

**CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DEL SUERO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE SOBRE
LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops asper* Y
SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA NEUTRALIZACIÓN DE LA LETALIDAD**

Universidad de Costa Rica

Facultad de Microbiología

**Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica**

José Andrés Rojas Vargas

Tutora: Dra. Teresa Escalante

Lectores: Dr. José María Gutiérrez G.

Dra. Alexandra Rucavado R.

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Julio del 2006



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el lunes 03 de julio del año 2006 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **JOSÉ ANDRÉS ROJAS VARGAS**, carné A03716, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRACTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de **LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Guillermo León **PRESIDENTE**
Dra. Alexandra Rucavado
Dr. José María Gutiérrez
Dra. Teresa Escalante
Dr. José Gené

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **JOSÉ ANDRÉS ROJAS VARGAS**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que el postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

El postulante **JOSÉ ANDRÉS ROJAS VARGAS**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "**Capacidad neutralizante del sueroantifidico polivalente sobre la actividad proteólíca del veneno de la serpiente *Bothrops asper* y su posible correlacion de la neutralización de la letalidad**".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

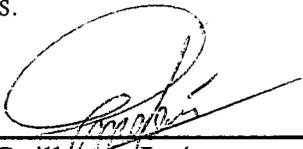
ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 10 (Mención de honor)

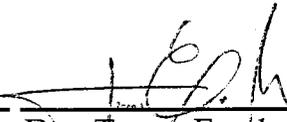
ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica al Postulante el resultado de la deliberación y lo declara acreedor al grado de **Licenciado en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctor en Microbiología y Química Clínica**.

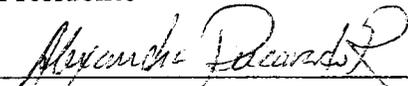
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y al Postulante, a las 10.50 a.m. horas.



Dr. Guillermo León
Presidente



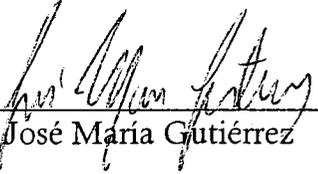
Dra. Teresa Escalante



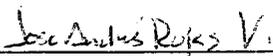
Dra. Alexandra Rucavado



Dr. José Gené



Dr. José María Gutiérrez



José Andrés Vargas Rojas
Postulante

AGRADECIMIENTOS

Dra. Teresa Escalante M.

Dr. José María Gutiérrez G.

Dra. Alexandra Rucavado R.

A todo el personal del Instituto Clodomiro Picado.

A mi mamá, mi papá y mis hermanos.

A ita tere.

A mis amigos (CCCNO) y a vos niña.....

RESUMEN

Rojas, J.A. CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DEL SUERO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops asper* Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA NEUTRALIZACIÓN DE LA LETALIDAD.

Con el presente estudio se evaluó la capacidad neutralizante del suero antiofídico polivalente sobre la actividad proteolítica del veneno total de la serpiente *Bothrops asper* y de una fracción de alta masa molecular, en la que predominen las toxinas hemorrágicas, obtenida del mismo veneno y determinar su correlación con la neutralización de la letalidad. Se utilizó veneno total obtenido de un pool de especímenes adultos de *Bothrops asper* de las zonas Atlántica y Pacífica de Costa Rica; y lotes de suero antiofídico polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado. La fracción de alta masa molecular del veneno de *Bothrops asper* fue separada mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Sephacryl S-200 y se evaluó la fracción obtenida mediante la determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima y una electroforesis SDS-PAGE. Para evaluar la actividad del veneno y la fracción; así como la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos se emplearon ensayos de actividad proteolítica con caseína biotinilada y azocaseína como sustrato de acción. Además se pretendió con este estudio establecer una correlación entre los datos de neutralización de la actividad proteolítica y los datos de neutralización de la letalidad de los diferentes lotes de suero antiofídico utilizados en este estudio. Los resultados obtenidos demuestran que se necesitó un mayor volumen de suero antiofídico para neutralizar la fracción de alta masa molecular que el veneno total y que no se obtuvo una correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica y la neutralización de la letalidad. Se puede concluir que la prueba de actividad proteolítica sobre azocaseína, es una metodología *in vitro* idónea para evaluar la neutralización de la actividad hemorrágica.

TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo I: Introducción

-Antecedentes	1
<i>Accidente ofídico</i>	1
<i>Producción de suero antiofídico</i>	2
<i>Actividad hemorrágica</i>	5
-Objetivos	8
-Justificación	9

Capítulo II: Materiales y Métodos

-Venenos	10
-Sueros antiofídicos	10
-Separación cromatográfica de una fracción hemorrágica de alta masa molecular del veneno de <i>Bothrops asper</i>	11
-Evaluación de la actividad hemorrágica de las fracciones obtenidas	11
-Análisis electroforético	12
-Neutralización de la actividad proteolítica	12
<i>Ensayo proteolítico con caseína biotinilada</i>	12
Biotinilación de la caseína	12
Selección de las condiciones del ensayo	13
Selección de dosis reto y prueba de neutralización	13
<i>Ensayo proteolítico con azocaseína</i>	14
-Análisis estadístico	15
-Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica y la neutralización de la letalidad	15

Capítulo III: Resultados

-Separación cromatográfica de la fracción de alta masa molecular y análisis electroforético	16
-Ensayo proteolítico con caseína biotinilada	18
<i>Estandarización de condiciones</i>	18
<i>Actividad proteolítica del veneno total de Bothrops asper y de una fracción de alta masa molecular</i>	18

<i>Neutralización de la actividad proteolítica</i>	20
-Ensayo proteolítico con azocaseína	22
<i>Actividad proteolítica del veneno total de Bothrops asper y de una fracción de alta masa molecular</i>	22
<i>Neutralización de la actividad proteolítica</i>	23
<i>Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica y la neutralización de la letalidad</i>	25
Capítulo IV: Discusión	27
Capítulo V: Conclusiones	32
Referencias	34

INDICE DE FIGURAS

-Fig. 1. Fraccionamiento del veneno de <i>B. asper</i> mediante filtración en gel en una columna Sephacryl S-200	17
-Fig. 2. Electroforesis SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras del veneno total de <i>Bothrops asper</i> y de la fracción de alta masa molecular	17
-Fig. 3. Curva de caseína biotinilada	18
-Fig. 4. Actividad proteolítica del veneno total de <i>B. asper</i> sobre caseína biotinilada	19
-Fig. 5. Actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular del veneno de <i>B. asper</i> sobre caseína biotinilada	19
-Fig. 6. Capacidad neutralizante de diferentes lotes de suero antiofídico sobre la actividad proteolítica del veneno total de <i>B. asper</i> sobre caseína biotinilada	20
-Fig. 7. Capacidad neutralizante de diferentes lotes de suero antiofídico sobre la actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular del veneno de <i>B. asper</i> sobre caseína biotinilada	21
-Fig. 8. Actividad proteolítica del veneno total de <i>B. asper</i> sobre azocaseína	22
-Fig. 9. Actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular del veneno de <i>B. asper</i> sobre azocaseína	23
-Fig. 10. Curva dosis respuesta con el veneno total para el lote de suero 3800705LQ con el ensayo sobre azocaseína	24
-Fig. 11. Curva dosis respuesta con la fracción de alta masa molecular del veneno para el lote de suero 3800705LQ con el ensayo sobre azocaseína	24
-Fig. 12. Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica del veneno total y la neutralización de la letalidad	26
-Fig. 13. Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular y la neutralización de la letalidad	26

INDICE DE CUADROS

-Cuadro 1. Neutralización de la actividad proteolítica por parte de 10 lotes de suero antifídico, mediante el método de azocaseína

25

LISTA DE ABREVIATURAS

DE₅₀: Dosis efectiva 50%

DMSO: Dimetil sulfóxido

ICP: Instituto Clodomiro Picado

IgG: Inmunoglobulina tipo G

KDa: kilodaltons

mg: miligramo

ml: mililitro

nm: nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

SDS-PAGE: Duodecil sulfato de sodio, gel de poliacrilamida.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Accidente Ofídico

Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un problema de salud de importancia mundial. Se ha estimado que en el mundo suceden alrededor de 2.5 millones de accidentes ofídicos al año, con un total aproximado de 125 000 muertes (Chippaux, 1998). Estos accidentes afectan fundamentalmente a la población rural involucrada en faenas agrícolas (Chippaux, 1998). En Costa Rica, Sasa & Vazquez (2003) reportaron incidencias que fluctúan entre 12 y 18 por 100 000 habitantes durante el período 1990-2000.

La enorme mayoría de los envenenamientos en América Latina son causados por especies de la familia Viperidae (Gutiérrez, 2002). Dentro de esta familia, el género *Bothrops* es uno de los principales en términos de relevancia y distribución. En Costa Rica, y en general en la mayoría de la región mesoamericana, la especie *Bothrops asper* es considerada responsable de aproximadamente el 50% de los accidentes (Gutiérrez, 1995). Esta especie tiene la particularidad de adaptarse bien a regiones alteradas, de uso agrícola o simplemente deforestadas. (Arroyo et al., 1999).

El cuadro clínico que se desarrolla en estos casos se caracteriza por presentar un cuadro inflamatorio agudo con daños locales rápidos y prominentes; los signos y síntomas varían según la severidad del envenenamiento, pero en términos generales se presenta edema, dolor, sangrado y necrosis (Gutiérrez, 1995); seguido de un cuadro sistémico si las toxinas logran ingresar al torrente sanguíneo, caracterizado por coagulopatías, hemoptisis, oliguria, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Gutiérrez, 1995).

