



ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS
VENENOS OFÍDICOS DE
IMPORTANCIA CLÍNICA Y ESTUDIO
BIOQUÍMICO DEL ACCIDENTE
OFÍDICO EN URUGUAY.

VICTOR MORAIS

Para Laura, Ana y Manuel

Agradecimientos.

Al Dr Hugo Massaldi.

A la Dra Patricia Berasain y a la Lic Silvana Ifrán

A todo el Dpto de Desarrollo Biotecnológico

A Santiago Carreira.

A la Dra Alba Negrín y a la Dra María Noel Tortorella

A todo el CIAT

Esta tesis fue financiada parcialmente por:

RESUMEN

RESUMEN

En Uruguay ocurren entre 50 y 70 accidentes por ofidios al año, todos causados por las especies *Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens*. El veneno de éstos ofidios es una mezcla compleja de proteínas y péptidos biológicos activos cuyo efecto tóxico se caracteriza principalmente por importantes alteraciones en la coagulación y daño local pronunciado en el miembro afectado por la mordedura.

A los fines médicos, la identificación de la especie del ofidio es secundaria puesto que la sintomatología es similar, el protocolo de aplicación es el mismo para ambos casos e incluye el mismo suero antiofídico polivalente o bivalente. Esto tiene considerables ventajas a la hora del tratamiento ya que aunque no se pueda observar la mordedura del ofidio (según el tipo de terreno a veces solo se siente el dolor), la presencia de sintomatología y la realización de los análisis clínicos correspondientes permiten indicar el inicio del tratamiento, que en todos los casos es a tiempo. Por otra parte esta importante ventaja puede inducir al error de considerar ambas especies como la misma y simplificar el accidente a solo una especie, cuando existen diferencias importantes entre las mismas.

Según su peso molecular y ensayos bioquímicos realizados las toxinas más abundantes en *Bothrops alternatus* corresponderían a la familia de metaloproteasas, principalmente del tipo PIII. Estas toxinas corresponden a casi 1/3 del total del veneno. Por otra parte el

componente más abundante detectado en *Bothrops pubescens* correspondería a una Fosfolipasa A2 con cerca de 1/3 del total de proteínas existente en el veneno.

En lo que refiere a la determinación de veneno en los pacientes, la cantidad promedio encontrada en la sangre de éstos al ingresar al sanatorio fue de 57 ng/mL, con un rango de 20 a 140 ng/mL. Tanto en Colombia como en Martinica los resultados son similares a los obtenidos en Uruguay.

Con relación a la determinación de la evolución de los niveles de suero antiofídico en los accidentados se detectan 2 tiempos de eliminación sumado a información perteneciente a referencia bibliográficas se puede presumir la existencia de al menos 4 tiempos distintos de eliminación del suero antiofídico el de distribución corporal, el de neutralización del veneno existente en sangre, el de neutralización del veneno que difunde de los tejidos, y el de eliminación del suero antiofídico excedente.

Por otra parte se pudo determinar la respuesta contra suero antiofídico. Éste genera una respuesta humoral en IgM e IgG contra las inmunoglobulinas de caballo en la mayoría de los pacientes a los cuales se les administra. La respuesta varía en un incremento del título de anticuerpos de 4 a más de 100 veces. Además existe una relación entre el título de anticuerpos anti suero antiofídico alcanzado en pacientes y la cantidad de viales de suero antiofídico administrado.

El veneno ofídico también genera una respuesta humoral pero de menor proporción que el suero antiofídico y principalmente de tipo IgM, a los 15 días. La respuesta humoral frente al veneno es contra la mayoría de, o todos, los componentes del veneno, detectándose reactividad cruzada entre ambos venenos en los anticuerpos desarrollados contra el veneno de una especie.

Contenido

	página
Resumen	4
Introducción	8
Materiales y Métodos	39
Objetivos	47
Resultados	50
Discusión	80
Conclusiones	94
Referencias	97
Anexos	117

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1 Especies peligrosas de Uruguay.

En el Uruguay existen 4 especies de ofidios potencialmente capaces de generar accidentes en humanos. Ellas son: Cascabel (*Crotalus durissus terrificus*), Coral (*Micrurus altirostris*), Crucera (*Bothrops alternatus*) y Yara (*Bothrops pubescens*). De éstas solo las 2 últimas son las causantes de accidentes a la fecha (Carreira *et al.* 2005).

La Coral pertenece a la familia Elapidae, de dentición proteroglifa, tamaño pequeño, y hábitos subterráneos. Esta serpiente se caracteriza por anillos completos claros y oscuros formando tríadas separadas entre sí por anillos más gruesos de color rojo. Debido a su pequeña apertura bucal, situación que le impide morder a humanos en zonas más expuestas como piernas y brazos, no se han registrado accidentes por esta especie. El riesgo aumenta considerablemente si la serpiente es manipulada o si tiene contacto con bebés o niños muy pequeños en los cuales aquella puede encontrar sitios delgados donde morder. Esta especie se encuentra distribuida por todo el país en zonas arenosas, pedregosas y praderas (MSP, 1989).

La Cascabel pertenece a la familia Crotalidae, posee dentición solenoglifa, un tamaño que puede superar el metro y medio, coloración oscura y posee el cascabel característico en su cola, formado por escamas. Es una víbora potencialmente muy peligrosa, de la cual no se registran casos al momento probablemente debido a su escaso número, encontrándose en peligro de extinción. Es de distribución restringida, encontrándose ejemplares en zonas de Maldonado y Lavalleja en el sur. y en Artigas, Rivera y Tacuarembó en el norte (Carreira *et al.* 2005).

Crucera y Yara son dos ofidios muy similares que pertenecen a la familia *Crotalidae*, y al género *Bothrops*. Debido a los cambios en la nomenclatura establecidos recientemente de acuerdo al trabajo de Fenwick *et al.* (2009), lo que antes representaba al género *Bothrops* en el Uruguay y en la región, fue dividido en diferentes géneros como son *Bothrops*, *Bothropoides* y *Rhinocerophis*. Actualmente se está volviendo atrás con la nomenclatura por lo que ambos ofidios vuelven denominarse *Bothrops* (Carrasco *et al.*, 2012) pero en alguna parte de esta tesis, así como en los artículos científicos publicados en ese período, estas especies como *Rhinocerophis alternatus* (Crucera) y *Bothropoides pubescens* (Yara). Ambos ofidios poseen dentición solenoglifa.

Bothrops alternatus llega a medir hasta 1,5 metros, se caracteriza por dibujos en C, vive preferentemente en zonas bajas, bañados o cercana a cursos de agua.

Bothrops pubescens generalmente no supera el metro de longitud, se caracteriza por dibujos romboidales y vive preferentemente en zonas altas de sierras y pedregales (Carreira *et al.* 2005).

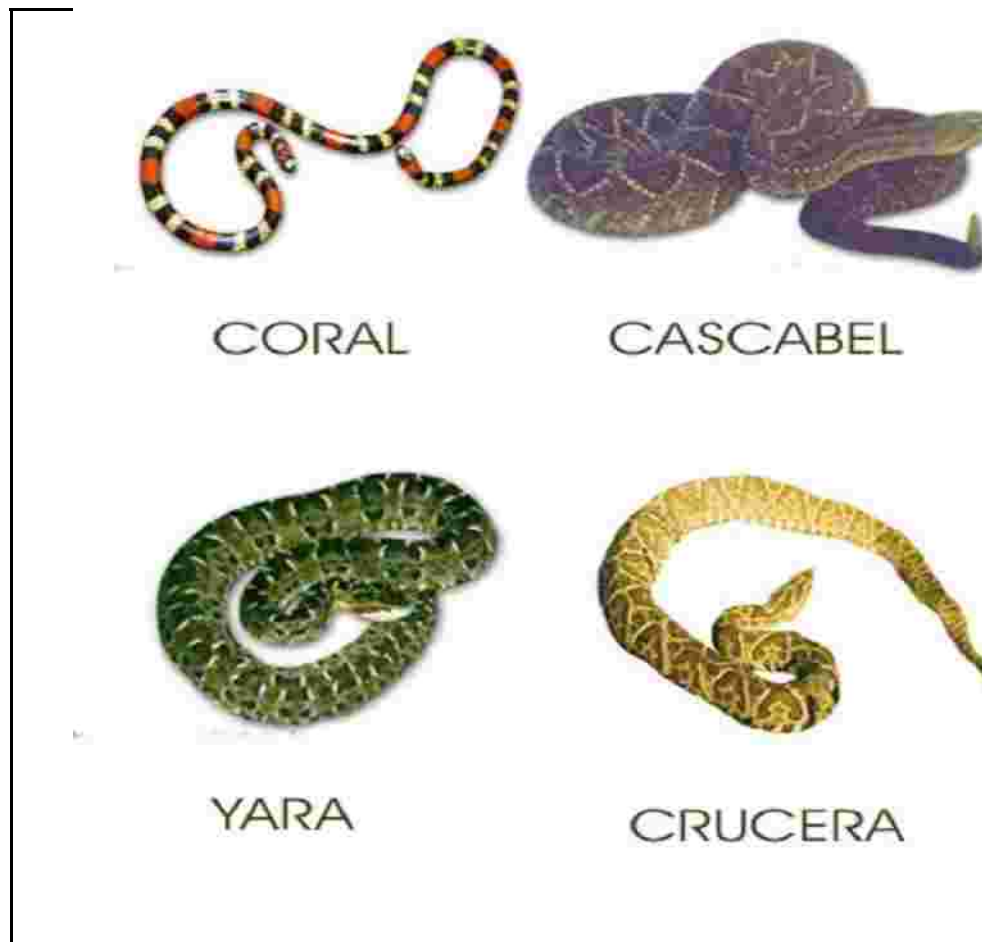


Figura i1. Ofidios peligrosos de Uruguay. foto: S. Carreira.

