colocados en tubos con 1,5 mL de solución de Drabkin, para posteriormente ser homogenizados.

Este homogenizado se trasvasó a tubos eppendorf de 2,0 mL y se centrifugaron por 5 minutos a 14000 rpm. Del sobrenadante se tomó 1,0 mL y se pasaron a tubos con 2,0 mL de solución de Drabkin a los cuales se les realizó una determinación de absorbancia a 540 nm y se comparó con la curva de calibración de la hemoglobina para determinar la concentración (g/dL) de hemoglobina por gramo de músculo.

3.7 Inhibición de la actividad mionecrótica

Se inyectaron grupos de 4 ratones con las soluciones de veneno y antídotos siguiendo el mismo protocolo utilizado para el experimento de hemorragia en músculo gastrocnemio. Transcurridas tres horas después de la inyección, se procedió a recolectar en capilares heparinizados sangre de la cola de cada animal. Estos capilares son centrifugados para separar el suero de las células por 3 minutos.

La actividad de creatina quinasa (CK) en suero se determinó con el reactivo de Sigma N° 47-UV. La actividad de CK fue expresada como unidades/ mL, una unidad de CK es definida como la cantidad de enzima que produce un μmol de NADH por minuto bajo las condiciones del procedimiento (30°C).

3.8 Análisis estadístico

Los resultados son presentados como el promedio \pm D.E. ($n = 4$). La t de Student fue usada para determinar las diferencias significativas entre los promedios de dos grupos experimentales.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Neutralización de la actividad hemorrágica en piel

4.1.1 Determinación de la dosis efectiva 50% (DE₅₀)

La determinación de la dosis efectiva 50% demuestra que no existe una diferencia considerable entre las actividades de los diferentes sueros utilizados para neutralizar este efecto ya que las DE₅₀ para la IgG fue de 91.21 con un rango de variación desde 38.8 hasta 214.4 mientras que para el Fab la DE₅₀ fue de 70.97 con un rango desde 31.17 hasta 161.6 ambos con un nivel de significancia del 5%.

4.1.2 Comparación de la neutralización de la actividad hemorrágica en piel de los antivenenos

Al comparar las determinaciones de los halos de hemorragia inducidos por el veneno y como los diferentes sueros afectaron su formación, se observó que las diferencias que se presentaron tanto entre sí como con el control de veneno no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Figura 1).