Los venenos de la familia Viperidae son mezclas complejas con una amplia gama de moléculas distintas, entre las cuales se encuentran proteínas, que constituyen el 90% del peso seco de estos venenos, carbohidratos, lípidos, aminos biogénicas, nucleótidos y aminoácidos libres (Bjarnason & Fox, 1994). Los principales componentes tóxicos de los venenos de vipéridos se pueden diferenciar claramente, a partir de sus efectos, en tres tipos: toxinas que afectan la coagulación y las plaquetas, toxinas que inducen necrosis del tejido muscular y hemorragias que inducen manifestaciones hemorrágicas locales y sistémicas (Gutiérrez, 2002). La hemorragia inducida por el veneno puede ocurrir localmente, contribuyendo a la isquemia local y a una pobre regeneración tisular (Gutiérrez et al., 1995a) y sistémicamente, afectando múltiples órganos y originando serias complicaciones como choque cardiovascular, sangrado pulmonar y hemorragias en el sistema nervioso central. Así, el síndrome hemorrágico es una de las más serias consecuencias del envenenamiento con vipéridos (Gutiérrez et al., 2005). El veneno de *B. asper* posee también proteasas tipo trombina que actúan sobre el fibrinógeno produciendo microtrombos de fibrina, también posee activadores del factor X de la cascada de la coagulación, estas acciones originan una defibrinación, con disminución en los niveles de fibrinógeno y con prolongación en los tiempos de coagulación. Las alteraciones en la coagulación agravan el sangrado sistémico que iniciaron las toxinas hemorrágicas (Gutiérrez, 1995).

Producción de Suero Antiofídico

La administración parenteral de suero antiofídico constituye el único recurso terapéutico científicamente validado para el manejo de los envenenamientos ofídicos (Gutiérrez, 2002). Rojas *et al.* (1994) introdujeron una nueva metodología en el procesamiento del plasma equino para la purificación de las inmunoglobulinas, basada en la precipitación de las proteínas no inmunoglobulínicas del plasma mediante adición de ácido caprílico. Esta tecnología, adaptada para procesamiento industrial de plasma en el Instituto

Clodomiro Picado, es muy simple y económica, además genera un producto de alta pureza, eficacia, estabilidad y seguridad (Gutiérrez, 2002).

La evaluación de la eficacia del antiveneno es fundamental para el posterior tratamiento de la mordedura, la OMS especifica que a cada grupo de sueros se le debe evaluar su capacidad de neutralización de los efectos letales de su correspondiente veneno (Theakston et al., 2003). La capacidad neutralizante de estos sueros antiofídicos ha sido tradicionalmente evaluada estudiando la neutralización de la letalidad con la prueba de potencia o prueba DE_{50} , utilizada mundialmente en la producción de sueros. Esta prueba consiste en determinar la mínima cantidad de suero antiofídico necesaria para prevenir la muerte en la mitad de los animales de un grupo estadísticamente significativo (Theakston et al., 2003).

En el Instituto Clodomiro Picado la neutralización de la letalidad se expresa como mg de veneno neutralizados por un mL de suero (Instructivo del Laboratorio de Control de Calidad), por lo que entre más alto sea el valor de DE_{50} mayor es la capacidad neutralizante del suero antiofídico. Mediante el uso del programa estadístico Spearman-Kärber se determina la dosis de veneno que mata al 50% de la población de ratones inyectados (Gené & Robles, 1987).

Este procedimiento de evaluación presenta una serie de inconvenientes; en primer lugar es caro por la gran cantidad de animales de laboratorio que se deben emplear, por ejemplo la European Pharmacopeia utilizando este método para medir la actividad de un suero antiofídico contra venenos de cinco serpientes, utilizó 374 ratones por grupo de sueros (Weisser y Hechler, 1997); además requiere de mucho tiempo (48 h) y produce resultados variables y difíciles de reproducir. Otro eventual problema de este método es la muerte y sufrimiento de un gran número de ratones. Debido a las razones antes expresadas es que las técnicas *in vitro* son idóneas para la evaluación de la capacidad neutralizante, principalmente en etapas tempranas de la preparación del suero (Sells, 2003).

Es debido a esta situación existente, que una línea de investigación importante la constituye el estudio de la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos, asociado con el desarrollo de técnicas de laboratorio que han permitido el análisis de la neutralización de efectos farmacológicos y enzimáticos específicos (Gutiérrez, 2002). En este campo Theakston y Reid (1979) reportaron el uso de ELISAs con venenos puros como antígenos en ensayos para evaluar la capacidad neutralizante. Rungsiwongse y Ratanabanankoon (1991) sugirieron que el ELISA utilizando las fracciones que contenían las toxinas importantes en la letalidad del veneno darían un mejor estimado de la potencia de los sueros y encontraron una fuerte correlación entre la capacidad neutralizante del suero antiofídico contra *Naja naja siamensis* y el título de ELISA contra la fracción que contenía la α -cobratoxina, la cual es la principal fracción α -neurotóxica de este veneno. María *et al.* (1998) determinaron que el ELISA utilizando la fracción tóxica del veneno de *Bothrops jararaca* como antígeno puede ser utilizado como técnica para evaluar la capacidad neutralizante de los antivenenos brasileños contra el género *Bothrops*. Existen otras alternativas al ELISA para evaluar la capacidad neutralizante del suero, por ejemplo métodos que determinan la inhibición de actividades específicas del veneno como la técnica de hemólisis indirecta que evalúa la actividad PLA₂ presente en los venenos de vipéridos y su neutralización por parte de los sueros antiofídicos (Gutiérrez *et al.*, 1988). Recientemente, una alternativa *in vivo* ha sido desarrollada, la cual tiene la ventaja de ser libre de dolor. Huevos fértiles incubados por menos de 10 días no tienen el sistema nervioso reflejo completo, por lo que no experimentan dolor. Los huevos tienen un saco membranoso de la yema vascularizada con circulación normal de sangre y muestran un latido de corazón embrionario primitivo, lo que los convierte en una excelente opción para evaluaciones de letalidad (Sells, 2003). Fundamentalmente lo que se busca o se investiga son pruebas que neutralicen los principales efectos tóxicos de los venenos, en el caso de los venenos de vipéridos, los efectos más relevantes son la hemorragia, las alteraciones de la coagulación y la mionecrosis.

Actividad Hemorrágica

Uno de los efectos principales que se busca inhibir en una prueba *in vitro* es la hemorragia, debido a su importancia en la letalidad (Rucavado et al, 2004). Las toxinas hemorrágicas de venenos de serpientes son proteínas ácidas o ligeramente básicas, con pesos moleculares muy variados que van desde 22 KDa hasta 100 KDa (Bjarnason & Fox, 1994). Estas toxinas son metaloproteinasas dependientes de zinc y se clasifican, junto con las astacinas, serralisinas y las matritixinas, dentro de la superfamilia de metzicinas (Bode et al., 1993).

En los últimos años se han aislado y caracterizado parcialmente varias metaloproteinasas hemorrágicas del veneno de *Bothrops asper* (Borkow et al., 1993; Gutiérrez et al., 1995b; Franceschi et al., 2000). A pesar de que el mecanismo de acción no está totalmente dilucidado, los estudios efectuados permiten proponer la siguiente hipótesis: estas enzimas tienen una actividad proteolítica sobre componentes de la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y vénulas. Como consecuencia de esta hidrólisis, se altera la interacción de las células endoteliales con la lámina basal aumentando su susceptibilidad a las fuerzas biofísicas que operan normalmente en los vasos sanguíneos. Estas fuerzas provocan cambios morfológicos en las células endoteliales, como la formación de vesículas y la reducción de su grosor, hasta el punto en que se pierde la integridad de la membrana y se produce la extravasación (Gutiérrez et al., 2005).

Las metaloproteinasas hemorrágicas se clasifican, desde el punto de vista estructural en cuatro grupos, con base en los dominios que poseen (Bjarnason & Fox, 1994). Las de la clase P-I presentan únicamente el dominio metaloproteinasas, caracterizado por una secuencia consenso HEXXHXXGXXH responsable de la unión al zinc (Hati et al., 1999). Las metaloproteinasas de las otras clases presentan además del dominio catalítico, dominios 'tipo disintegrina' (clase P-II), 'tipo disintegrina' y 'rico en cisteína' (clase P-III) y estos dos dominios más un dominio lectina (clase P-IV) (Bjarnason & Fox, 1994). En términos generales las

metaloproteinasas P-III son toxinas hemorrágicas más potentes que las P-I (Bjarnason & Fox, 1994), estas diferencias pueden ser explicadas de tres diferentes formas: que secuencias en los dominios 'tipo disintegrina' y 'rico en cisteína' pudieran dirigir a las P-III a los blancos relevantes en la microvasculatura, que estos dominios contribuyeran a la alteración de los mecanismos hemostáticos y así faciliten la extravasación y que las P-III sean menos susceptibles a inhibidores de proteinasas plasmáticos, como la α_2 -macroglobulina (Gutiérrez et al., 2005).

Tradicionalmente la actividad hemorrágica de los venenos se ha evaluado mediante pruebas *in vivo* (Kondo et al., 1960; Gutiérrez et al., 1985), sin embargo, se conoce que la actividad hemorrágica de las metaloproteinasas depende de su actividad proteolítica (Hati et al., 1999), de tal manera que la determinación *in vitro* de la actividad proteolítica de estas toxinas se puede utilizar para evaluar su actividad enzimática y la neutralización de la misma por inhibidores o sueros antiofídicos.