1.2 El accidente ofídico

El accidente ofídico, así como sus tasas de mortalidad y morbilidad, son de relativa importancia a nivel mundial, como se puede ver en la tabla i2. El número de accidentes está relacionado con la existencia de zonas donde conviven los ofidios con hombre. Por lo tanto, la mayor cantidad de accidentes a escala mundial corresponden a zonas rurales donde un gran número de personas comparten su hábitat con los ofidios (Blaylock 2004).

Un aspecto esencial, que guarda estrecha relación con cifras de mortalidad y morbilidad, es la capacidad sanitaria que tiene cada país para resolver el accidente. Como se puede ver en la tabla i2, países que tienen un buen sistema de respuesta y una buena disponibilidad de suero antiofidico tienen cifras bajas de mortalidad a pesar de tener un alto número de accidentes, como es el caso de EE.UU, Brasil y Australia. La situación inversa se vive en países del África subsahariana y algunos países asiáticos, donde una pobre respuesta sanitaria, sumada a la escasez de suero antiofidico, generan un problema de salud grave, con tasas de mortalidad elevadas. En un gran número de estos países se combinan las situaciones más desfavorables: una alta tasa de población en contacto con los ofidios (situación de riesgo) y una pobre respuesta. En el año 2008 la Organización Mundial de la Salud declaró al accidente ofídico dentro de la lista de “neglected diseases” (WHO, 2007)

El accidente ofídico en Uruguay.

En Uruguay ocurren entre 50 y 70 accidentes por año, todos causados por Crucera y Yara (figura i3), (Carreira *et al.*, 2008. La mortalidad es inferior al 1%, no encontrándose registros disponibles de las secuelas transitorias o definitivas que son características de estos tipos de veneno (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Tabla i2. Distribución del accidente ofídico.

Zona	Promedio de casos anuales	Promedio de muertes anuales	Tasa de mortalidad	Referencia
Mundial	2 - 5 millones	20 - 125 mil	5 - 10 %	Theakston et al 2003
Senegal	-	14 / 100 000 hab.	-	Laloo et al 2002
USA	10 mil	10	0,1 %	Pinho et al 2001
Australia	5 - 10 mil	4	< 0,1 %	White 1998 Stewart 2002
Costa Rica	500	< 5	< 1 %	Sasa et al 2003
Brasil	20 mil	100	0,5 %	Maria et al 1998
Uruguay	60	Menos de 1	0,2 %	Carreira et al 2005

Con respecto a la distribución geográfica del accidente, los departamentos con mayor número de casos son: Tacuarembó y Cerro Largo y los de menor número son Flores y Montevideo. Las estaciones del año donde suceden mayor número de accidentes corresponden al verano seguidos por la primavera y el otoño, en las cuales coinciden una mayor actividad del ofidio y un mayor número de personas en el medio ambiente propio del ofidio

La posibilidad de accidente afecta a todas las edades, con mayor incidencia en personas de entre 15 y 40 años y preferentemente del sexo masculino. Gran parte de los casos corresponden a accidentes laborales (trabajadores rurales) y el resto a accidentes en ocasión de actividades de esparcimiento (campamentistas, cazadores, etc.). Las zonas de mordedura son casi exclusivamente los miembros inferiores y superiores, en orden de frecuencia: piernas, pies, manos, brazos (MSP, 1989, Carreira *et al.*, 2008).

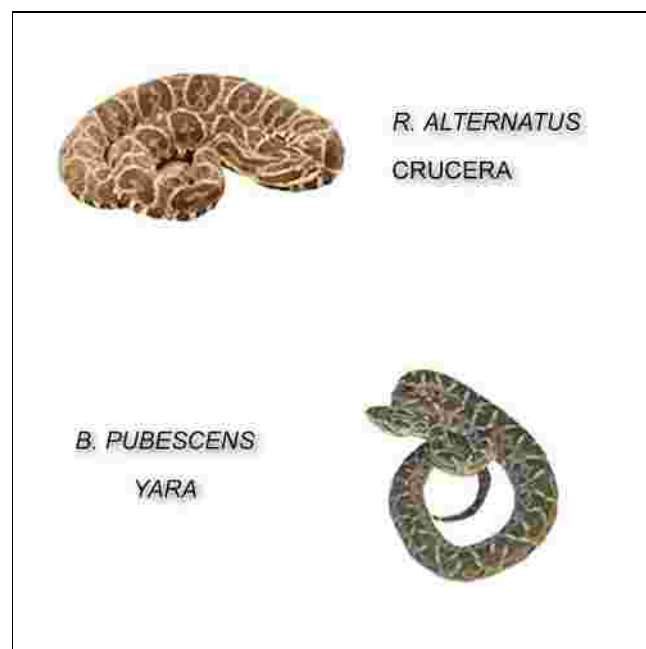


Figura i3. Especies causantes de accidentes en Uruguay.

En caso de producirse una mordedura las primeras medidas a adoptar son las siguientes: mantener a la persona mordida en calma y la zona de la mordedura en posición de descanso, desinfección de la herida mediante lavado, dar aviso al Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT) y trasladar al paciente al hospital más cercano que disponga de suero antiofídico. En caso de ser posible es conveniente también identificar el animal agresor (Carreira *et al.*, 2008). Están contraindicadas las incisiones, ligaduras, succiones y torniquetes, así como cualquier maniobra agresiva para el miembro afectado.

El veneno de estos ofidios es una mezcla compleja de proteínas y péptidos biológicos activos cuyo efecto tóxico se caracteriza principalmente por importantes alteraciones en la coagulación y daño local pronunciado en el miembro por la mordedura, observable mediante la formación de edema importante, pudiéndose en casos extremos llevar a la amputación del mismo.

El tratamiento a seguir se encuentra estandarizado a través de pautas elaboradas por la Comisión de Ofidismo del Ministerio de Salud Pública. (Carreira *et al.*, 2005). El diagnóstico de un accidente ofídico indica la necesidad de iniciar el tratamiento específico con suero antiofídico, único antídoto capaz de neutralizar el veneno circulante. La administración de suero antiofídico debe realizarse en ambiente hospitalario con elementos de reanimación y adrenalina al alcance, debido a la posibilidad de desarrollar un cuadro de shock anafiláctico causado por las proteínas heterólogas de equino presentes en el suero.

Al paciente se le practica un pretratamiento con corticoides 30 minutos antes de la administración del suero. El uso de pre-tratamiento con antihistamínicos o corticoides, tal como se realiza en Uruguay, se encuentra actualmente en discusión a nivel internacional, ya que los resultados obtenidos en ensayos clínicos respecto a sus beneficios no son contundentes (Pereira *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 1999, Theakston *et al.*, 2003, WHO 2010). El suero antiofídico se administra en forma intravenosa junto con suero glucosado, hasta un total de 4 frascos.

El principal ensayo para determinar el avance del tratamiento es el tiempo de coagulación. Si a las 4 horas el tiempo de coagulación no revierte a normal o levemente alterado, se inyectan 4 frascos más. Es importante vigilar al paciente frente a cualquier alteración derivada de la posibilidad de trombos que pueden obstruir vasos, especialmente a nivel renal (Pinho *et al.*, 2001) o de otro órgano (Boviatsis *et al.*, 2003). Otro aspecto a considerar en todos los casos es la posibilidad de infección bacteriana en el sitio de la mordedura. (Otero *et al.*, 1998).

1.3 Componentes de los venenos pertenecientes al ex género *Bothrops*

En general el veneno es una mezcla compleja de componentes que consiste en un 90 – 95 % de proteínas y péptidos. El otro 5 % está compuesto por iones, carbohidratos, aminas, nucleótidos y otros componentes minoritarios (Marckland 1998). Dentro de las proteínas incluye mayormente enzimas, como por ejemplo serin y metalo proteasas, fosfolipasas, y L-amino oxidasas, entre otras (Ponnundurairi *et al.*, 1994; Du *et al.*, 2002). Entre los péptidos se encuentran neurotoxinas, miotoxinas y desintegrinas, péptidos potenciadores de la bradikinina, entre otras (Marckland 1998; Junqueira *et al.*, 2002).

Tal como se mencionó en el apartado anterior, el efecto tóxico del veneno se caracteriza principalmente por importantes alteraciones en la coagulación y daño local pronunciado (Matsui *et al.*, 2000; Markland, 1998).

En el año 2010 se ha completado el mapa proteómico del veneno de *Bothrops alternatus* (Öhler *et al.*, 2010). La distribución de los distintos tipos de toxinas se muestra en la figura i5. Como se puede apreciar predominan principalmente las metalo y serino proteasas.

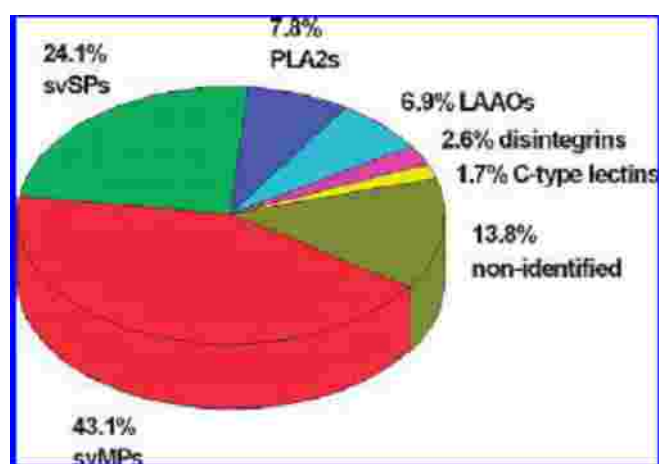


Figura i5. Distribución del venoma de *B. alternatus*. SvSPs (serino proteasas); PLA2s (fosfolipasas A2); LAAOs (l-amino oxidasas); svMPs (metalo proteasas). Obtenido de Oler et al, 2010.

Metaloproteasas.