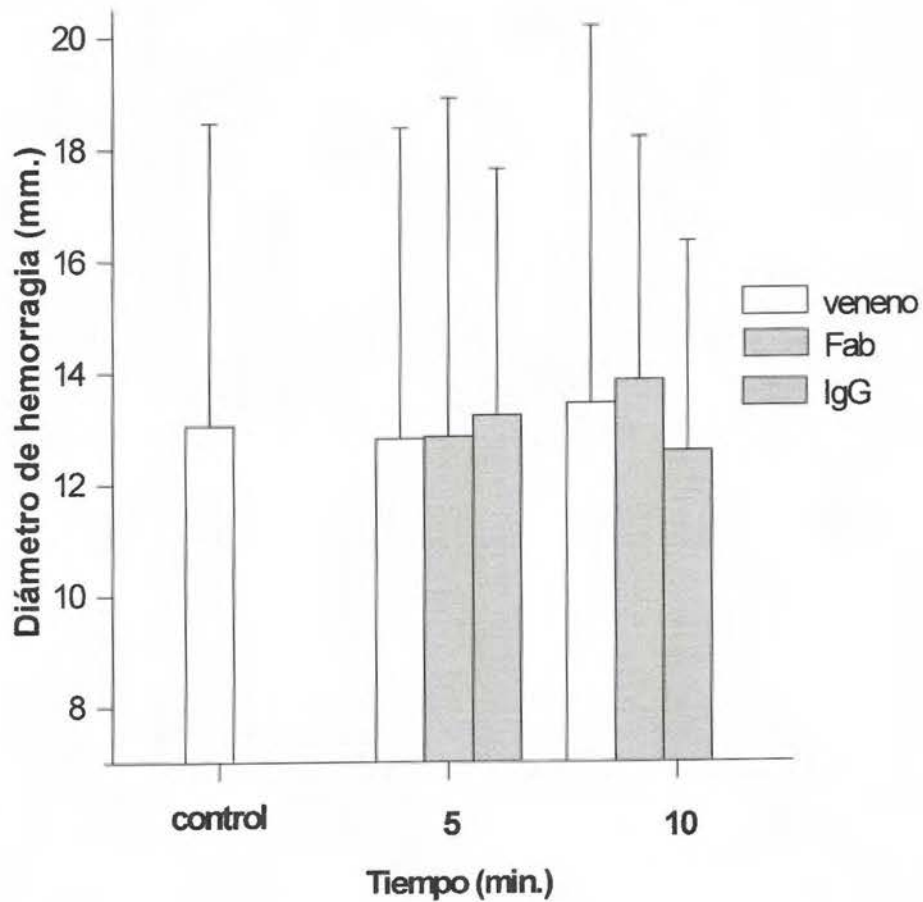


Figura 1. Neutralización de la actividad hemorrágica en piel por diferentes antisueros (Fab o IgG) aplicados a diferentes intervalos de tiempo (5 y 10 min.) en el sitio de inyección del veneno.

4.2 Determinación de la concentración óptima de EDTA a utilizar

Al analizar estadísticamente las diferencias que se presentaron entre la utilización de CaNa_2EDTA 1 M y 0.5 M y posteriormente cuantificar la cantidad de hemoglobina liberada en el músculo gastronemio, se determinó que las diferencias sí son significativas ($p > 0.05$), siendo la dosis de 1 M la que logró disminuir en mayor proporción la hemoglobina liberada en el músculo (Figura 2).

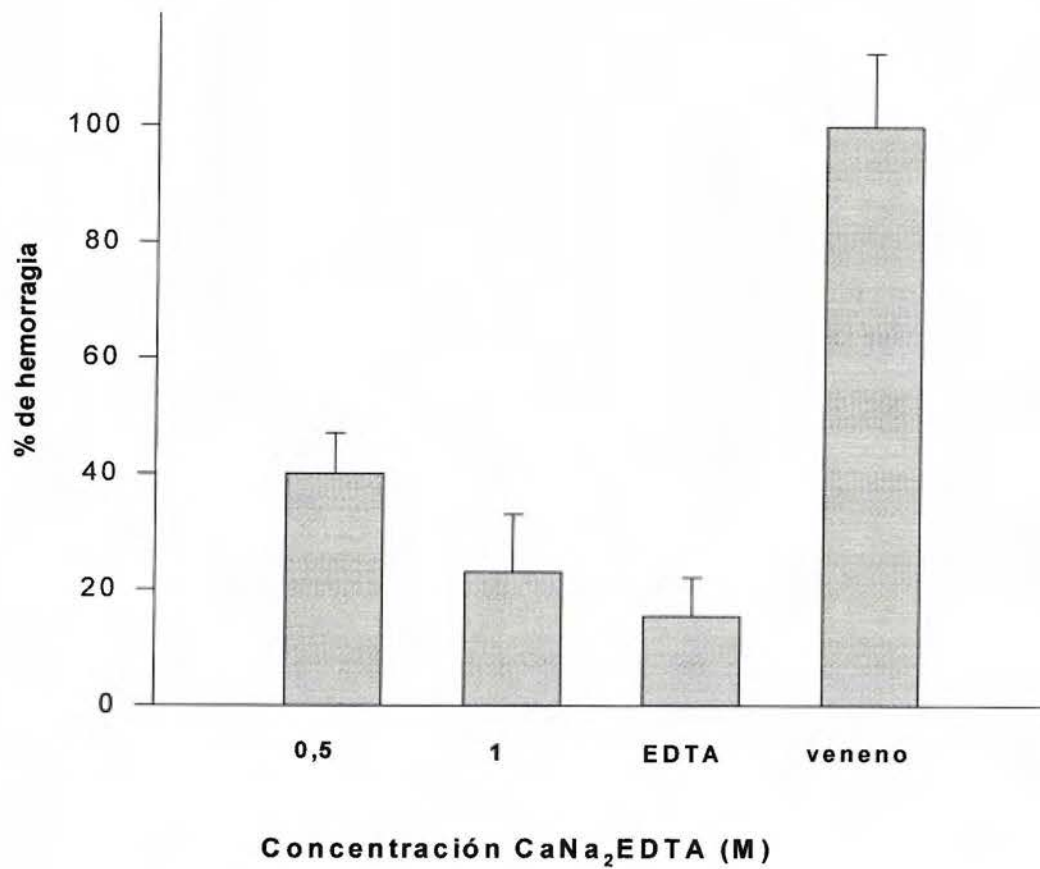


Figura 2. Neutralización de la actividad hemorrágica del veneno en el músculo por diferentes concentraciones de CaNa_2EDTA .