Existen diversas pruebas para determinar la actividad proteolítica de los venenos y su inhibición. La gelatina ha sido tradicionalmente un sustrato muy utilizado para determinar la actividad proteolítica de diferentes venenos y su inhibición, han sido utilizadas diversas técnicas como ELISAs de degradación de gelatina (Bee et al., 2001) y zimografías donde se copolimerizan geles de poliacrilamida con gelatina (Bee et al., 2001, Wang et al., 2004). Gutiérrez et al (1985) determinaron la inhibición de la actividad proteolítica mediante un ensayo que utilizaba caseína como sustrato y medía la absorbancia a 280 nm en el sobrenadante para determinar la hidrólisis del sustrato. En 1999, Franceschi et al, utilizaron una modificación del ensayo descrito por Koritsas y Atkinson en 1995, con N,N-dimetilcaseína biotinilada como sustrato, para determinar la actividad proteolítica de una toxina aislada del veneno de *Bothrops asper*. Wang et al (2004) evaluaron la actividad proteolítica de una nueva metaloproteinasas aislada del

veneno de la serpiente *Agkistrodon acutus*, mediante la hidrólisis de la azocaseína, sustrato que conjuga la caseína con un colorante-azo.

Debido a las desventajas que posee la técnica de neutralización de la letalidad con la cual se evalúan los sueros actualmente, se pretendió con esta investigación evaluar un método *in vitro* que permitiera determinar la neutralización de la actividad proteolítica del veneno de *B. asper* y evaluar su correlación con la prueba de letalidad. Esto debido a que se considera que las metaloproteinasas hemorrágicas, unas de las principales toxinas proteolíticas de este veneno, tienen un papel muy importante en los eventos que concluyen con la muerte de los animales de laboratorio. Además de evaluar la totalidad de las proteasas del veneno, se pensó en utilizar una fracción de alta masa molecular que tuviera las metaloproteinasas hemorrágicas del grupo P-III, las cuales poseen una actividad hemorrágica más potente y que pueden inducir un sangrado sistémico (Escalante et al., 2004), y que por lo tanto son talvez más importantes en la letalidad.

El incluir en el análisis de la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos una prueba *in vitro*, sencilla, de bajo costo y rápida, que determine la neutralización de un efecto relevante para la letalidad de los venenos de vipéridos, permitiría reducir el uso de pruebas *in vivo*, con lo cual, se estaría disminuyendo costos, minimizando el tiempo empleado evaluando el suero antiofídico, evitando el uso y sufrimiento de un gran número de ratones y logrando resultados más confiables y reproducibles, por ende asegurando aun más la calidad del suero antiofídico producido en el Instituto Clodomiro Picado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad neutralizante del suero antiofídico polivalente sobre la actividad proteolítica del veneno total de la serpiente *Bothrops asper* y de una fracción de alta masa molecular obtenida del mismo veneno y determinar su correlación con la neutralización de la letalidad.

Objetivos específicos

- Purificar mediante cromatografía una fracción proteica del veneno de *B. asper* en la que predomine la presencia de metaloproteinasas hemorrágicas de alta masa molecular.
- Estandarizar una prueba *in vitro* para determinar la capacidad neutralizante de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops asper*.
- Determinar la capacidad inhibitoria de varios lotes de suero antiofídico producidos en el Instituto Clodomiro Picado sobre la actividad proteolítica del veneno total de *B. asper* y la fracción hemorrágica de alta masa molecular.
- Establecer una correlación entre los datos de neutralización de la actividad proteolítica y los datos de neutralización de la letalidad de los diferentes lotes de suero antiofídico utilizados en este estudio.

JUSTIFICACIÓN

Es importante implementar una o varias pruebas *in vitro* y llevarlas en paralelo junto con la prueba de neutralización de la letalidad, para contar con un buen número de datos que permita tomar decisiones en términos de sustituir la prueba existente o ampliar los criterios para liberar los sueros.

Al obtener una prueba con resultados confiables y reproducibles que correlacione con la prueba de neutralización de la letalidad que se realiza actualmente en la etapa de inmunización de los caballos y durante el fraccionamiento del plasma, se aseguraría con mayor certeza la calidad de los antivenenos producidos en el Instituto. Esto traería un beneficio directo en la terapia del accidente ofídico, ya que el suero antiofídico es el principal y más directo recurso en el tratamiento del envenenamiento por serpientes. Además, se disminuyen costos en el Instituto, ya que la prueba de neutralización de la letalidad resulta una prueba cara por el alto número de animales de laboratorio que se deben emplear.

Finalmente las tendencias actuales de bioética y protección de animales apuntan a evitar al máximo el uso de animales en ensayos de laboratorio si existen o se pueden desarrollar métodos *in vitro* que provean de resultados confiables y que correlacionen con la prueba *in vivo*. Al restringir el uso de la prueba de neutralización de la letalidad para el análisis final del suero antiofídico e implementar la técnica *in vitro* en la evaluación del mismo durante las diferentes etapas de la producción se evitaría, en primer lugar, el uso de un alto número de ratones, y en segundo lugar el sufrimiento innecesario y la muerte de muchos animales de laboratorio.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Venenos

El veneno de *B. asper* constituye un pool obtenido de aproximadamente 40 especímenes adultos colectados en las regiones del Pacífico y Atlántico de Costa Rica y mantenidos en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado (ICP). Posterior a su obtención, el veneno fue liofilizado y mantenido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó para la investigación la mezcla de venenos patrón de la serpiente *B. asper* utilizada por el Laboratorio de Control de Calidad del Instituto Clodomiro Picado para realizar las pruebas de neutralización de la letalidad.

Sueros antiofídicos

Se trabajó con suero antiofídico polivalente (lotes 3470602LQ, 3540303LQ, 3560603LQ, 3651003LQ, 3730804LQ y 3590703LQ para la metodología con caseína biotinilada y lotes 3750205LQ, 3760305LQ, 3800705LQ, 3820805LQ, 3830905LQ, 3680104LQ, 3730804LQ, 3741104LQ, 3920206LQ, y 3940306LQ para la metodología con azocaseína). Los diferentes lotes de suero fueron obtenidos mediante la inmunización de caballos con una mezcla de partes iguales de venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* y *Lachesis stenophrys* de Costa Rica y fueron suministrados por la División de Producción del Instituto Clodomiro Picado. Este suero antiofídico está compuesto de moléculas completas de IgG, purificadas por precipitación con ácido caprílico, de acuerdo a Rojas *et al.* (1994).

Separación cromatográfica de una fracción hemorrágica de alta masa molecular del veneno de *Bothrops asper*

Las proteínas del veneno de *Bothrops asper* fueron separadas de acuerdo a su masa molecular mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA). Muestras de veneno disueltas en 2 ml (75 mg) de amortiguador Tris-HCl 0.025 M, CaCl₂ 5mM, pH 7.4; fueron separadas en la columna a un flujo de 0.2 ml/min. Las diferentes fracciones obtenidas en el cromatograma fueron recolectados para determinar posteriormente su actividad hemorrágica y seleccionar la fracción de interés

Evaluación de la actividad hemorrágica de las fracciones obtenidas

Se evaluó la actividad hemorrágica según la prueba descrita por Kondo *et al.* (1963) y modificada por Gutiérrez *et al.* (1985). Se inyectaron grupos de cuatro ratones (18-20g) por la vía intradérmica en la región abdominal con 100 µL de cada una de las fracciones obtenidas en el cromatograma para seleccionar una fracción de alta masa molecular y con actividad hemorrágica potente. Dos horas después de la inyección, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂, la piel fue removida y se determinó la presencia de un halo hemorrágico en el lado interno de la piel. Con base en los resultados obtenidos se seleccionó la fracción 1 para el presente estudio y se estimó la Dosis Hemorrágica Mínima de esta fracción inyectando varias dosis de la misma disueltas en 100 µL de PBS. Dos horas después de la inyección, los animales fueron sacrificados y se determinó el diámetro del área hemorrágica en el lado interno de la piel. La Dosis Hemorrágica Mínima se definió como la cantidad de fracción que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro a las 2 horas (Gutiérrez *et al.*, 1985).

Análisis electroforético

La fracción cromatográfica 1 del veneno de *Bothrops asper* fue analizada mediante electroforesis en geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970), utilizando geles al 12%, en condiciones reductoras. En paralelo se corrieron marcadores de peso molecular (Pharmacia) y los geles fueron teñidos con azul de Coomasie R-250.

Neutralización de la actividad proteolítica

Para evaluar la neutralización de la actividad proteolítica del veneno total y de la fracción de alta masa molecular, por parte de los antivenenos, se probaron dos metodologías: un ensayo con caseína biotinilada y un ensayo con azocaseína.

Ensayo proteolítico con caseína biotinilada

Se utilizó una modificación del ensayo altamente sensible descrito por Koritsas y Atkinson (1995) y utilizado en la caracterización de una metaloproteinasa hemorrágica del veneno de *B. asper* por Franceschi *et al.* (1999), con N, N-dimetilcaseína (Sigma, Missouri, EUA) biotinilada como sustrato. Este ensayo consiste en recubrir placas de 96 hoyos con caseína biotinilada sobre la cual se aplica la muestra con actividad proteolítica, posteriormente se aplica un conjugado avidina-peroxidasa y un sustrato cromogénico y se determina el porcentaje de degradación de la caseína biotinilada.

Biotinilación de la caseína

Para la biotinilación, se agregó N-hidroxisuccinimido-biotina (10 mg/ml en DMSO) a una solución de caseína 1 mg/ml, preparada en buffer de NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,5. La solución se incubó por 18 horas a 37 °C con agitación constante, posteriormente se diluyó con amortiguador de recubrimiento (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 9,0) y se ultrafiltró para remover la biotina libre y se concentró en un

volumen final de 10 ml. La concentración proteica se estimó midiendo la absorbancia a 280 nm.