Las metaloproteasas presentes en lo venenos denominada SVMPS (Bajarnason, 1995), son proteinasas con múltiple dominios, cuyos principales efectos tóxicos se deben a la perturbación que producen sobre el sistema hemostático. Pertenecen a subfamilia de las reprotlisinas y a la familia de las “metzincin”. Esta familia se caracteriza por una secuencia consenso HEXXHXXGXXH, idéntica forma de unión al Zn y la presencia de una metionina. Comparten esta familia entre otras las MMP, las serralisinas y las ADAMs (Gutierrez & Rucavado, 2000).

La mayor parte de los trabajos de investigación se han concentrado en estos componentes debido a su relevancia en la patología del envenenamiento. Se las puede clasificar de acuerdo a la organización de sus multidominios en cuatro clases: PI a PIV. Mientras las PI son las más sencillas y constan solamente de dominio metaloproteasa, las PII agregan un dominio desintegrina, las PIII agregan además un dominio rico en cisteína y por último las PIV agregan también un dominio tipo lectina (Ramos *et al.*, 2003), Figura i6.

Es posible también clasificar las SVMPs en función de su actividad hemorrágica. Actúan principalmente como factores generadores de hemorragia, por lo tanto antiguamente se las llamó hemorraginas; éstas ejercen sus efectos al degradar proteínas tales como laminina, nidogeno, fibronectina, colágeno IV y proteoglucanos de las membranas basales de los endotelio vasculares.

Las proteínas de la cascada de coagulación también pueden ser blanco de la actividad proteolítica de estas enzimas, como el fibrinógeno y el factor von Willebrand, lo cual exagera el estado hemorrágico (Markland, 1998). Además las SVMPs pueden inhibir la agregación plaquetaria y disparar la liberación de citoquinas. Actualmente se cree que estos dos efectos junto con la digestión de las membranas basales son los principales mecanismos por los cuales las SVMPs generan la hemorragia. Si bien la mayoría de las SVMPs son hemorrágicas, algunas, una vez purificadas, no generan hemorragia, pero conservan su capacidad activa en la hemostasis, como lo es el caso de la metaloproteínasa aislada de *B. neuwiedi* brasileña, la neuwidasa (Rodrigues *et al.*, 2000) y de otras (Ahmed *et al.*, 1990; Toombs, 2001; Ramos *et al.*, 2003).

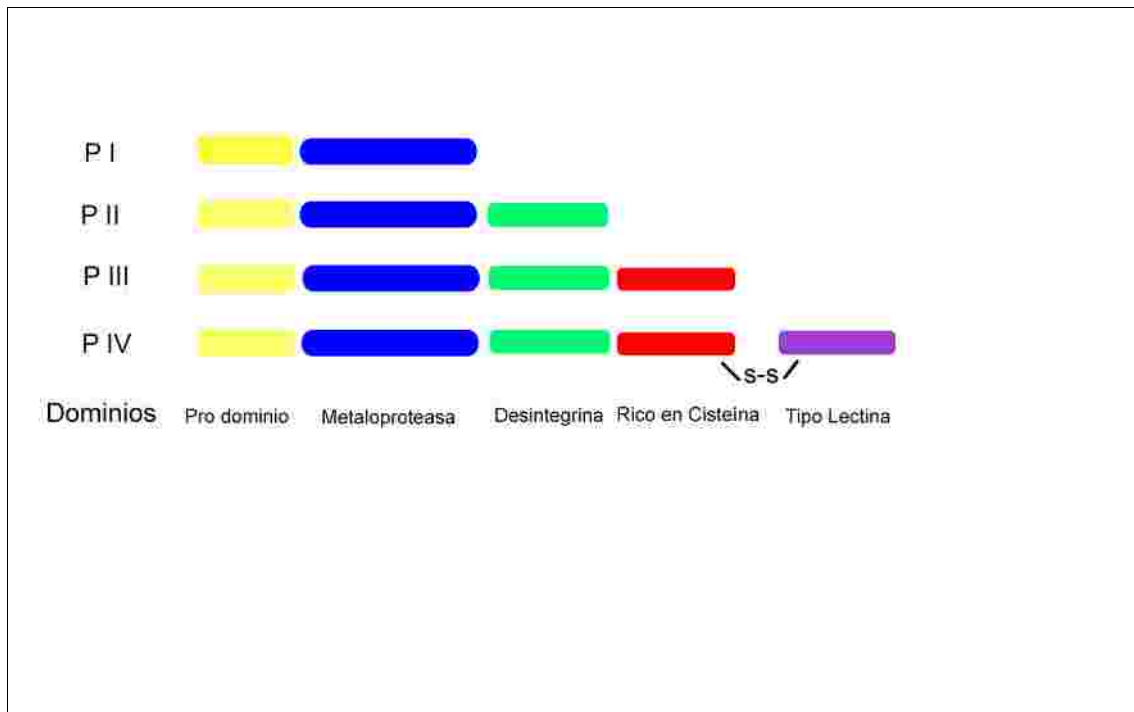


Figura i6. Estructura de metaloproteasas

Serinoproteasas

Estas proteasas están entre las toxinas mejor caracterizadas de venenos que afectan el sistema hemostático. Actúan en una gran variedad de procesos fisiológicos como la cascada de coagulación, en el sistema fibrinolítico y sistema kalicreina-kinina, y sobre células para ocasionar un desbalance del sistema hemostático de la presa (Kini, 2005; Serrano & Maroun, 2005). Quizás la más representativa de este grupo de toxinas es la conocida como “thrombin like”, una serino proteasa de acción similar a la trombina que digiere el fibrinógeno en sitios próximos a los de acción de la trombina, desencadenando la transformación en una fibrina anormal. Esta no es estabilizada por otros factores de la coagulación como el factor XIII, genera el consumo del fibrinógeno sanguíneo provocando severas alteraciones la hemostasis (Matsui *et al.*, 2000). Figura i7.

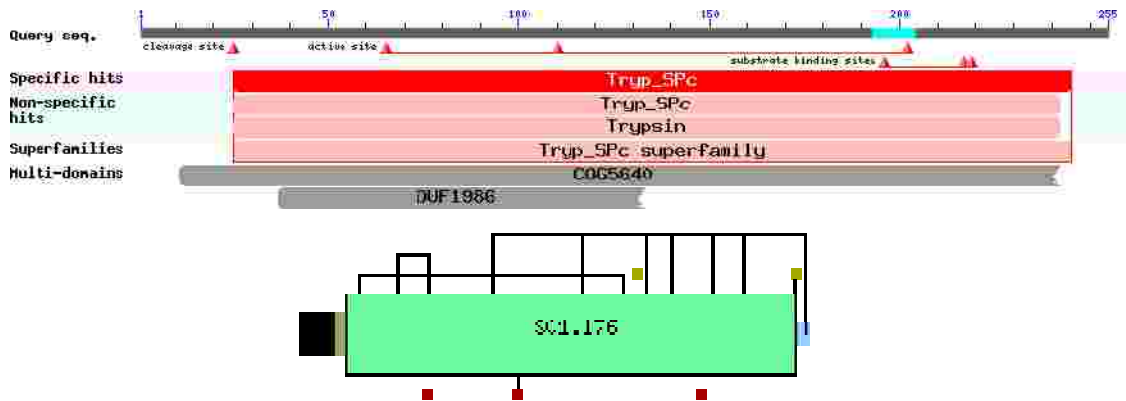


Figura i7. Bothroxobina. Serino proteasa purificada de *Bothrops*.

Fosfolipasas A2

Las fosfolipasas A2 (PLA2) son enzimas que hidrolizan glicerofosfolipidos en la posición 2, liberando ácidos grasos. En los mamíferos, estas enzimas participan de varios fenómenos orgánicos entre los que se encuentran la proliferación celular, la fertilización, la hipersensibilidad y la inflamación crónica. En el caso de las PLA2 de los venenos de serpiente, además de participar en la digestión de la presa, poseen varios efectos farmacológicos, alguno de ellos altamente específicos.

Las neurotoxinas presinápticas de los venenos ofídicos son en su totalidad PLA2, entre las cuales encontramos la crotoxina, toxina característica del veneno de cascabel sudamericana. Otros efectos importantes de los distintos tipos de PLA2 son su capacidad miotóxica, anticoagulante y formadora de edema. Algunas PLA2 con estas características han sido purificadas de los venenos de origen bothropico (Kini, 2003).

Figura i8.

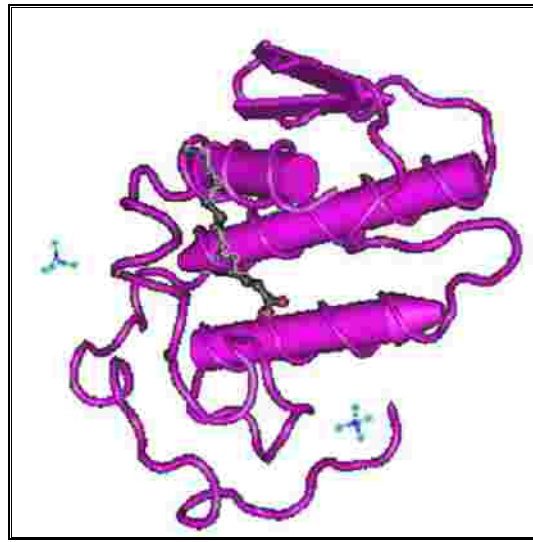


Figura i8. Estructura de una fosfolipasa A2 del tipo Lys 49 aislada del veneno de *B. neuwiedii*

L amino-oxidasas

Las L amino-oxidasas (LAO) son flavoenzimas que catalizan la desaminación oxidativa de L aminoácidos a a cetoácidos, liberando peróxido de hidrógeno y amonio (Du & Clemetson, 2002). Si bien esta enzima se encuentra en apreciables en muchos de los venenos ofídicos, no se sabe exactamente su participación en la toxicidad del veneno. Se presume que tienen efectos sobre las plaquetas y que puede estar vinculado con los efectos debidos al peróxido de hidrógeno.