4.3 Acción del CaNa₂EDTA

Se observó que una concentración de CaNa₂EDTA de 1 M es capaz de inhibir hasta en un 77% la actividad hemorrágica del veneno, y a la vez se observó que 0.5 M la inhibe en un 60% cuando son aplicados de forma inmediata en el sitio de inyección del veneno.

Los resultados obtenidos al aplicar el EDTA 0.5 M a tres diferentes intervalos de tiempo (0, 15 y 30 minutos) demostraron, que ya para los 15 minutos no se va a encontrar ningún beneficio en la aplicación del agente quelante (Figura 3).

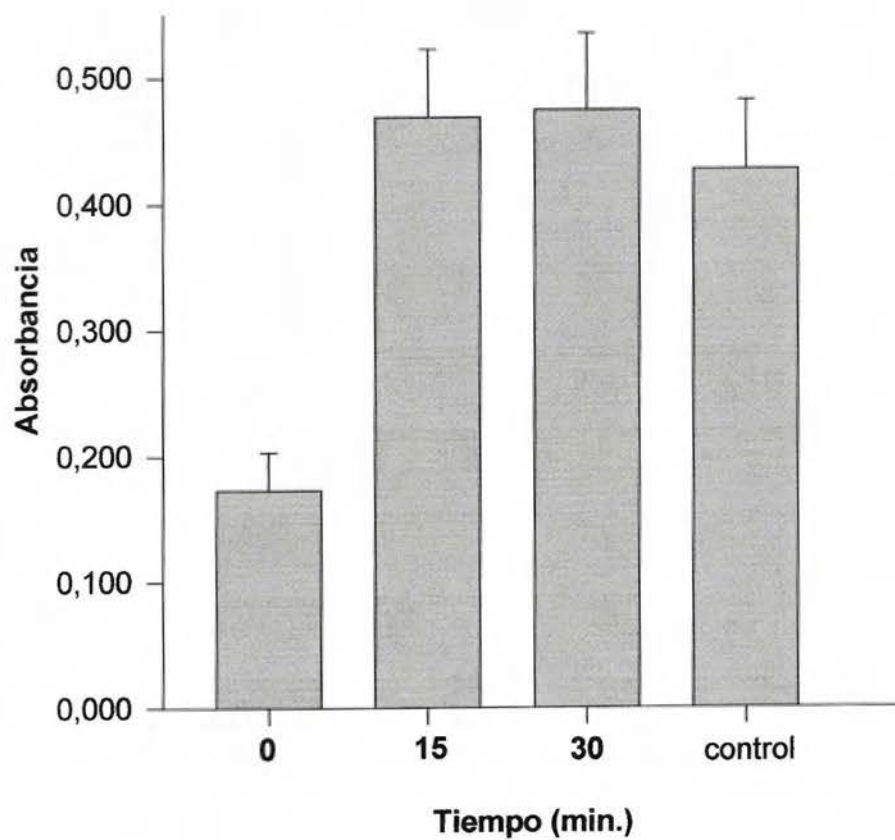


Figura 3. Neutralización de la actividad hemorrágica del veneno en el músculo por la aplicación a diferentes intervalos de tiempo del agente quelante CaNa_2EDTA (0.5 M)

4.4 Neutralización de la hemorragia en músculo utilizando sueros y mezclas

No se observó ninguna diferencia significativa ($p > 0.05$) en la efectividad neutralizante de hemorragia entre las diferentes preparaciones (IgG, Fab, IgG/EDTA o Fab/EDTA), pero sí se reflejó claramente que entre menor sea el tiempo de aplicación su efecto será más eficaz.