Selección de las condiciones del ensayo

Se evaluaron las condiciones óptimas de concentración de caseína biotinilada, concentración de conjugado y tiempo de incubación con las muestras para determinar los valores más adecuados que aseguraran la linealidad y estabilidad del método.

Selección de dosis reto y prueba de neutralización

Placas de ELISA (Immulon 2, Dynatech, Virginia, USA) se recubrieron con 100 ng de caseína biotinilada, disuelta en amortiguador de recubrimiento. Después de 24h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron con PBS-Tween 0,05 % (v/v) y los sitios libres en los pocillos plásticos fueron bloqueados con 100 μ l de una solución 2 g/dl de albúmina sérica bovina (en PBS) por 20 min. a temperatura ambiente. Después de cinco lavados adicionales con PBS-Tween, 100 μ l de muestra preparada en PBS fue agregada. Todas las muestras se corrieron por triplicado. Para cada placa se preparó una curva de calibración, agregando 100 μ l de buffer de recubrimiento que contenía diversas cantidades de caseína biotinilada (de 0 a 100 ng).

Inicialmente se obtuvo la curva dosis respuesta para el veneno y para la fracción de alta masa molecular y se seleccionó una cantidad de veneno y de fracción que degradara aproximadamente el 50% de la caseína biotinilada y con esa cantidad se evaluaron los diversos sueros. Los experimentos de neutralización se efectuaron incubando la cantidad de veneno y fracción seleccionada anteriormente con diversas diluciones de los sueros. En las mezclas de incubación se utilizaron las siguientes proporciones suero antiofídico/veneno: 1000, 500, 250, 125, 62 y 31 μ l/mg. Las mezclas se incubaron por 30 min a 37 °C y posteriormente

se añadieron a la placa. Una vez que se agregaron las muestras, la placa se incubó por 24h a 37 °C. Seguidamente las placas se lavaron y se agregó 100 µl del conjugado avidina-peroxidasa (Sigma), diluido 1:8000 con PBS y se incubó por 30 min a 25 °C. Después de cinco lavados adicionales, se adicionó 100 µl de la solución sustrato (2 mg/ml O-fenilendiamina, 0,012% H₂O₂ en citrato de sodio 0,1 M, pH 5,0) y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de HCl 2 M y se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas Dynatech MR 5000.

Ensayo proteolítico con azocaseína

Se utilizó una modificación del ensayo utilizado por Wang *et al* (2004), el cual consiste en determinar la actividad proteolítica o la inhibición de la misma a partir de la hidrólisis de la azocaseína (Sigma A2765). La degradación de la caseína libera un colorante-azo al sobrenadante, el cual puede ser analizado cuantitativamente. Se preparó una solución de azocaseína de 5 mg/ml en amortiguador Tris-HCl 25 mM, NaCl 0.15 M y CaCl₂ 5 mM, pH 7.4. Se mezclaron 100 µl de azocaseína con 20 µl de la muestra a probar, ya sea el veneno total, la fracción de alta masa molecular o mezclas del veneno o la fracción con los diferentes lotes de suero antiofídico, por triplicado.

En primer lugar se obtuvo la curva dosis-respuesta para el veneno y para la fracción de alta masa molecular y se determinó como una unidad proteolítica la cantidad de veneno o fracción que indujo un cambio en la señal de 0.3 unidades de absorbancia a 450 nm. Para la prueba de neutralización, los antivenenos fueron retados con una unidad proteolítica del veneno o la fracción. Las proporciones suero/veneno utilizadas fueron: 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62.5 µl/mg; éstas se incubaron por 30 min a 37 °C y posteriormente se aplicó 20 µL de cada una de las mezclas a la solución de azocaseína, por triplicado. Se utilizó 20 µL del amortiguador de dilución como control negativo. Seguidamente se

incubaron por 90 min a 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación, se agregó a cada tubo 200 μ l de ácido tricloroacético al 5%, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 1000 rpm. Posteriormente se mezclaron 150 μ l del sobrenadante con 150 μ l de NaOH 0.5 M en placas de ELISA. Finalmente se determinó la absorbancia a 450 nm, en un lector de ELISA Dynatech MR-5000. Se incluyó en cada experimento un control únicamente con veneno que constituye el 100% de la actividad y con base en este se determinó la DE_{50} para cada suero, definida como la razón suero/veneno necesaria para neutralizar el 50% de la actividad del veneno o fracción.

Análisis Estadístico

La prueba de t de Student se utilizó para determinar si los valores promedio de dos grupos experimentales son significativamente diferentes.

Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica y la neutralización de la letalidad

Los datos de neutralización generados por los métodos para medir actividad proteolítica fueron comparados con los datos de neutralización de la letalidad obtenidos a partir de la prueba *in vivo* de neutralización de la letalidad (suministrados por el Laboratorio de Control de Calidad del ICP), utilizando el programa estadístico INSTAT2, con el fin de determinar la correlación entre ambas metodologías.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Separación cromatográfica de la fracción de alta masa molecular y análisis electroforético

Cuando el veneno de *Bothrops asper* fue fraccionado en una columna Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences) mediante cromatografía de filtración en gel, se separaron cinco fracciones claramente definidas (Fig 1).

La fracción 1 presentó una fuerte actividad hemorrágica ya que la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) es inferior a los 0.625 μg /100 μl , mientras que el veneno total de *Bothrops asper* de la región del Pacífico tiene una DHM de 3 μg /100 μl y el de la región del Atlántico una DHM de 2 μg /100 μl . El análisis electroforético de esta fracción muestra que está constituida por proteínas de alta masa molecular (Fig 2).

Estas características demuestran que esta fracción está compuesta por metaloproteinasas hemorrágicas de alta masa molecular, razón por la cual fue seleccionada para los estudios de neutralización.

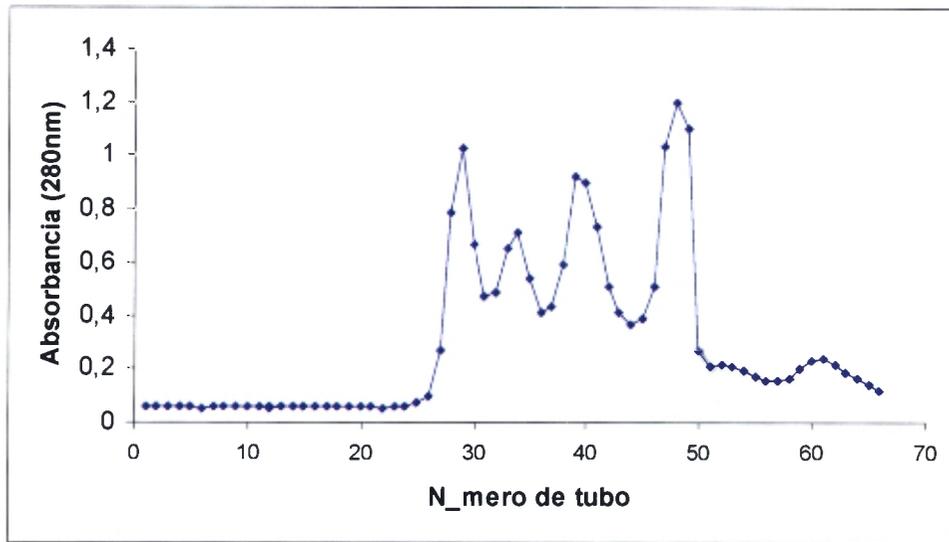


Fig. 1. Fraccionamiento del veneno de *B. asper* mediante filtración en gel en una columna Sephacryl S-200. El veneno (75 mg) fue disuelto en amortiguador Tris-HCl 0.025 M, CaCl₂ 5mM, pH 7.4 y fue separado a un flujo de 0.2 mL/min.

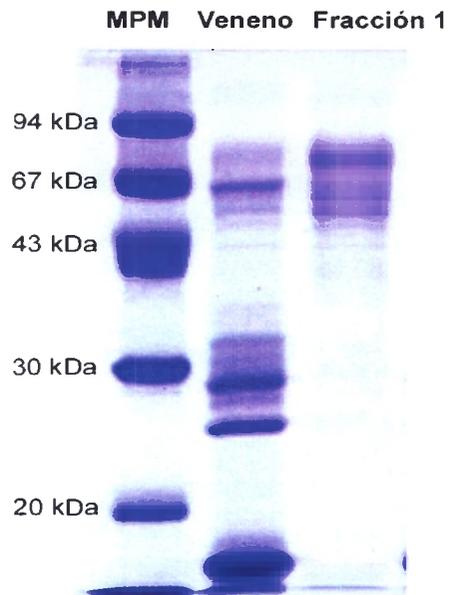


Fig. 2. Electroforesis SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras del veneno total de *Bothrops asper* y de la fracción de alta masa molecular

Ensayo proteolítico con caseína biotinilada

Estandarización de condiciones

Se determinaron las condiciones óptimas de concentración de caseína biotinilada (100ng/100µl) concentración de conjugado avidina-peroxidasa (1:8000 disuelto en PBS) y tiempo de incubación de las muestras en la placa (24h) para el ensayo de actividad proteolítica sobre caseína biotinilada.