Otros componentes

Existen otros componentes aislados en venenos bothrópicos de menor importancia en lo que se refiere a su toxicidad o de acción fisiológica como son: enzimas monoaminooxidasas, péptidos potenciadores de bradikinina, otros péptidos, DNAsas entre otros (Du & Clemetson, 2002; Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002; de Roodt *et al.*, 2003).

En resumen, en el envenenamiento botrópico, la acción ca de los distintos grupos de toxinas sobre la cascada de coagulación en distintos puntos, conduce en última instancia al consumo de fibrinógeno y otros factores de la coagulación nibles en sangre, con lo que se produce una incoagulabilidad sistémica (Matsui *et al.*, 2000). Sumado a esto, la acción hemorrágica de las SVMPs deriva en un cuadro grave de alteraciones sobre el sistema hemostático que si no se neutraliza puede ocasionar la muerte.

A nivel local el veneno es causante de mionecrosis y e El importante daño a nivel tisular y celular, está mediado principalmente por metaloproteasas (Gutiérrez & Rucavado, 2000) y fosfolipasas del tipo A2. El mecanismo de acción de las SVMPs consiste en parte en digerir las membranas basales de los pequeños vasos y junto con las desintegrinas generar la ruptura de los vasos y las hemorragias a nivel local. Las fosfolipasas actúan directamente sobre las membranas, alterando su estructura y provocando en última instancia la lisis celular (Kini, 2003).

1.4 Sueros antitoxina. Suero antiofídico.

Antecedentes históricos.

El comienzo del uso de los sueros antitoxina heterólogos, entre los que se encuentra el suero antiofídico, se remonta al año 1890 cuando von Behering y Kitasato, trabajando con tétanos y difteria, demostraron que si se extrae suero sanguíneo de un animal infectado y se lo administra a animales sanos, éste le confiere protección contra la misma enfermedad, confirmando lo sospechado por Roux y Yersin dos años antes (Chippaux & Goyffon, 1998; Berghman *et al.*, 2005). Un año después von Behering acuñó el término “antitoxina” y demostró que éstas residían en el suero sanguíneo libre de células, ensayándose en humanos exitosamente, lo cual le valió a von Behering el primer premio Nobel de Medicina de la historia (Silvertein, 2000).

En 1893 se preparó el primer suero heterólogo antidiftérico comercial utilizando suero de oveja previamente inmunizada con toxina diftérica. (Berghman *et al.*, 2005). Rápidamente, durante los primeros años del siglo XX se comenzó a investigar y producir sueros antitoxina para combatir distintas enfermedades como tétanos (Berghman *et al.*, 2005), meningitis (Jobling, 1909), neumonía (Bull, 1915) y otras. Así fue, como por ejemplo en 1904, una epidemia de *Neisseria meningitidis* (meningococo) desatada en la ciudad de Nueva York se trató con suero antitóxico específico, lográndose reducir la mortalidad en una tercera parte (Berghman *et al.*, 2005).

Sobre fines del siglo XIX, Albert Calmette desarrolló la producción de antitoxinas contra venenos ofídicos. Utilizando veneno de cobra, inmunizó equinos y obtuvo el suero antitóxico respectivo a partir de su sangre, siendo utilizado por primera vez para uso médico en pacientes mordidos en el sudeste asiático con singular éxito (Calmette 1894; 1895; Hawgood, 1999). Por esos años, Vital Brasil hizo lo propio en Brasil, desarrollando la producción de sueros antiofídicos y antidiftéricos en América (Vital Brasil 1898; 1901; 1902). Si bien todos los sueros generaban una respuesta positiva en el tratamiento de las distintas enfermedades, los sueros desarrollados contra toxinas como la diftérica, la tetánica y contra los venenos ofídicos eran los que revestían mayor éxito.

Como consecuencia del uso de suero entero o poco purificado de caballo u oveja como antitoxina, se producía una alta proporción de reacciones adversas, algunas graves, como el choque anafiláctico (Theakston *et al.*, 2003). En 1905 von Pirquet presentó un extenso trabajo acerca de la enfermedad del suero, reacción adversa tardía que se daba luego de transcurridas 1 o 2 semanas en personas a las cuales se les había inyectado grandes volúmenes de suero antitoxina. Las descripciones clínicas incluían fiebre, sarpullido e incluso daño renal. En particular llamaba la atención que los síntomas aparecían mucho más rápido luego de una segunda exposición al suero. La teoría expuesta por von Pirquet acerca de cómo el sistema inmune reaccionaba contra el suero fue adelantada para su época, confirmándose muchos años después y manteniendo su vigencia hoy en día (Silverstein, 2000).

En los años sucesivos el esfuerzo se centró en la purificación de la antitoxina a partir del suero entero de animales hiperinmunizados, para disminuir de esta forma los efectos adversos del suero antitóxico. En los primeros años del siglo XX era posible separar la fracción albúmina de la fracción globulina, donde residía el poder antitóxico, mediante precipitación con sulfato de magnesio (Atkinson, 1900). En la década del 30 era común la separación de las proteínas plasmáticas mediante precipitación con sulfato de amonio, purificándose la fracción pseudoglobulina, donde residía la actividad antitóxica.

En 1938 Pope demostró que, mediante el uso de enzimas proteolíticas, la molécula de antitoxina se podía disgregar en dos partes (las que hoy se conocen como $F(ab')_2$ y Fc), de las cuales sólo una mantenía su propiedad antitóxica (Pope, 1938; 1939). Nueve años después Harms (1948) perfeccionó el método de Pope definiendo mejor las condiciones de reacción, agregando una nueva etapa para concentrar y purificar la antitoxina y escalando el proceso (figura i9). Este desarrollo de Harms ha sido la base de la producción de antitoxinas por más de 40 años, manteniéndose vigente hoy en día con modificaciones en muchas partes del mundo como en Brasil, Argentina e India entre otros (Guidolin *et al.*, 1990; Jadhav & Kapre, 1991; Raw *et al.*, 1991; Theakston *et al.*, 2003).

Años después Steimbuch y Audran (1969) desarrollaron un nuevo sistema de purificación de anticuerpos a escala de laboratorio basado en la precipitación por ácido caprílico (ácido octanoico). Este ácido orgánico de ocho carbonos precipita la mayor parte de las proteínas plasmáticas con excepción de las inmunoglobulinas (anticuerpos), generando así en el sobrenadante un producto de alta pureza mediante un método relativamente sencillo (figura i10).

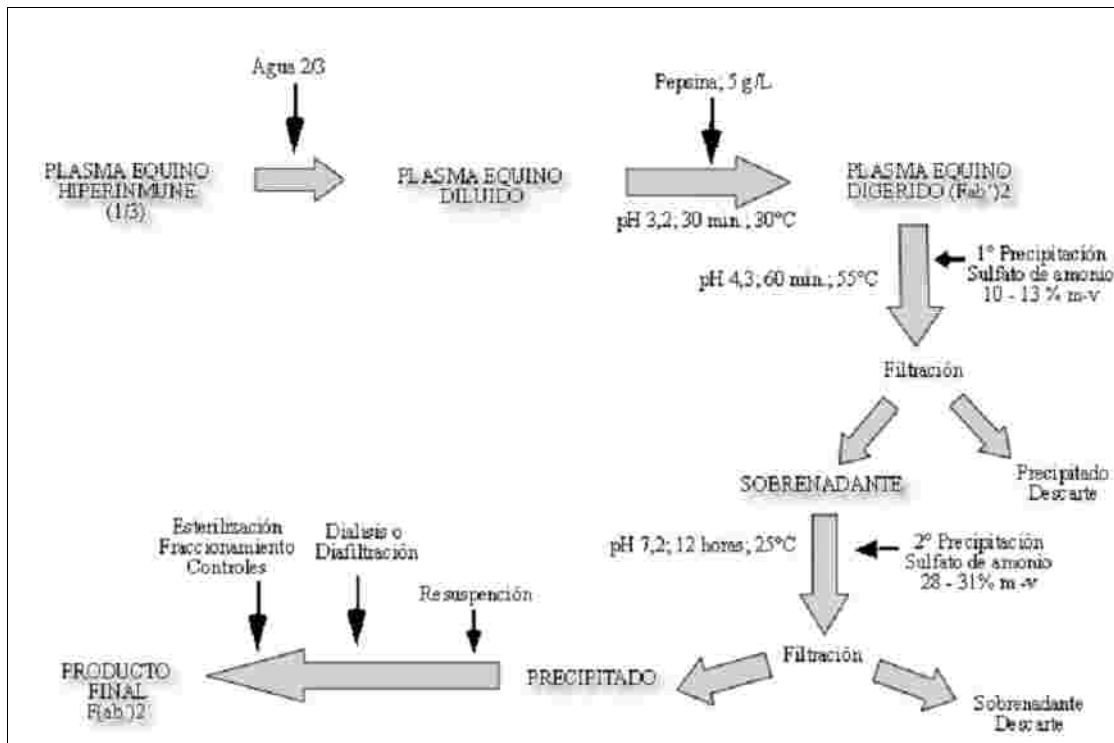


Figura i9. Procesamiento y purificación de los anticuerpos mediante digestión péptica y precipitación con sulfato de amonio (Protocolo de Harms). El producto final en este caso son fragmentos F(ab)². (Morais, 2007)

Los estudios con ácido caprílico continuaron hasta que en 1994 el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica lo adopta para la producción de suero antiofídico (Rojas *et al.* 1994). La sencillez del procedimiento y un menor número de reacciones secundarias demostradas en ensayos clínicos son las principales ventajas de este proceso (Dos Santos *et al.*, 1989; Otero-patiño *et al.*, 1998; 1999). Recientemente, Morais y Massaldi (2012) han presentado un modelo plausible para el mecanismo de acción del ácido caprílico durante la precipitación de proteínas del plasma.