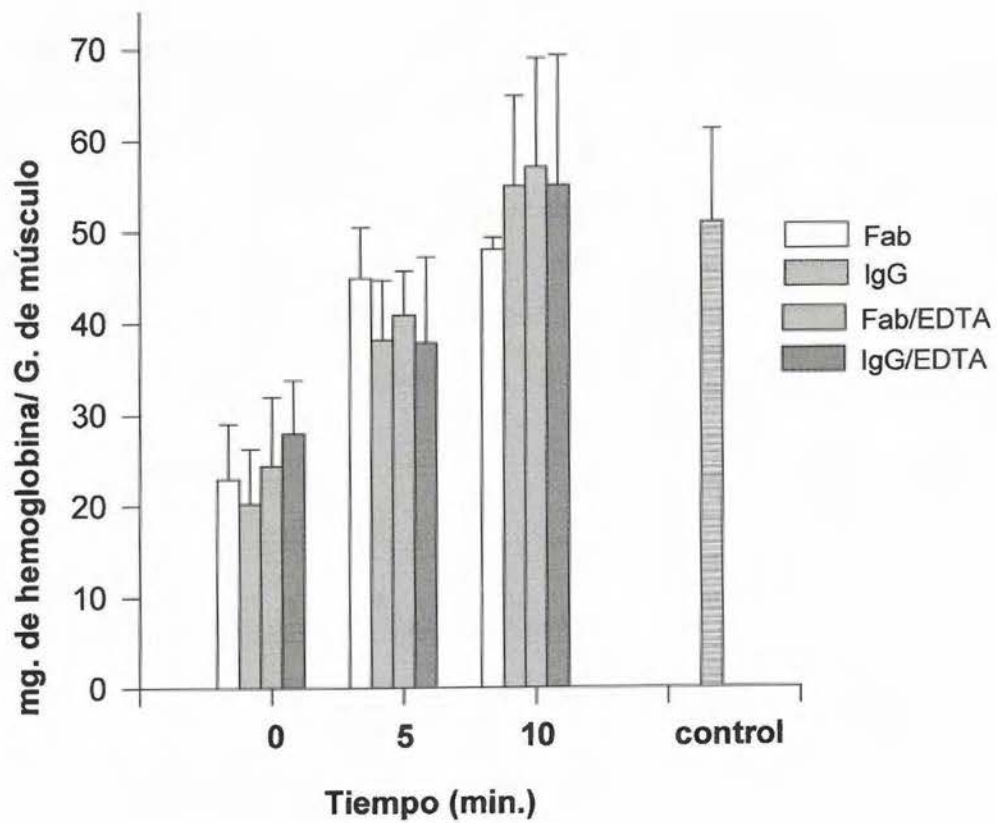


Figura 4. Determinación de la neutralización de la hemorragia inducida por el veneno, con los antiseros y mezclas, mediante la cuantificación de hemoglobina liberada por cada gramo de músculo gastronemio.

4.4 Inhibición de la actividad mionecrótica

Como se puede observar en la figura 5, las diferencias entre las concentraciones de creatina quinasa que se elevan como resultado de la acción mionecrótica del veneno, son estadísticamente diferentes para los dos tipos de inmunoglobulina ($p < 0.05$), tanto al tiempo cero como a los tres minutos después de aplicado el veneno. También se puede observar que la utilización de mezclas no ayuda a disminuir la actividad mionecrótica, y más bien, el EDTA contribuye en algo al desarrollo de la lesión.