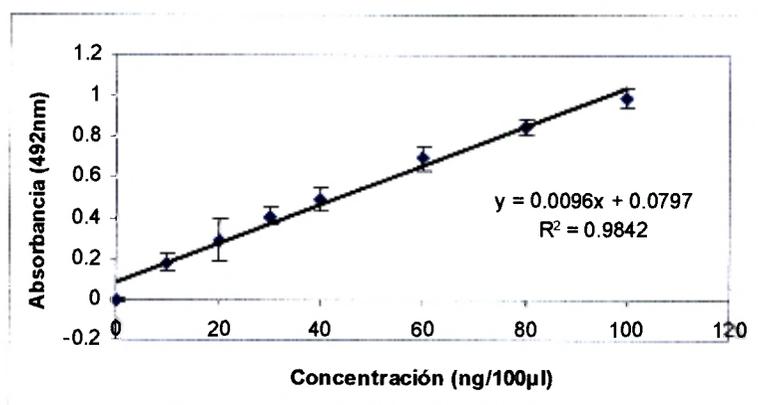


Fig.3. Curva de caseína biotinilada. Diferentes cantidades de caseína biotinilada (de 0 a 100 ng) preparadas en 100 µl amortiguador de recubrimiento (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 9,0) se utilizaron para estandarizar las condiciones del ensayo.

Actividad proteolítica del veneno total de *Bothrops asper* y de una fracción de alta masa molecular

En las figuras 4 y 5 se presentan los porcentajes de actividad proteolítica sobre la caseína biotinilada de diferentes concentraciones de veneno total y de la fracción de alta masa molecular y sus respectivas desviaciones estándar. Cada ensayo fue realizado por triplicado. Se observa una respuesta dosis dependiente entre la concentración de veneno o fracción y el porcentaje de hidrólisis de la

caseína biotinilada. Además se observa una actividad proteolítica levemente mayor para el veneno total.

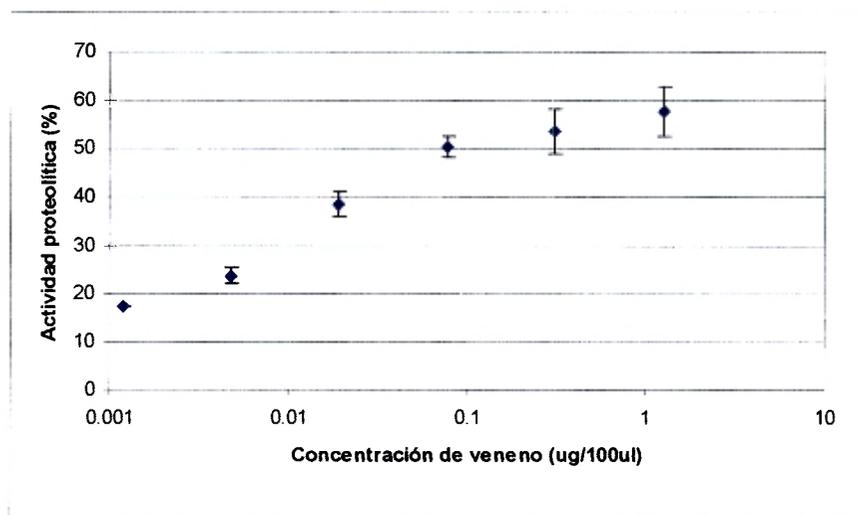


Fig. 4 Actividad proteolítica del veneno total de *B. asper*. Diferentes dosis (de 1,25 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ a 0.0012 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) disueltas en amortiguador de recubrimiento (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 9,0) fueron evaluadas para determinar su actividad proteolítica.

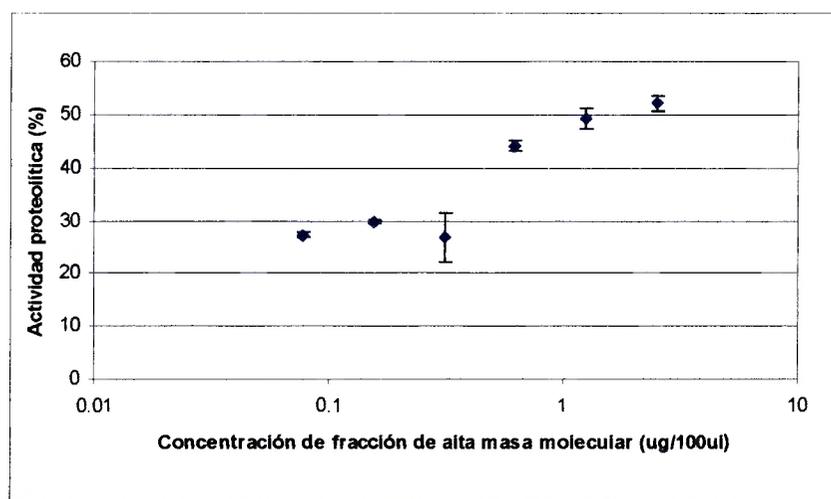


Fig 5. Actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular del veneno de *Bothrops asper*. Diferentes dosis (de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0.078 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) disueltas en amortiguador de recubrimiento (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 9,0) fueron evaluadas para determinar su actividad proteolítica.

Neutralización de la actividad proteolítica

La capacidad neutralizante de seis lotes de suero antiofídico fue evaluada mediante el ensayo de actividad proteolítica con caseína biotinilada contra el veneno total y la fracción de alta masa molecular. En las siguientes figuras se expresan los valores de inhibición de la actividad proteolítica, como los porcentajes totales de inhibición por parte de cada suero. Asumiendo que la señal de la caseína biotinilada libre representa un 100%, se observa la disminución de la señal por la actividad enzimática del veneno y el posterior aumento de la misma por el efecto inhibitorio de los sueros antiofídicos. Todos los sueros muestran un porcentaje de inhibición similar tanto para la fracción como para el veneno completo, sin embargo las variaciones en la prueba impidieron determinar la DE_{50} para cada lote.

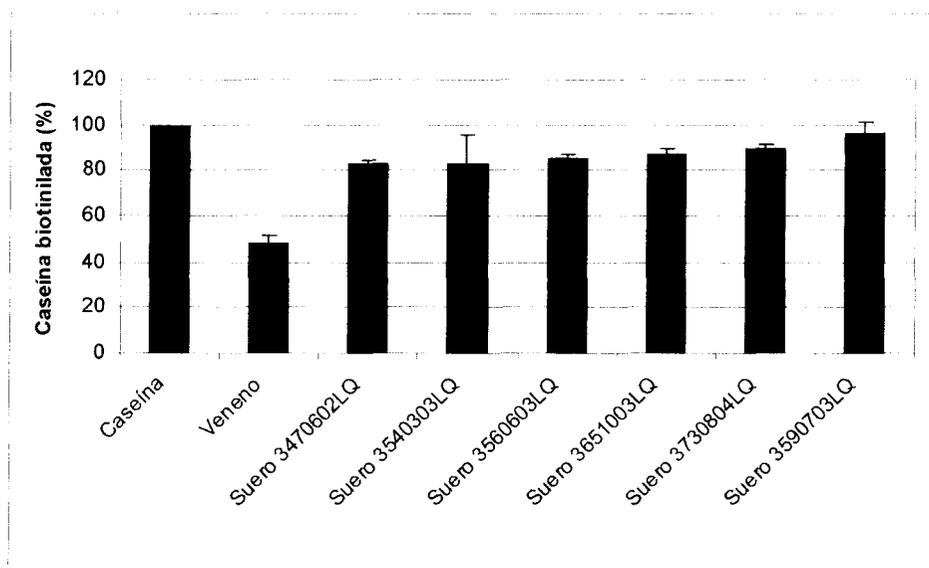


Fig. 6. Capacidad neutralizante de diferentes lotes de suero antiofídico sobre la actividad proteolítica del veneno total de *B. asper*. Se utilizó la proporción de 1000 μ l de suero por mg de veneno para determinar la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos.

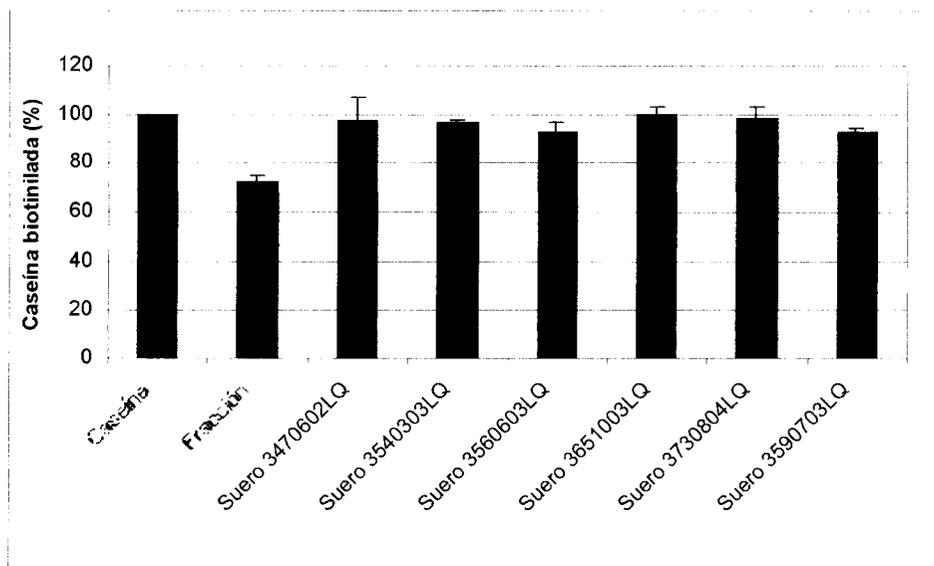


Fig. 7. Capacidad neutralizante de diferentes lotes de suero antiofídico sobre la actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular del veneno de *B. asper*. Se utilizó la proporción de 1000 μ l de suero por mg de veneno para determinar la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos.