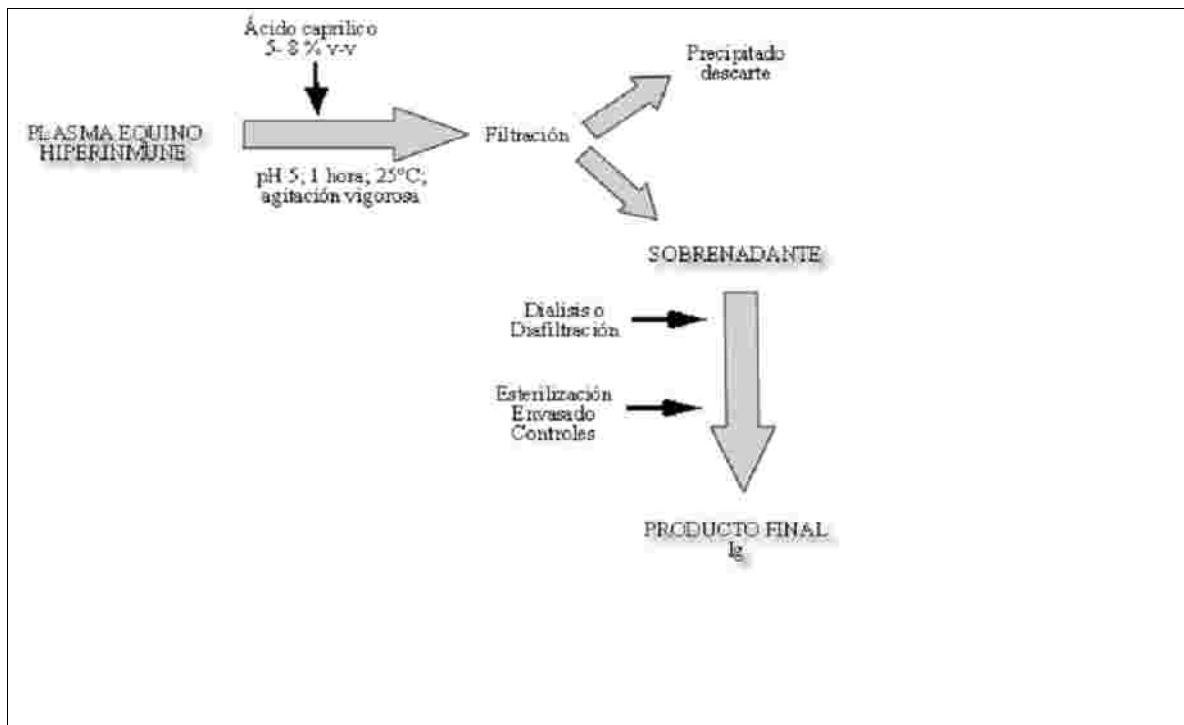


Figura i10. Purificación de los anticuerpos mediante precipitación con ácido caprílico. En este caso el producto final son inmunoglobulinas enteras (Morais, 2007).

La existencia de reacciones adversas, sumada a problemas de estandarización de la potencia de las distintas antitoxinas, generaba una variación considerable de la efectividad según los lotes. El advenimiento de los antibióticos para el tratamiento de las infecciones bacterianas y la contención de las epidemias gracias a la vacunación, llevaron al desuso de las antitoxinas en general (Berghman *et al.*, 2005). Muy distinto es el caso del tratamiento del accidente ofídico y otros envenenamientos de menor cuantía, donde el suero antitoxina continúa siendo el tratamiento eficaz. (Theakston *et al.*, 2003).

En los últimos años han aparecido nuevos desarrollos en el área de los sueros antitoxinas, como el uso de la oveja como animal seroprodutor (Sjostrom *et al.*, 1994), el uso del fragmento F(ab) obtenido mediante corte con papaína (Ariaratnam *et al.*, 1999; Jones *et al.* 1999), la digestión exhaustiva por pepsina (Jones *et al.*, 2002; 2003) y el uso de columnas de intercambio iónico y afinidad en el proceso de purificación (Pepin-Covatta *et al.*, 1997; Saetang *et al.*, 1997; Raweerith *et al.*, 2003). Muchos de

estos avances han traído aparejado un aumento considerable en el costo del producto, el cual se ha vuelto inaccesible para los países de menores recursos (Krifi *et al.*, 1999; Laloo *et al.*, 2002, Laing *et al.*, 2003) y que frecuentemente son los más expuestos al problema.

Productos actuales.

La producción de suero antiofídico, como la de otros sueros antitoxina, consta de las siguientes etapas: obtención del veneno (antígeno), inmunización de los animales, obtención del plasma hiperinmune, procesamiento del plasma, purificación de los anticuerpos (inmunoglobulinas), estandarización de la y controles finales (figuras i11 e i12). Los sueros antiofídicos son veneno-específicos, lo que significa que son adecuados para neutralizar solamente el veneno para el que fueron desarrollados. Sumado a esto, se han reportado variaciones intraespecíficas en el veneno, por lo que es de enorme importancia que el suero antiofídico sea desarrollado a partir de venenos procedentes de ofidios de la región donde serán usados (Chippaux & Goyffon, 1997; Theakston *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2006).

Existen variaciones importantes tanto en el producto final como en los procesos de purificación y en la elección del animal seroprodutor. En lo que respecta al producto, éste puede constar de inmunoglobulinas enteras (Ig) o fragmentos de ellas como: $F(ab)_2$ o Fab según el proceso (Chippaux & Goyffon, 1997; Theakston *et al.*, 2002).

El animal seroprodutor más usado es el caballo y en menor medida, la oveja y otros (Sjostrom *et al.*, 1994; Theakston *et al.*, 2002). En lo que respecta a los sistemas de purificación y proceso, en la actualidad coexisten varios tipos, desde los más modernos basados en la purificación de anticuerpos mediante columnas de intercambio iónico o afinidad (Pepin-Covatta *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999), pasando por la purificación mediante precipitación con ácido caprílico, hasta los antiguos, basados en la purificación mediante precipitación con sulfato de amonio según el protocolo de Harms (1948).

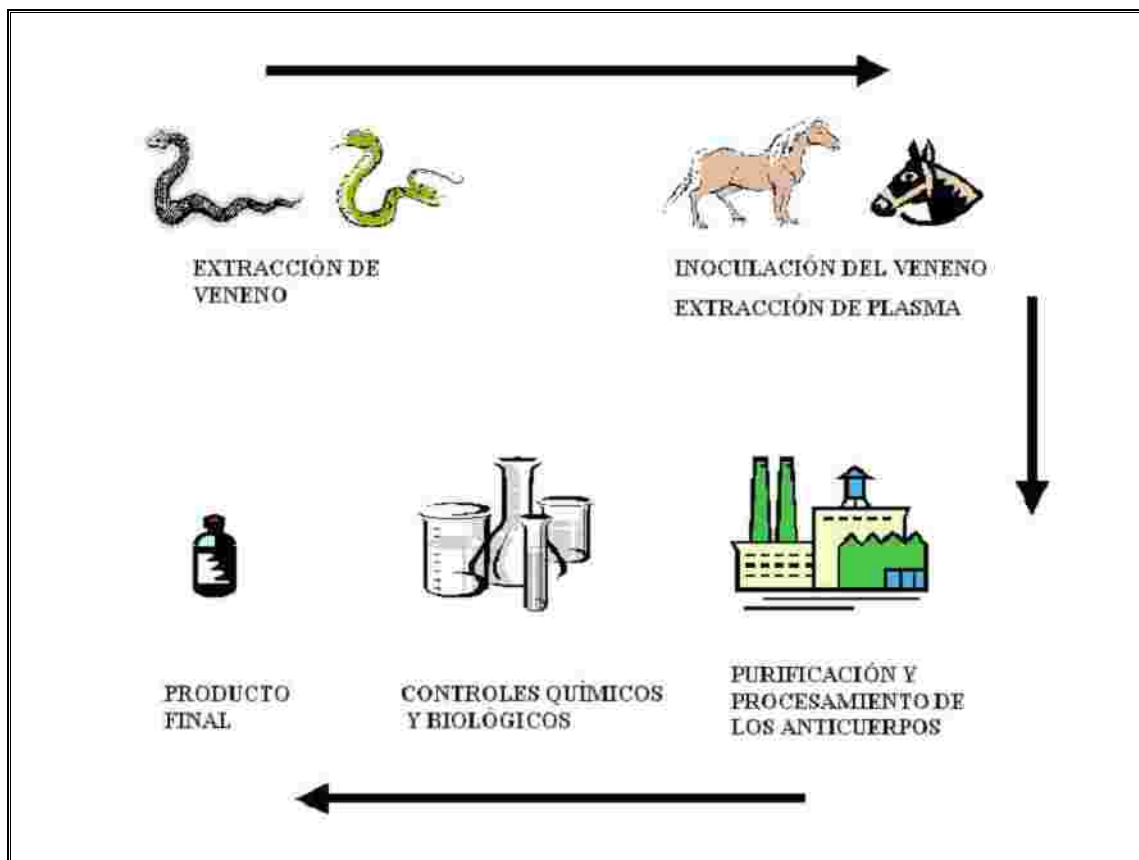


Figura i11. Etapas del proceso de producción de suero antiofídico.

Los esfuerzos para mejorar la calidad de los productos apuntan a modificar los procesos de purificación con el fin de obtener productos más puros, más seguros y que presenten reacciones adversas más leves tanto cuantitativa como cualitativamente. A pesar de una disminución considerable de las reacciones adversas de los nuevos sueros en comparación con los usados en el siglo pasado, éstas aún han sido eliminadas por completo, por lo cual se considera que todos los sueros heterólogos pueden generar reacciones adversas en mayor o en menor grado, dependiendo de la calidad del producto. Clínicamente se ha demostrado que los productos basados en la purificación de los anticuerpos mediante precipitación con ácido caprílico o mediante columnas de afinidad o intercambio iónico presentan un menor número de reacciones adversas (Otero-Patiño, 1998; 1999).