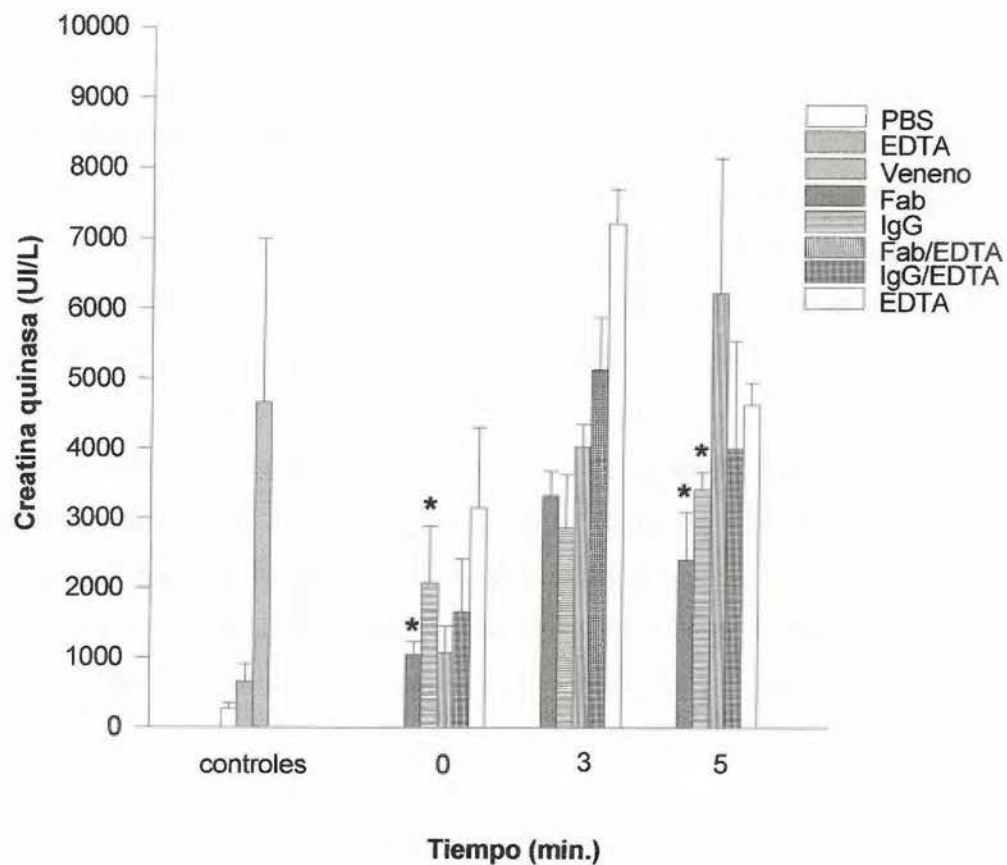


Figura 5. Neutralización de la mionecrosis producto de la acción del veneno mediante la aplicación en el sitio de inyección del veneno de los antisueros o mezclas, determinado por el grado de elevación de los niveles de creatina quinasa séricos pasadas tres horas. ($p > 0.05$)

CAPITULO V

DISCUSION

La digestión enzimática de la molécula de IgG con la papaína, para la producción de fragmentos Fab capaces de unirse a antígenos, no afectó el título neutralizante del suero como quedó demostrado al analizar la DE_{50} , en donde ambos antisueros (IgG y Fab) se comportaron de manera semejante siendo solamente un poco menor la del Fab, debido a lo antes mencionado por el proceso de digestión requerido para su elaboración.

La hemorragia es uno de los efectos fisiopatológicos de mayor importancia en los envenenamientos por *B. asper*, el cual contribuye significativamente en el desarrollo del daño tisular local. La hemorragia se desarrolla rápidamente luego de la inyección del veneno, haciendo difícil su neutralización al aplicar el suero antiofídico por vía intravenosa o intramuscular, debido al prolongado tiempo en que este llega hasta el sitio de inyección.

Es por ello que el estudiar alternativas terapéuticas para la neutralización de este y otros efectos locales como la mionecrosis y el edema, mediante la utilización de moléculas que por sus características físicas como el tamaño y la carga, les permiten difundir más rápidamente hasta el sitio lesionado, lo que podría significar una disminución en la morbilidad y mortalidad del accidente ofídico.

Al comparar en este trabajo la capacidad de neutralización de las moléculas de Fab y la IgG completa, mediante la inoculación local transcurrido cierto período de tiempo, se observó que la actividad hemorrágica del veneno no es grandemente neutralizada, al igual que se puede apreciar que no existe una diferencia significativa entre ambos tipos de moléculas neutralizantes. Iguales resultados se presentaron cuando se analizó la cantidad de hemoglobina liberada por gramo de músculo gastronemio, como una forma más cuantitativa de representar la hemorragia, donde no hay diferencia estadísticamente significativa entre las dos moléculas.

Lo que sí se puede apreciar muy claramente es como se da una relación inversamente proporcional entre el tiempo de aplicación del antiveneno y el desarrollo de la hemorragia, lo cual puede explicar el porqué la hemorragia ha sido uno de los efectos que menos se ha logrado controlar o aminorar con los sueros antiofídicos tradicionales y es debido muy probablemente al rápido desarrollo de la lesión.

La mionecrosis como anteriormente se mencionaba, se desarrolla rápidamente al inyectarse el veneno, lo cual al igual que la hemorragia, lo hace ser de particular interés para los que buscan minimizar las secuelas desarrolladas por el accidente ofídico, por la misma razón del elevado tiempo que les toma a los anticuerpos difundir hasta el sitio del daño local. La molécula del Fab representaría una terapia aparentemente más apta, pero como fue reportado por León *et. al* (1997 y 2000) ni el fragmento Fab como tampoco el $F(ab')_2$ variarán significativamente el desarrollo de la lesión con respecto a la molécula IgG al ser aplicadas por vía intravenosa.