Ensayo proteolítico con azocaseína

Actividad proteolítica del veneno total de *Bothrops asper* y de una fracción de alta masa molecular

En las figuras 8 y 9 se presentan los valores de actividad proteolítica sobre la azocaseína de diferentes cantidades de veneno total y de la fracción de alta masa molecular. Cada ensayo fue realizado por triplicado. Se observa una respuesta dosis dependiente entre la concentración de veneno o fracción y el porcentaje de hidrólisis de la azocaseína. Además se observa una actividad proteolítica mayor para el veneno total, igualmente a como se determinó con el método de caseína biotinilada.

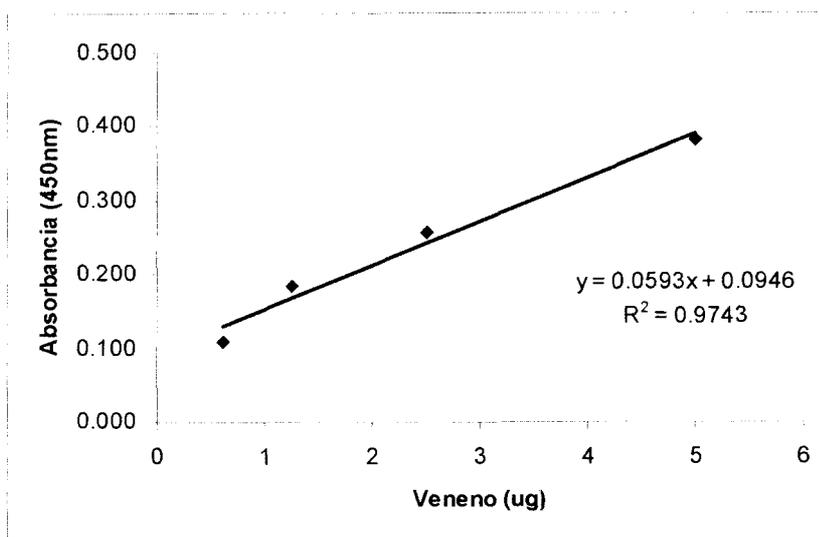


Fig. 8. Actividad proteolítica del veneno total de *B. asper*. Se mezclaron 100 μ l de azocaseína preparada en amortiguador Tris-HCl 25 mM, NaCl 0.15 M y CaCl_2 5 mM, pH 7.4 con 20 μ l de diferentes dosis de veneno (de 5 a 0.625 μ g) para determinar su actividad proteolítica.

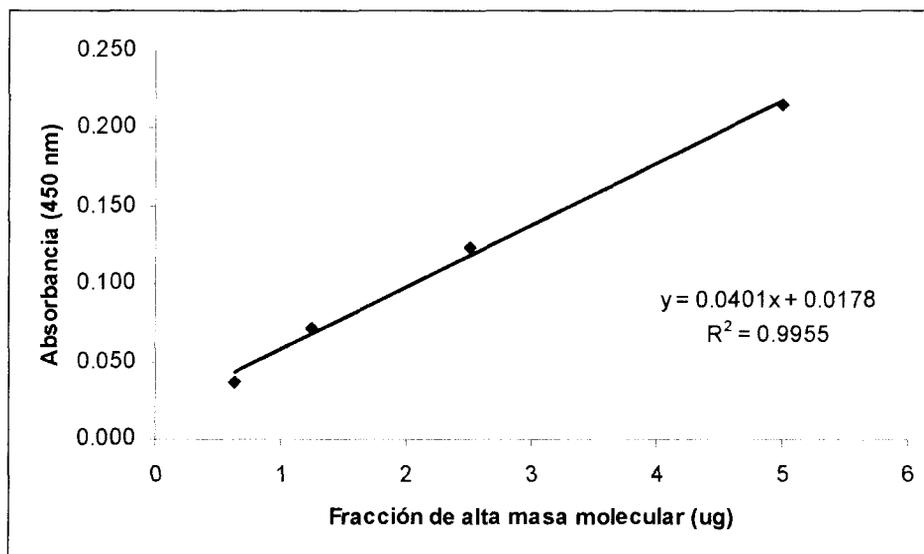


Fig. 9. Actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular del veneno de *B. asper*. Se mezclaron 100 µl de azocaseína preparada en amortiguador Tris-HCl 25 mM, NaCl 0.15 M y CaCl₂ 5 mM, pH 7.4 con 20 µl de diferentes cantidades de fracción de alta masa molecular (de 5 a 0.625 µg) para determinar su actividad proteolítica.

Neutralización de la actividad proteolítica

Diez lotes de suero antiofídico fueron analizados mediante el ensayo de actividad proteolítica con azocaseína contra el veneno total y la fracción de alta masa molecular. Se observó una neutralización dosis dependiente para todos los lotes estudiados; en las Fig. 10 y 11 se presentan las curvas obtenidas con uno de los lotes analizados. Los valores de inhibición de la actividad proteolítica, expresados como la dosis efectiva 50% (DE₅₀), es decir la proporción suero antiofídico/veneno en la que el efecto proteolítico es reducido en un 50%, se presentan en el cuadro 1.

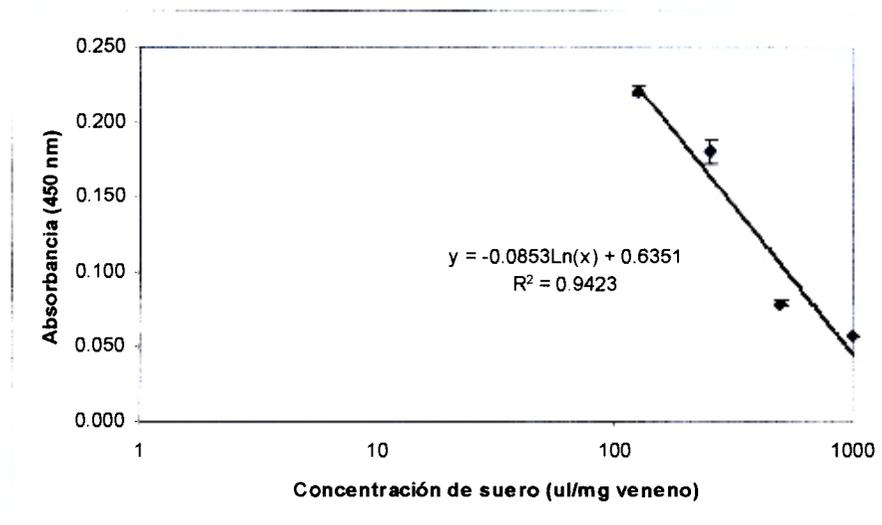


Figura 10. Curva dosis-respuesta con el veneno total para el lote de suero 3800705LQ. Se prepararon diferentes mezclas suero antiofídico/veneno (1000, 500, 250 y 125 μ l por mg de veneno) las cuales se incubaron por 30 min. Posteriormente 20 μ l se agregaron a 100 μ l de azocaseína para determinar la capacidad neutralizante del suero antiofídico sobre el veneno.

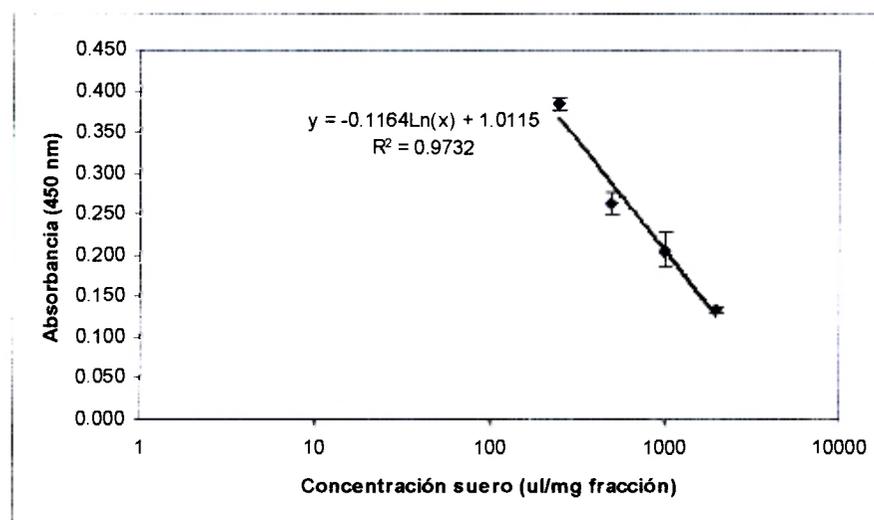


Figura 11. Curva dosis-respuesta con la fracción de alta masa molecular para el lote de suero antiofídico 3800705LQ. Se prepararon diferentes mezclas suero antiofídico/fracción (2000, 1000, 500 y 250 μ l por mg de veneno) las cuales se incubaron por 30 min. Posteriormente 20 μ l se agregaron a 100 μ l de azocaseína para determinar la capacidad neutralizante del suero antiofídico sobre la fracción.

Cuadro 1. Neutralización de la actividad proteolítica por parte de 10 lotes de suero antiofídico, mediante el método de azocaseína

Suero Antiofídico	Neutralización del veneno (+/- DE)*	Neutralización de la fracción de alta masa molecular (+/- DE)*	DE ₅₀ para efecto letal**
3750205LQ	234 (+/- 3)	1019 (+/- 49)	4.28
3760305LQ	160 (+/- 72)	967 (+/- 49)	3.15
3800705LQ	87 (+/- 4)	882 (+/- 43)	4.84
3820805LQ	177 (+/- 53)	1133 (+/- 104)	2.82
3830905LQ	251 (+/- 49)	1134 (+/- 66)	2.31
3680104LQ	214 (+/- 2)	961 (+/- 63)	3.67
3730804LQ	140 (+/- 51)	1025 (+/- 30)	3.60
3741104LQ	129 (+/- 60)	982 (+/- 71)	2.98
3920206LQ	52 (+/- 5)	646 (+/- 25)	4.78
3700104LQ	67 (+/- 5)	732 (+/- 34)	2.74

*: µl de suero antiofídico/mg de veneno que disminuye en un 50% el efecto proteolítico.