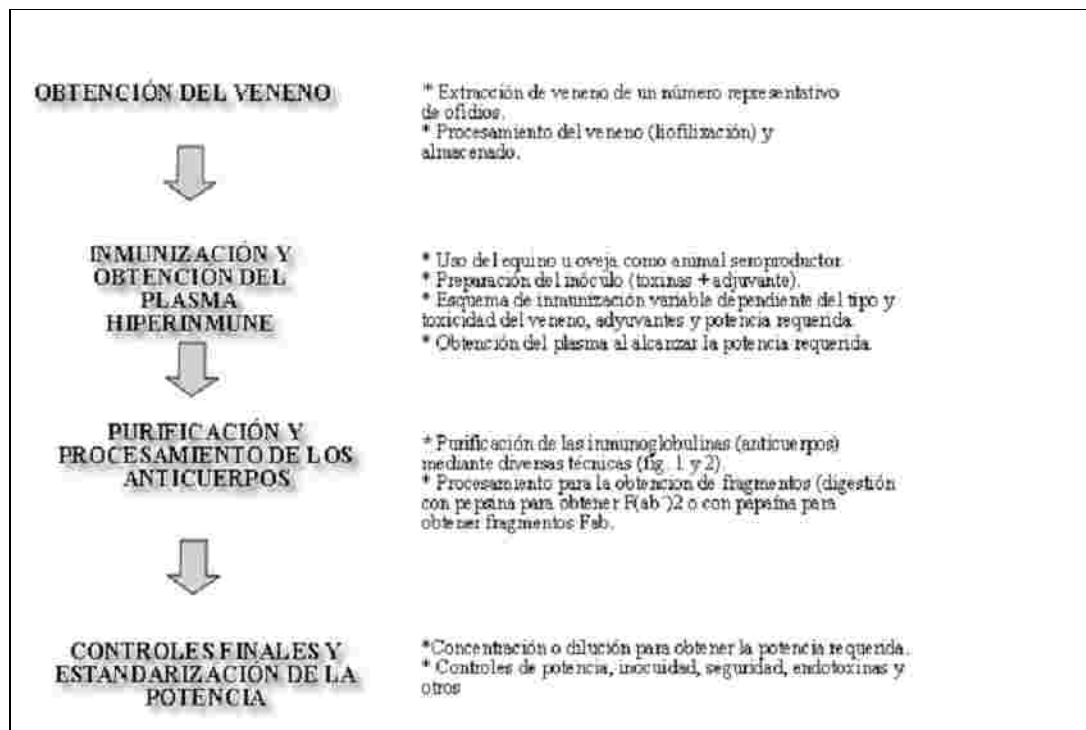


Figura i12. Etapas de la producción de suero antitoxina. (Morais, 2007)

Reacciones adversas, mecanismos, prevención y tratamiento.

Todos los sueros heterólogos son capaces de generar reacciones secundarias en mayor o en menor grado. Éstas se dividen desde el punto de vista clínico en dos tipos: reacciones tempranas (EARS) y reacciones tardías (LARS) (Clark *et al.*, 2002). Las reacciones tempranas son las de mayor importancia clínica, se dan en tiempos cortos (pueden comenzar a los pocos minutos de inyectado el suero), y pueden ser tan leves como causar algo de fiebre y malestar general, hasta las más severas, como la hipotensión grave y el choque anafiláctico. Las causas de estas reacciones son variadas y dependen también de la susceptibilidad del paciente, pero generalmente obedecen a: presencia de pirógenos en el suero, activación del sistema complemento del paciente por parte de los anticuerpos del suero, presencia de impurezas o agregados, presencia de IgE anti proteínas de caballo en el paciente (Chippaux *et al.*, 1998).

Las reacciones tardías son de menor importancia y se dan luego de transcurrido varios días del suministro del suero. Se conoce poco de su incidencia ya que ocurren con el paciente dado de alta (por lo que no se conoce en real generalmente son de carácter leve y se deben a la presencia de complejos inmunes (“enfermedad del suero”) (Chippaux *et al.*, 1998).

En lo que refiere a los mecanismos de acción se pueden clasificar en: anafilácticas, anafilactoides y pirogénicas. Las anafilácticas o hipersensibilidad del tipo I están mediadas por IgE reactivos contra componentes del suero. Estos anticuerpo inducen la desgranulación de los mastocitos y basófilos ocasionando la liberación de compuestos activos, entre ellos la histamina, que determinan diferentes acciones como la vasodilatación, hipotensión y aumento de la permeabilidad vascular. Esto se da a nivel sistémico y sin duda es la reacción adversa más grave ocasionar shock y muerte.

Las reacciones de tipo anafilactoide, si bien desencadenan efecto similar a las anafilácticas, son de menor grado y muchas veces se desencadenan a nivel local. En este caso, quien activa los mastocitos y basófilos son las anafilotoxinas (3A, 4A, 5A) que se producen por la activación del sistema complemento. Este sistema se activa por presencia de agregados moleculares y por inmunocomplejos que se depositan en distintos sitios (Hipersensibilidad del tipo III o enfermedad del suero). Estos inmunocomplejos se forman al reaccionar el sistema inmune del paciente a las inmunoglobulinas de caballo. Por último las reacciones de tipo pirogénico se deben a la presencia no deseada de endotoxinas bacterianas en el producto. Tabla i13.

Tipo	Clasificación	Mecanismo	Causa	Efectos
Anafiláctica	Temprana	Desgranulación de mastocitos y basófilos mediada por IgE	IgE anti componentes del SAOF	Hipotensión, Shock
Anafilactoide	Temprana	Desgranulación de mastocitos y basófilos mediada por complemento	Agregados, FC	Rush, Malestar, Broncoespasmo, Varios
Anafilactoide	Tardía	Desgranulación de mastocitos y basófilos mediada por complemento	Inmunocomplejos	Glomerulonefritis, Artritis, Rush
Pirogénica	Temprana	Producción de TNF	Endotoxinas en SAOF	Fiebre

Tabla i13. Reacciones adversas de los sueros antitoxina.

A nivel mundial se han desarrollado un número importante de ensayos clínicos con la finalidad de poder interpretar la relación entre los distintos tipos de sueros y las reacciones adversas. Una de las principales observaciones que se presentan en varios ensayos clínicos (Chippaux *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 1998) es la importante diferencia en el número de reacciones adversas entre sueros antitoxinas preparados bajo el mismo proceso o procesos similares. Estos resultados dan la impresión de que el factor más importante en lo que respecta a las reacciones adversas es el proceso particular que aplica cada productor. A pesar de que distintos productores utilicen el mismo protocolo, otros factores importantes se suman, tales como: el diseño de la planta, la calidad de los reactivos, el equipamiento, la gestión en los procesos, la capacitación del personal y los

controles de calidad. Todo lo anterior configura diferencias en los sistemas de calidad de los productores.

La presencia de pirógenos en el producto tiene relación con este punto, ya que productores con protocolos generales similares obtienen productos con distinto nivel de pirógenos y por ende con diferencias sustanciales en LAL relacionado con el número de reacciones adversas generadas (Otero *et al.*, 1998).

Otro aspecto de importancia a considerar es el sistema de purificación aplicado, el cual tiene relación con el nivel de pureza obtenido. Los trabajos de Otero y colaboradores (1997; 1998) demuestran que los productos obtenidos por precipitación con ácido caprílico presentan un menor número de reacciones adversas que los que utilizan el sulfato de amonio como sistema de precipitación, sin importar el tipo de fragmento por el que son compuestos. No se han realizado aún ensayos clínicos que vinculen los sueros antitoxina purificados por columnas de afinidad o intercambio iónico con los producidos por precipitación debido a lo relativamente reciente de su aparición comercial, aunque el registro de reacciones adversas que presentan estos nuevos sueros parecen ser los más bajos de los productos de plaza (De Haro *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2002).

Un tercer aspecto es el tipo de fragmento que constituye el antisuero. Tradicionalmente se ha considerado que la eliminación del Fc era de real importancia para reducir la aparición de reacciones adversas (León *et al.*, 1999, 2001; Theakston *et al.*, 2003). En ensayos *in vitro* se ha podido demostrar que las inmunoglobulinas enteras activan el sistema complemento humano en mayor medida que los fragmentos F(ab')_2 y F(ab) , que también lo activan aunque en menor grado (León *et al.*, 2005). Sin embargo, estos resultados ensayados *in vitro*, no se han podido confirmar en ensayos *in vivo* con animales (León *et al.*, 2005) ni en los ensayos clínicos (Otero *et al.*, 1998), por lo cual, si la presencia del Fc del anticuerpo efectivamente aumentara el número de reacciones secundarias, parecería que la contribución no es de gran importancia. En la tabla 114 se resumen las posibles causas de las distintas reacciones adversas así como las posibles soluciones que manejan los productores para minimizarlas.

Por último cabe mencionar los aspectos vinculados al costo del producto. Los últimos avances en lo que respecta a la complejidad de los procesos han determinado un

aumento del precio final del producto, de por sí costoso. El precio del suero antiofidico para el tratamiento de un accidente tipo en los Estados Unidos asciende a US\$ 5000 (Mc Namee 2001). Esta cifra es inabordable para un número de países, lo cual es solucionado con la participación en la producción de Institutos de carácter publico, que aplican protocolos más simples y económicos, con lo cual desciende considerablemente el costo del producto (Morais & Massaldi, 2006). Lamentablemente en algunos países africanos y asiáticos la posibilidad de producir el suero es aún lejana, lo cual implica problemas muy graves de abastecimiento para hoy y hacia el futuro próximo (Cheng *et al.*, 2001; Laing *et al.*, 2003; Theakston *et al.*, 2003).