Estos resultados se deben en gran medida al extremadamente rápido desarrollo del daño local, además del amplio volumen de distribución junto con la rápida tasa de aclaramiento renal. Además como fue propuesto por León *et al.* (1997) y Gutiérrez *et al.* (1998) las alteraciones de la microvasculatura local inducidas por las toxinas edematógenas y hemorrágicas pueden inducir una extravasación similar de la IgG y el Fab, sugiriendo que la farmacocinética de los anticuerpos entre los grupos control y los envenenados pueden ser sustancialmente diferentes.

A diferencia de esto en nuestros resultados si se puede apreciar que, en cuanto a la neutralización de la actividad mionecrótica, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos moléculas al ser aplicadas localmente de manera inmediata o en cortos períodos de tiempo. A nuestro criterio esto es debido a que la molécula de Fab difunde mucho más rápido dentro del músculo alcanzando con ello a neutralizar una mayor cantidad de miotoxinas, debido a que se elimina el factor de la permeabilidad de la microvasculatura afectada.

El CaNa_2EDTA es un agente quelante de iones metálicos que inhibe la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper*, por lo que puede ser considerado como una posible sustancia terapéutica alternativa al suero, para la neutralización de la hemorragia.

Como se observó en los resultados, se da una relación dosis respuesta, es decir conforme se aumenta la concentración de CaNa_2EDTA la hemorragia disminuye. Estos resultados llevan una conotación muy importante ya que las dosis utilizadas son demasiado altas como para ser aplicadas en seres humanos, a pesar de que este tipo particular de sal no es tóxico para el hombre e incluso se ha utilizado como tratamiento para intoxicaciones por metales pesados.

Por otro lado, la utilización de mezclas de los dos tipos de sueros (Fab o IgG) con el CaNa_2EDTA , no demostró contribuir en grado alguno a la disminución de alguno de los efectos locales generados por el veneno que se probaron y más bien provocó un cierto aumento en éstos, quizás como resultado de la inhibición de la coagulación local por lo que se aumentaría la hemorragia, aunque en las pruebas de hemorragia no se observó ningún aumento con el CaNa_2EDTA .

También se observó que a pesar de que el CaNa_2EDTA es capaz de neutralizar considerablemente la hemorragia, ya transcurridos 15 minutos la capacidad de este de neutralizar el efecto se vuelve nula, debido, como anteriormente se mencionó, al rápido desarrollo de este efecto fisiopatológico.

Es muy poco lo que se conoce sobre los factores que afectan la capacidad de neutralización de un envenenamiento. Es un sistema multifactorial que puede variar significativamente de lo que se espera que ocurra. Es por ello que más estudios deben ser llevados a cabo para tratar de conocer más a fondo este problema para poder brindar soluciones más satisfactorias a aquellos individuos que sufrieron una mordedura de serpiente.

REFERENCIAS

- Angulo, Y., Estrada, R. & Gutiérrez, J.M. (1997) Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. *Toxicom* **35**, 81-90.
- Arroyo, O., Rojas, G. & Gutiérrez, J.M. (1999) Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: Epidemiología y consideraciones clínicas. *Acta Médica Costarricense* **41**, 23-29.
- Bon, C. (1995) *Serum therapy was discovered 100 years ago*. Envenomings and their treatments. First International Congress, Institute Pasteur. Paris. 3-9 pags
- Borkow, G., Gutiérrez, J.M. & Ovadia, M. (1997) Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel mixture. *Toxicom* **35**. 865-877
- Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther* **62**, 345-272
- Cameron, D.L. & Tu, A.T. (1977) Characterization of myotoxin *a* from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry* **16**. 2546-2553
- Chaves, F., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. & Cerdas, L. (1989) Histopathological and bioquímica alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (tercípelo) venom in mice. *Toxicom* **27**. 1085-1093
- Chaves, F. (1992) Cambios fisiopatológicos y bioquímicos inducidos en ratones inoculados con los venenos de serpientes recién nacidas y adultas de *Bothrops asper*. (Tesis) Universidad de Costa Rica, pags. 1-33.