** : mg de veneno neutralizados por ml de suero antiofídico.

Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica y la neutralización de la letalidad

En el cuadro anterior también se comparan los datos de neutralización de la actividad proteolítica con los datos de neutralización de la letalidad obtenidos a partir de la prueba *in vivo* de neutralización de la letalidad (suministrados por el Laboratorio de Control de Calidad del ICP), con el fin de determinar la correlación entre ambas metodologías. Los datos de neutralización de letalidad se expresan como mg de veneno neutralizados por ml de suero antiofídico.

En las siguientes figuras se determina de una manera lineal, la correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica según metodología empleada y la neutralización de la letalidad. No se observó ninguna correlación ni con la fracción ni con el veneno entre la metodología *in vitro* que utiliza azocaseína como sustrato y la prueba *in vivo* de neutralización de la letalidad.

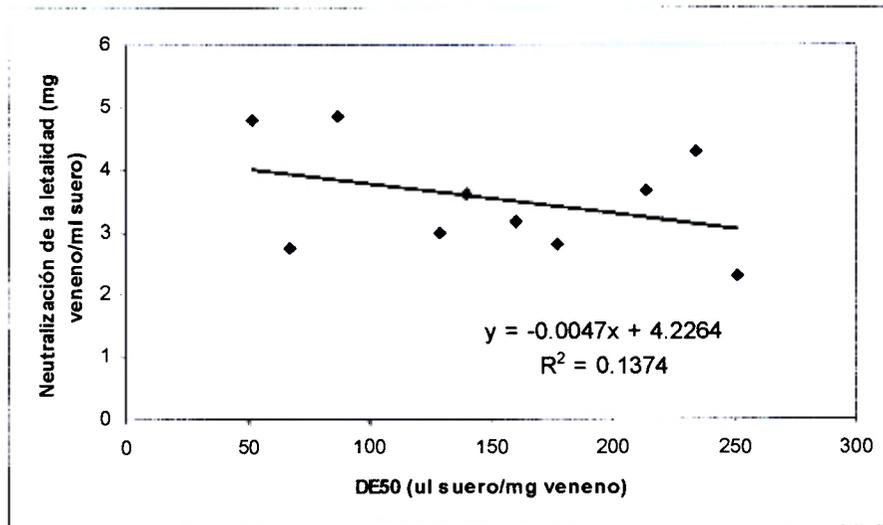


Fig. 12. Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica del veneno total y la neutralización de la letalidad.

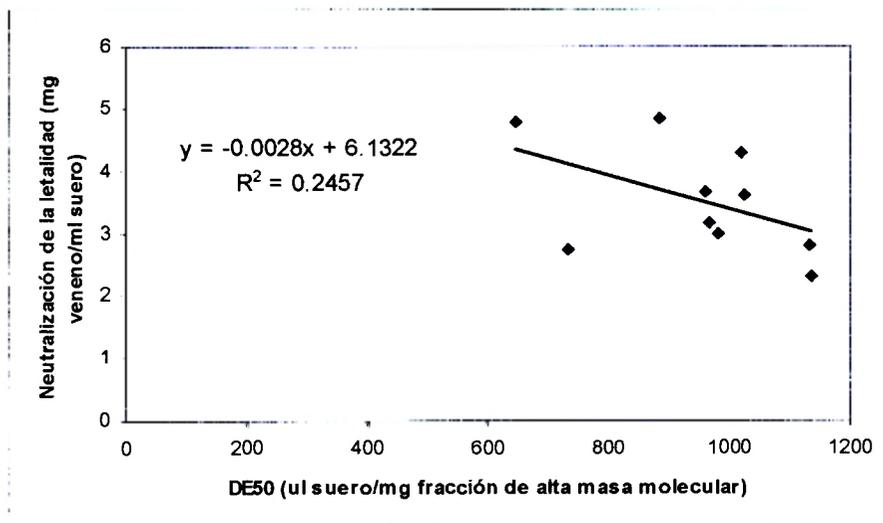


Fig. 13. Correlación entre la neutralización de la actividad proteolítica de la fracción de alta masa molecular y la neutralización de la letalidad.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la capacidad neutralizante de diferentes lotes de suero antiofídico sobre la actividad proteolítica del veneno total y de una fracción de alta masa molecular del veneno de la serpiente *Bothrops asper*, además, determinar su correlación con la prueba *in vivo* de neutralización de la letalidad. Bajo este panorama se eligieron dos metodologías que determinan actividad proteolítica, una con caseína biotinilada y otra con azocaseína como sustratos.

La primera prueba utilizada fue la de actividad proteolítica sobre caseína biotinilada siguiendo el método descrito por Koritsas y Atkinson (1995). En primer lugar se estandarizó la técnica, determinando las condiciones óptimas de concentración de sustrato, concentración de conjugado y tiempo de incubación. Posteriormente se determinó la actividad proteolítica del veneno total y de la fracción de alta masa molecular, además de la capacidad inhibitoria de los lotes de suero antiofídico.

Esta técnica resultó ser muy variable, ya que no se logró obtener una curva dosis-respuesta adecuada con las diferentes concentraciones de suero antiofídico, lo que no permitió obtener la Dosis Efectiva 50% (DE₅₀). Los resultados de inhibición que se obtuvieron con los diferentes lotes de suero analizados, demuestran que la técnica permite, en términos generales, determinar si un suero es capaz de neutralizar pero no permite establecer comparaciones entre distintos lotes de suero debido a que se trata de una técnica muy variable y difícil de estandarizar.

Debido a las dificultades que presentó la primera metodología para ser estandarizada y para poder determinar la DE₅₀ de los sueros antiofídicos, se eligió el ensayo de actividad proteolítica que utiliza azocaseína como sustrato, descrito

por Wang *et al* (2004), para evaluar la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos. Comparativamente, el ensayo con caseína biotinilada es más sensible, pero la metodología con azocaseína es una técnica mucho más simple de llevar a cabo, que no incluye pasos críticos de estandarizar como la biotinilación de la caseína, y que además requiere de menos tiempo ya que mientras el primer ensayo se lleva a cabo durante 3 días por tener incubaciones de hasta 24 horas, la técnica con azocaseína se realiza en 3 horas. Además es una técnica mucho más estable, por lo que presentó una excelente linealidad comparándola con el ensayo con caseína biotinilada.

Mediante esta técnica se pudo determinar la DE_{50} para 10 lotes de suero antiofídico, tanto para el veneno total como para la fracción de alta masa molecular. En los resultados obtenidos (cuadro 1) se observa que en general es necesario un mayor volumen de suero para poder neutralizar la fracción de alta masa molecular que el veneno total. Este comportamiento es contrario a lo esperable, ya que las toxinas incluidas en la fracción son metaloproteinasas hemorrágicas de alta masa molecular, que deberían ser más inmunogénicas que las proteinasas de baja masa molecular. Al ser mayores los valores de DE_{50} para la fracción de alta masa molecular en comparación con el veneno total, se podría pensar que en el suero antiofídico hay más anticuerpos dirigidos contra las toxinas de baja masa molecular, más abundantes en el veneno total, que contra las de alta masa molecular. Esto puede deberse a un efecto de dosis que sucede durante el proceso de inmunización llevado a cabo en el caballo, al inyectarse la mezcla de inmunización en el animal, el sistema inmunológico del mismo reacciona más fuerte con las toxinas de baja masa molecular, que son más abundantes, que con las toxinas de alta masa molecular, presentes en menor concentración, por lo que se generan menos anticuerpos contra estas últimas.

A su vez es importante mencionar que se presentó una diferencia significativa en la cantidad de suero necesaria para obtener la DE_{50} con respecto al veneno total y a la fracción de alta masa molecular, se necesita una mayor

cantidad de suero antiofídico para poder neutralizar la fracción de alta masa molecular que el veneno total, por ejemplo para el suero 3920206LQ la DE_{50} fue de 52 μ l por mg de veneno total y de 646 μ l por mg de fracción de alta masa molecular. Esto puede ser simplemente un efecto de dosis de las toxinas, sin embargo es importante considerarlo. Esto es un aspecto importante a considerar, ya que esa fracción purificada contiene las principales toxinas implicadas en la hemorragia, actividad fundamental en el proceso de letalidad. Esta información producida, que se necesitaría mayor cantidad de suero para inhibir esa fracción hemorrágica de alta masa molecular en comparación con el veneno total, es útil e importante ya que podría permitir la evaluación de los esquemas de inmunización llevados a cabo en los caballos, durante el proceso de producción del suero antiofídico, esto con el fin de que, quizás añadiendo una mayor cantidad de estas toxinas de alta masa molecular a la mezcla de inmunización, paulatinamente podrían mejorar los títulos de suero antiofídico que neutralizan esta fracción hemorrágica, y por ende eso derivaría en un suero con mayor capacidad de inhibir *in vivo* la actividad hemorrágica, implicada directamente en el proceso de letalidad.