Tipo de reacción	Acciones	Procesos
Anafiláctica	Aumentar pureza	Nuevos sistemas de purificación
	Disminuir concentración de proteínas	Aumento de título inicial. Nuevos adyuvantes
Anafilactoide. Temprana	Disminuir agregados	Introducción de nueva etapas de purificación
	Disminuir concentración de proteínas	Aumento de título inicial. Nuevos adyuvantes
	Aumentar pureza	Nuevos sistemas de purificación
	Eliminar Fc ??	Digestión
Enfermedad del suero	Disminuir reactividad de anticuerpos	Seleccionar subclases. Cambio de animal seroproducer. Procesamiento anticuerpos
	Disminuir concentración de proteínas	Aumento de título inicial. Nuevos adyuvantes
Pirogénica	Evitar ingreso de endotoxinas	Implementación de GMP. Sistemas de HVAC y agua.

Tabla i14. Medidas para minimizar el desarrollo de reacciones adversas

Producción de suero antiofídico en Uruguay

En Uruguay se comienza la producción de suero antiofídico para uso humano en el Instituto de Higiene de Montevideo en 1988. Esta iniciativa surgió de la necesidad de obtener un producto indispensable para el tratamiento de buena calidad, independientemente de la disponibilidad del mercado regional. Cabe destacar que el suero antiofídico es veneno-específico, es decir, es adecuado para neutralizar solamente el veneno con el que fue preparado. Sumado a esto, se reportado variaciones intraespecíficas en el veneno, por lo que es de enorme importancia que el suero antiofídico sea desarrollado a partir de venenos procedentes de ofidios de la región donde serán usados (Chippaux & Goyffon, 1998; Theakston *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2006).

La producción de suero antiofídico fue suspendida en el año 2000 por no alcanzar los nuevos estándares de calidad requeridos. A partir de ese momento la demanda nacional ha sido satisfecha por sueros provenientes del Instituto Butantán y Vital Brazil del Brasil (F(ab')₂, protocolo de Harms modificado) de excelente calidad. Sin embargo, se debe de considerar que es un suero polivalente, en el el 50% es realizado con *Bothrops jararaca*, especie no presente en nuestro país. Al testearse con nuestro patrón de venenos, cada ampolla neutraliza en proporción menor la señalada en el rótulo, que es de 50 mg de veneno/ampolla.

En el año 2002, en el Instituto de Higiene se comenzó trabajar en el desarrollo de un nuevo proceso de purificación de las inmunoglobulinas basado en ácido caprílico (Morais & Massaldi, 2005) y en el mejoramiento de varios aspectos de la producción (Morais *et al.*, 2006, Massaldi & Morais, 2007) y control (Rial *et al.*, 2006) así como en el análisis detallado de los costos del proceso (Morais & Massaldi, 2006). Las etapas de laboratorio y escala piloto han sido superadas satisfactoriamente y para el año 2010 se procedió a la primera producción de suero antiofídico de este segundo ciclo.

1.5 Aspectos de la neutralización del veneno por parte del suero antiofídico.

El veneno es una mezcla compleja de toxinas que poseen distintos tipos de actividad biológica. Para determinar la potencia de las antivenenos se utiliza el concepto de dosis efectiva media (ED50). El protocolo más común consiste en la preincubación de 5 dosis letales del veneno con diluciones decrecientes de antiveneno. La mezcla se inyecta en forma intravenosa en grupos de ratones, se determina el número de ratones muertos al cabo de 48 horas y se determina mediante análisis estadístico la dosis del antiveneno que protege al 50 % de los ratones. Se puede utilizar esta medida para estandarizar los antivenenos o calcular la potencia según la siguiente fórmula (Farmacopea Europea, 1998):

$$P = (n - 1) LD50 / ED50$$

Donde : P = potencia; LD50 = dosis letal media; ED50 = dosis efectiva media.

Estos resultados son útiles para estandarizar el antiveneno pero no son extrapolables a los casos humanos, ya que está demostrado que la susceptibilidad al veneno es variable según la especie y según el sitio de inoculación (Christensen, 1966).

El problema es más complejo aún si tenemos en cuenta la multiplicidad de toxinas existentes en el veneno. En el año 1966, Christensen demostró que el concepto de neutralización proporcional no era correcto en el caso de veneno antiveneno, confirmando lo sospechado en los inicios de la seroterapia por Vital Brazil. En otras palabras en este caso no es correcto concluir que si una cantidad de veneno es neutralizada por una determinada cantidad de antiveneno, una cantidad múltiple de ese veneno es neutralizada por la misma cantidad múltiple de antiveneno. En la figura i15 se muestran los resultados obtenidos por Christensen al evaluar distintas proporciones de veneno-antiveneno. Estos resultados acuñan la teoría de las toxinas dominantes.

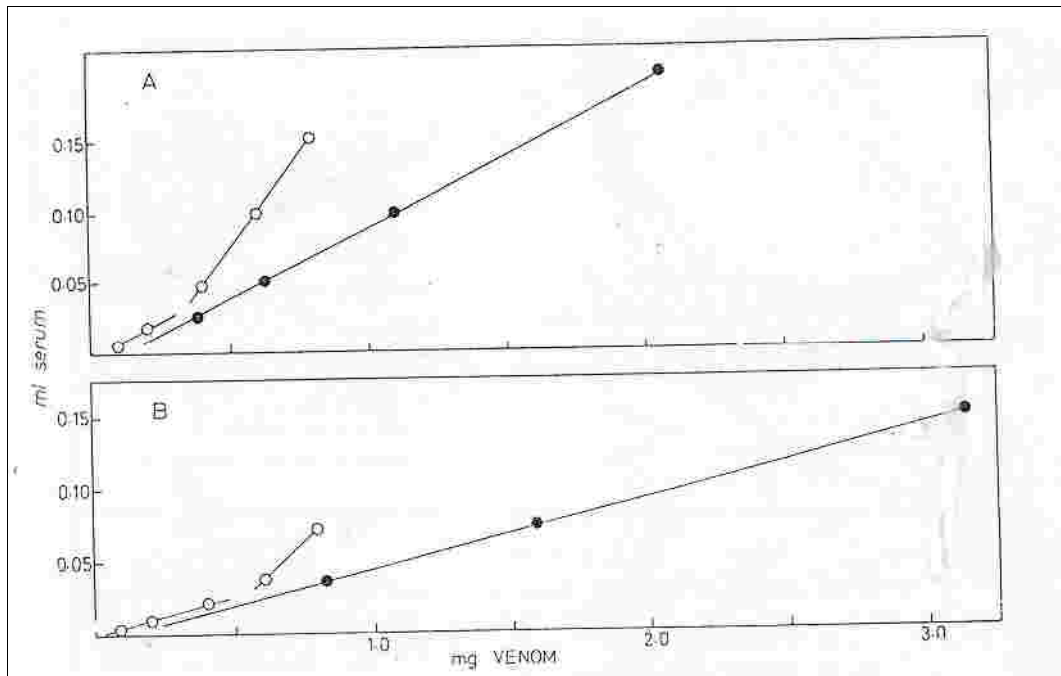


Figura 15. Curvas de neutralización de un suero antiveneno polivalente Bitis-Echis contra veneno de *Bitis lachesis* (A) y *Bitis gabónica* (B). Ensayo realizado en ratones, puntos blancos intravenoso, puntos negros subcutáneo. Obtenido de Christensen, 1966.

Tal como se aprecia en la figura 15, en cierto punto la gráfica cambia de pendiente. Eso tiene como significado que, toxinas que a menores concentraciones no eran responsables del efecto letal del veneno, a partir de ese valor pasan a tener incidencia y el antiveneno las neutraliza de forma menos eficiente las dominantes. En caso de que existiera una toxina no dominante que no fuera neutralizada por el veneno, la curva cambiaría a una pendiente tendiente a infinito. Si las toxinas secundarias son neutralizadas por el antiveneno en mejor medida que las dominantes no se notaría cambio ya que quedarían ocultas por la curva de las toxinas dominantes.

Por todo lo expuesto anteriormente, en esta tesis nos enfocamos en dos aspectos complementarios. Por una parte se realiza una primera en lo que refiere a la composición de los venenos bothrópicos y las diferencias entre ambas especies. Por otro lado se realiza un estudio clínico y bioquímico pormenorizado del accidente ofídico en Uruguay y su tratamiento, que incluye los siguientes puntos: la determinación de veneno en sangre en los pacientes accidentados, la biocinética del suero antiofídico, y la respuesta inmunológica humoral de los pacientes tanto al suero antiofídico como al veneno

MATERIALES Y MÉTODOS

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Dosis letal Media (DL50)

La DL50 se realiza según protocolo de la Farmacopea Europea (1998). Se preparan 5 diluciones de veneno de las cuales se inyectan 0.5 mL por cada dilución a 6 mediante via intravenosa. Luego de 48 horas se registran las muertes y se calcula la dosis letal 50 mediante análisis de Probit. Se expresa como la cantidad de veneno por ratón que mata al 50 % de la población de ratones.

2.2 SDS PAGE

Se realiza mediante método de Laemmli (1969). Las muestras se hierven junto con el buffer de muestra y según se especifique en cada caso muestras pueden reducirse agregando para ello 0,1 M de DTT. Las muestras se cargan en el gel de acrilamida de 12,5 % y se corren en un sistema de electroforesis SE2 (Amersham Bioscience) a una corriente constante de 20 mA por gel. Luego de la corrida se tiñe el gel mediante Azul de Coomassie (Sigma).

2.3 Cuantificación de las bandas.

Se realiza mediante el software Gel-Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics). El análisis de densitometría se realiza sobre las respectivas imágenes obtenidas mediante scanner de escritorio y mediante máquina fotográfica digital. selección de bandas se realiza de forma manual, se aplica el mismo filtro para eliminar ruido en todos los casos y la cuantificación se determina mediante el porcentaje relativo de la banda en relación a lo cargado en el carril.

2.4 Zimograma de gelatina.

Se realiza mediante a una técnica similar a la descrita por Hasson y colaboradores (2004). Se realiza el gel de la misma forma que se describe en el punto 2.2 con el agregado de gelatina (Difco) hasta alcanzar una concentración final en el gel de 2 mg/mL. Las muestras se agregan en el gel sin reducir y sin hervir (mezcladas con buffer de muestra) y se corre a intensidad constante de 20 mA.