- Chippaux, J.P.(1998) Snake-bites: appraisal of the global situation. *W.H.O. Bull.* **76**: 515-524.
- Díaz, C., Rucavado, A., Rojas, N., Schroit, A. & Gutiérrez, J.M. (2000) *Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A₂: Role of phosphatidylserine as a potential membrane binding site*. El envenenamiento ofídico un problema de salud pública en Latinoamérica. Simposio Internacional, Instituto Clodomiro Picado. San José. pp.34
- Dart, R.C. & Horowitz, R.S. (1995) *Use of antibodies as antivenoms: a primitive solution for a complex problem?*. Envenomings and their treatments. First International Congress, Institute Pasteur. Paris. 83-94 pags.
- Franceschi, A. (1999) Metaloproteinasas del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Terciopelo): Caracterización bioquímica y neutralización. (Tesis) Universidad de Costa Rica, pags. 4-18
- Grandgeorge, M., Verón, J.L., Lutsch, C., Makula, M.F., Riffard, P., Pepin, S. & Scherrmann, J.M. (1995) *Preparation of improved F(ab)₂ antivenoms. An example: new polyvalent European viper antivenom (equine)*. Envenomings and their treatments. First International Congress, Institute Pasteur. Paris. 161-172
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. & Odell, G.V. (1984) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* **22**.115-128
- Gutiérrez, J.M., Gené, J.A. Rojas, G. & Cerdas, L. (1985) Neutralization of proteolytic and haemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, **23**, 887-893

- Gutiérrez, J.M., Avila, C., Rojas, E. & Cerdas, L. (1988) An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicom* **23**, 887-893
- Gutiérrez J.M., Rojas, G. & Cerdas, L. (1987) Ability of polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmasters. *Toxicom* **33**, 19-29.
- Gutiérrez, J.M., Rojas, G., & Aymerich, R., (1999) Epidemiología del envenenamiento ofídico en Centroamérica. El envenenamiento ofídico en Centroamérica: fisiopatología y tratamiento. Universidad de Costa Rica, pp. 5.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Rucavado, A. (2000) *Patogénesis del daño tisular local inducido por venenos de serpientes de la familia Viperidae*. El envenenamiento ofídico un problema de salud pública en Latinoamérica. Simposio Internacional, Instituto Clodomiro Picado. San José. pp. 18
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R. & Ohsaka, A. (1960) Studies on the quantitative method for the determination of haemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **13**, 43-51
- Kuby, J.(1997) *Immunology*. 3rd ed. W.H. Freeman and Company. Pags. 108-111
- Landon, J. & Smith, D.C.(1995) *Development of novel antivenoms based on specific ovine Fab*. Envenomings and their treatments. First International Congress, Institute Pasteur. Paris. 173-180 pags
- Laure, C. (1975) The primary structure of crotamine. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 213-215

- León, G., Valverde, J.M., Lomonte, B., Rojas, G. & Gutierrez, J.M. (2000) Comparative study on the ability of IgG and Fab ovine polivalent antivenon to neutralize edema, hemorrhage and myonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, **38**, 233-244
- Lomonte, B. (1994) Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. (Tesis) University of Göteborg, pags.1-28.
- Melo, P.A. & Suarez-Krutz. G. (1988) Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon* **26**. 87-95
- Ownby, C.L., Bjarnason, J. & Tu, A.T. (1978) Hemorrhagic toxins from rattlesnakes (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by tree purified toxins. *Amer. J. Pathol.* **93**: 201-218
- Ownby, C.L. & Geren, C.R. (1984) Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. *Toxicom* **25**. 517-526
- Scherrman, J.M. & Pepin, S. (1995) *Biodynamics of antigen-antibody neutralization in vivo*. Envenomings and their treatments. First International Congress, Institute Pasteur. Paris. 109-115 pags
- Swaroop, S. & Grab, B. (1954) Snakebite mortality in the world. *Bull. W.H.O.* **10**, 35-76.
- Theakston, R.D.G. (1995) *Snake bite: The kinetics of envenoming and therapy*. Envenomings and their treatments. First International Congress, Institute Pasteur. Paris. 117-126 pags

Volpe, P., Damiani, E., Maurer, A. & Tu, A.T. (1986) Interaction of myotoxin *a* with the Ca^{2+} -ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Archs. Biochem. Biophys.* **246**. 90-97

Warrell, D.A. (1995) *Clinical features of envenoming from snake bites*. Envenomings and their treatments. First International Congress, Institute Pasteur. Paris. 63-76 pags

Warrel, D.A. & Fenner, P.J. (1993) Venomous bite and stings. *Br. Med. Bull.* **49**, 423-439