Posteriormente se determinó que no existe una correlación entre la inhibición de la actividad proteolítica sobre azocaseína y la neutralización de la letalidad. Gutiérrez *et al.* (1985) tampoco encontraron una correlación entre la inhibición de la actividad proteolítica y la neutralización de la actividad hemorrágica. El hecho de no haber encontrado una correlación puede deberse a que en el veneno existen proteinasas no hemorrágicas. Dada la importancia de las metaloproteiniasas de alta masa molecular en la muerte de los animales se hubiera esperado encontrar correlación, sin embargo la no correlación puede también estar asociada al hecho de que la neutralización de la letalidad sea tan variable y no evalúe efectos fisiopatológicos específicos sino simplemente la muerte. Esto puede deberse a que el método *in vivo* es una técnica que produce resultados variables y difíciles de reproducir.

A pesar de la no correlación los métodos *in vitro* presentan una serie de ventajas con respecto a los métodos *in vivo*. Por ejemplo se requiere menos tiempo para llevar a cabo la prueba, se evita utilizar un gran número de animales de laboratorio y también se evita la muerte y el sufrimiento de un gran número de ratones. Debido a estas razones expresadas es que las técnicas *in vitro* son idóneas para evaluar la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos (Sells, 2003)

A futuro, sería importante implementar un esquema de metodologías *in vitro* que evaluaran la inhibición de diferentes actividades específicas del veneno claves en el proceso de letalidad para poder determinar la capacidad neutralizante de los lotes de suero antiofídico contra cada actividad específica pudiendo eventualmente sustituir la prueba de neutralización de la letalidad. Y dentro de este panorama, la técnica de actividad proteolítica sobre azocaseína es una metodología idónea para ser utilizada en la evaluación de la neutralización de la actividad proteolítica. Este efecto es importante evaluarlo, ya que la actividad hemorrágica, que tiene un rol preponderante en la letalidad (Rucavado et al., 2004), depende de la actividad proteolítica sobre las proteínas de la membrana basal (Hati et al., 1999)

Desde 1985, cuando Gutiérrez *et al.* evaluaron la neutralización de la actividad proteolítica y hemorrágica del veneno total de diferentes especies de serpientes, no se realizaba una investigación de este tipo. Esta investigación actual evalúa, además del veneno total, la capacidad inhibitoria sobre una fracción de alta masa molecular que contiene las principales toxinas hemorrágicas. El impacto de esta línea de investigación y de esta investigación como tal, es fundamentalmente tecnológico, ya que se pretende que a un mediano plazo se determine la capacidad neutralizante de un determinado suero antiofídico, evaluando la neutralización de actividades específicas mediante técnicas *in vitro* que desplacen a la prueba actual de neutralización de la letalidad, que conlleva problemas de reproducibilidad y de uso de animales de laboratorio; así al evaluar

actividades específicas en conjunto se podría llevar a cabo una inmunización mucho más específica de los caballos, mejorar los títulos de neutralización, y por ende producir un suero antiofídico mucho más potente y por lo tanto con efectos en el individuo que sufrió un accidente ofídico más inmediatos. Y dentro de esta perspectiva, la prueba de actividad proteolítica sobre azocaseína, es una metodología idónea, por su buena reproducibilidad, su facilidad para ser llevada a cabo y porque determina la capacidad de inhibir la actividad proteolítica, ya sea del veneno total o de una fracción del mismo, fundamental en el transcurso de la hemorragia, la cual es clave en el proceso de letalidad.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

La metodología de actividad proteolítica sobre caseína biotinilada es una técnica más sensible que la metodología que utiliza azocaseína como sustrato, sin embargo resultó ser muy variable y difícil de estandarizar. En cambio la técnica con azocaseína, a pesar de ser menos sensible, presenta una serie de ventajas, como el ser mucho más simple de llevar a cabo, el no incluir pasos críticos de estandarizar como la biotinilación de la caseína y el requerir menos tiempo, que la hacen preferible al ensayo con caseína biotinilada.

Con ambas metodologías se evidenció la neutralización de la actividad proteolítica, tanto del veneno como de la fracción de alta masa molecular. Sin embargo la variabilidad que presentó la técnica con caseína biotinilada no permitió obtener la DE_{50} de cada suero. Con el ensayo con azocaseína si se pudo obtener el valor de DE_{50} y se determinó que es necesaria una mayor cantidad de suero para inhibir la fracción de alta masa molecular que el veneno total. Esto puede deberse a un efecto de dosis, ya que el suero se enfrentó a una concentración mayor de fracción que la que se encuentra en el veneno total o también podría deberse a que el suero no está neutralizando tan bien las toxinas presentes en esta fracción, pero para demostrar esto se necesitaría enfrentar los sueros antiofídicos a la cantidad de la fracción purificada que se encuentra proporcionalmente en el veneno total.

No se obtuvo una correlación entre la neutralización de la letalidad y la neutralización de la actividad proteolítica mediante el método con azocaseína. Esto puede deberse a que la prueba de neutralización de la letalidad es una metodología muy variable, que produce resultados poco reproducibles y que además solamente evalúa la letalidad, valoración muy amplia, que no necesariamente evalúa la neutralización de todos los efectos fisiopatológicos producidos en un envenenamiento. La no correlación también puede deberse a

que se haya trabajado con un rango estrecho de valores de neutralización de la letalidad, todos comprendidos dentro de los mismos límites de confianza, por lo tanto serían necesarios valores más distantes para obtener una buena correlación.

Sería conveniente, que a un mediano plazo se determine la capacidad neutralizante de un determinado suero antiofídico, evaluando la neutralización de actividades específicas mediante técnicas *in vitro* que complementen o eventualmente sustituyan la prueba actual de neutralización de la letalidad y dentro de este panorama la prueba de actividad proteolítica sobre azocaseína, es una metodología idónea, por su buena reproducibilidad, su facilidad para ser llevada a cabo y porque determina la capacidad de inhibir la actividad proteolítica, ya sea del veneno total o de una fracción de alta masa molecular del mismo, fundamental en el transcurso de la hemorragia, la cual es clave en el proceso de letalidad.

REFERENCIAS

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.

Bee, A., Theakston, R.D.G., Harrison, R.A. & Carter S.D. (2001). Novel in vitro assays for assessing the haemorrhagic activity of snake venoms and for demonstration of venom metalloproteinase inhibitors. *Toxicon*. 39, 1429-1434.

Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 62, 325-372.

Bode, W., Gomis-Ruth, F.X., Stöcker, W. (1993). Astacins, serralysins, snake venoms and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". *FEBS Lett.* 331, 134-140.

Borkow, G., Gutiérrez, J.M. & Ovadia, M. (1993). Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 31, 1137-1150.

Chippaux, J. P. (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin World Health Organization* 76, 515-518.

de Roodt, A.R., Litwin, S., & Vidal, J.C. (2003). Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. *Toxicon*. 41, 949-958.

Escalante, T., Rucavado, A., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G. & Gutiérrez, J.M. (2004). *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by α_2 -macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. *Toxicon* 43, 213-217.

Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N. & Gutiérrez, J.M. (2000). Purification and characterization of BaH₄, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*. 38, 63-77.

Gené, J.A. & Robles, A. (1987). Determinación de la dosis letal 50% por el método de Spearman-Karber. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños (Costa Rica)*. 22, 35-40.

Gutiérrez, J.M. (1995). Clinical Toxicology of Snakebite in Central America. En: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (Meier, J., White, J., Eds.), pp. 653-655. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Gutiérrez, J.M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop.* 50, 377-394.

Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Rojas, G. & Cerdas, L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 23,887-893.

Gutiérrez, J.M., Ávila, C. Rojas, E. & Cerdas, L. (1988). An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26, 411-413.

Gutierrez, J.M., Romero, M., Nuñez, J., Chaves, F., Borkow, G., Ovadia, M. (1995a). Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a

hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp. Mol. Pathol.* 62, 28-41.

Gutiérrez, J.M., Romero, M., Díaz, C., Borkow, G., Ovadia, M. (1995b). Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 33, 19-29.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T. & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 45, 997-1011.

Hati, R., Mitra, P., Sarker, S., Bhattacharyya, K.K. 1999. Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol.* 29, 1-19.

Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., Osaka, A. 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 13, 43-51.

Koritsas, V.M. & Atkinson, H. J. (1995). An assay for detecting nanogram levels of proteolytic enzymes. *Analyt. Biochem.* 227, 22-26.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Maria, W.S., Cambuy, M.O., Costa, J.O., Velarde, D.T., Chávez-Olórtegui, C. (1998). Neutralizing potency of horse antiotheropic antivenom, correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon*. 36, 1433-1439.

Rojas, G., Jiménez, J.M. & Gutiérrez, J.M. (1994). Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. 32, 351-363.

Rucavado, A., Escalante, T. & Gutiérrez, J.M. (2004). Effect of metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinase in envenomation. *Toxicon*. 43, 417-424.

Rungsiwongse, J. & Ratanabanangkoon, K. (1991). Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against thai cobra venom. *J. Immune. Meth.* 136, 37-43.

Sasa, M. & Vazquez, S. (2003). Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon*. 41, 19-22.

Sells, P.G. (2003). Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. *Toxicon*. 42, 115-133.

Theakston, R.D.G. & Reid, H.A. (1979). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon* 17, 511-515.

Theakston, R.D.G., Warrell, D.A. & Griffiths, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 41, 541-557.

Wang, W.J., Shih, C.H. & Huang, T.F. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 324, 224-230.

Weisser, A., Hechler, U. (1997). Animal welfare aspects in the quality control of immunobiologicals. A critical evaluation of the animal tests in pharmacopoeial monographs, *ECVAM* and *the Paul Ehrlich Institut*. Nottingham, UK.