Luego de realizada la corrida el gel se lava 3 veces por 30 minutos con una solución conteniendo 2 % de Triton X-100 para eliminar el SDS. Luego de los lavados, el gel se incuba por 16 Horas a 37°C en PBS. Por último se tiñe con Azul de Coomassie (Sigma)

2.5 Tiempo de coagulación.

En una serie de tubos de vidrio se colocan 500 µL de sangre ovina conteniendo citrato como anticoagulante. Se le agregan 50 µL de una solución del veneno correspondiente (50 µg/mL) y se incuba a 37 °C. A intervalos de 1 minuto un tubo de cada serie es invertido. El tiempo de coagulación se define como el tiempo en que el tubo de cada serie genera un coágulo que no se cae al invertir el tubo. El ensayo se repite también con el agregado de 10 mM de EDTA.

2.6 Actividad hemolítica indirecta.

Se realiza mediante hemólisis indirecta de glóbulos rojos de origen ovino (Martins et al, 2009). Se agregan en varios tubos 200 µl de una suspensión de glóbulos rojos previamente lavados con PBS, 100, 200 y 400 µg de ambos venenos y 0,4 mg/mL de Lecitina (Sigma). Se completan los tubos con PBS hasta un volumen final de 0,5 mL. Se incuba durante 1 hora a 37°C. Luego de transcurrido ese lapso, se centrifugan los tubos y se mide la Absorbancia a 420 nm del sobrenadante.

2.7 Actividad fibrinogenolítica.

Se realiza mediante técnica similar a la descrita por Maruñak y colaboradores (2006). A una solución de 100 µL que contiene 2 mg/mL de fibrinógeno bovino (Sigma) se le agrega 100 µg de veneno y se incuba a 37 °C. Se toman a tiempo 0, 30, 80 y 800 minutos y se corren en un gel de acrilamida en condiciones reducidas, según se detalla en la sección 2.2.

2.8 Muestras de veneno.

Las muestras de veneno correspondientes a las especies de *Bothrops pubescens* y *Bothrops alternatus* corresponden a mezclas estándar de venenos pertenecientes a ejemplares de la colección del Serpentario del Instituto de Higiene. Cada mezcla de veneno está compuesta por muestras provenientes de al menos 20 ejemplares de cada especie representativa de la población natural.

2.9 Muestras de suero antiofídico.

Para la realización de los diferentes ensayos se utilizaron dos tipos de suero antiofídico. Por un lado el suero antiofídico producido por el Instituto de Higiene, bivalente, Lote 2B, 2009, compuesto por IgG, purificado mediante protocolo basado en precipitación con ácido caprílico (SAOF IH); por otra parte el suero antiofídico producido por el Instituto Vital Brazil, Polivalente, compuesto por el F(ab)₂, producido mediante digestión péptica y purificado mediante protocolo basado en precipitación con sulfato de amonio (SAOF VB).

2.10 Muestras de los pacientes.

El accidente ofídico es de notificación obligatoria al CIAT (Centro de Información y asesoramiento Toxicológico). Durante el período de estudio, al ser informado el CIAT de un nuevo accidente, se invitaba al paciente y al equipo médico a participar del estudio. El mismo consta de un estudio clínico observacional (Chippaux *et al.*, 2010), que fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina. En todos los casos, se aplicó el mismo protocolo de diagnóstico y tratamiento. (Carreira *et al.*, 2008). El criterio de inclusión fue el siguiente: pacientes bajo tratamiento por accidente ofídico y que hayan enviado al menos una muestra de sangre correspondiente a su tratamiento al CIAT (Hospital de Clínicas). Así mismo los pacientes fueron invitados a concurrir a un control con un médico especialista en Toxicología a los 15 días de ocurrido el accidente para evaluar el tratamiento en general y obtener una nueva muestra de sangre. En total se registraron más de 50 pacientes participantes del estudio. Según la existencia o no de las muestras necesarias fueron incluidos en las determinaciones realizadas. El número de pacientes incluido en cada análisis se detalla en los resultados.

2.11 Determinación de veneno en sangre.

Se realiza mediante ELISA (Theakston *et al.*, 1977; Bucher *et al.*, 1997; O'Leary *et al.*, 2006). Se sensibiliza las placas de ELISA de 96 pozos (Microlon, Greiner) con 100 µL/pozo de una solución de PBS que contiene 1 mg/mL de α -IH durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquea con una solución de PBS-BSA 1% overnight. Las placas se lavan 5 veces con una solución de PBS-Tween 20, 0,05% (PBS-T) y luego se incuban 100 µL/pozo de las muestras de sangre o una solución decreciente de veneno estándar (8 a 1000 ng/mL). Luego de transcurrido ese lapso se vuelve a lavar con PBS-T y se agrega una dilución 1/1000 de conjugado antiveneno-PO (Rial *et al.*, 2006) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se vuelve a lavar la placa con PBS-T y se le agrega una solución de 100 µL/pozo del sustrato o-Phenylenediamine (OPD) solution (Sigmafast, SIGMA).

El desarrollo de color se detiene mediante el agregado de HCl 3N y se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA (MRX II, DYNEX Technologies). Los límites de detección y cuantificación se definen como la señal dada por el blanco más 3 desvíos estándar y por el blanco más 10 desvíos estándar respectivamente.

2.11 Determinación de suero antiofídico en sangre.

Se realiza mediante ELISA (Theakston *et al.*, 1977; Theakston & Reid, 1979). Se sensibilizan las placas de ELISA de 96 pozos (Microton, Greiner) con 5 µg/pozo de una solución que contiene una mezcla de ambos venenos en PBS (100 µL/pozo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquea con una solución de PBS-BSA 1% overnight. Las placas se lavan 5 veces con una solución de PBS-Tween 20, 0,05% (PBS-T) y luego se incuban 100 µL/pozo de diluciones de las muestras de sangre (1/40 a 1/2560) muestras de sangre y una solución decreciente de SAOF VB (32 a 4000 ng/mL). Luego de transcurrido ese lapso se vuelve a lavar con PBS-T y se agrega una dilución 1/4000 de conjugado anti IgG equina –PO (SIGMA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se vuelve a lavar la placa con PBS-T y se le agrega una solución de 100 µL/pozo del sustrato o-Phenylenediamine (OPD) (sigmafast, SIGMA). El desarrollo de color se detiene mediante el agregado de HCl 3N y se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA (MRX II, DYNEX Technologies). Los límites de detección y cuantificación se definen como la señal dada por el blanco más 3 desvíos estándar y por el blanco más 10 desvíos estándar, respectivamente. Se define como 1 U/mL a la cantidad de inmunoglobulinas específicas presentes en 1 µg/mL de SAOF VB.

2.12 Determinación de anticuerpos humanos anti-suero antiofídico.

Se realiza mediante ELISA. Se sensibilizan las placas de ELISA de 96 pozos (Maxisorp, Nunc) con 100 µL/pozo de una solución de PBS que contiene 1 mg/mL de SAOF IH durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquea con una solución de PBS-BSA 1% overnight. Las placas se lavan 5 veces con una solución de PBS-Tween 20, 0,05% (PBS-T) y luego se incuban 100 µL/pozo de diluciones de las muestras de sangre (1/40 a 1/2560) muestras de sangre y una solución decreciente de SAOF VB (32 a 4000 ng/mL). Luego de transcurrido ese lapso se vuelve a lavar con PBS-T y se agrega una dilución 1/4000 de conjugado anti IgG humana –PO (SIGMA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se vuelve a lavar la placa con PBS-T y se le agrega una solución de 100 µL/pozo del sustrato o-Phenylenediamine (OPD) (sigmafast, SIGMA). El desarrollo de color se detiene mediante el agregado de HCl 3N y se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA (MRX II, DYNEX Technologies). Los límites de detección y cuantificación se definen como la señal dada por el blanco más 3 desvíos estándar y por el blanco más 10 desvíos estándar, respectivamente. Se define como 1 U/mL a la cantidad de inmunoglobulinas específicas presentes en 1 µg/mL de SAOF VB.

PBS-Tween 20, 0,05% (PBS-T) y luego se incuban 100 μ L/pozo de diluciones de las muestras de sangre (1/40 a 1/1280) en PBS durante 1 hora. Luego de transcurrido lapso se vuelve a lavar con PBS-T y se agrega 100 μ L/pozo de una dilución 1/4000 de conjugado anti IgM humano-PO (Dako) o anti IgG humano-PO (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se vuelve a lavar la placa con PBS-T y se le agrega una solución de 100 μ L/pozo del sustrato o-Phenylenediamine (OPD) solution (sigmafast, SIGMA). El desarrollo de color se detiene mediante el agregado de 20 μ L/pozo de HCl 3N y se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA (MRX II, DYNEX Technologies).

2.13 Determinación de anticuerpos humanos anti veneno.

Se realiza mediante ELISA. Se sensibilizan las placas ELISA de 96 pozos (Maxisorp, Nunc) con 100 μ L/pozo de una solución de PBS que contiene 5 μ g/pozo de veneno de BP o RA durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente bloquea con una solución de PBS-BSA 1% overnight. Las placas se lavan 5 veces con una solución de PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) y luego se incuban 100 μ L/pozo de diluciones de las muestras de sangre (1/40 a 1/1280) en PBS durante 1 hora. Luego de transcurrido ese lapso se vuelve a lavar con PBS-T y se agregan 100 μ L/pozo de una dilución 1/4000 de conjugado anti IgM humano-PO (Dako) o anti IgG humano-PO (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se vuelve a lavar la placa con PBS-T y se le agrega una solución de 100 μ L/pozo del sustrato o-Phenylenediamine (OPD) (sigmafast, SIGMA). El desarrollo de color se detiene mediante el agregado de 20 μ L/pozo de HCl 3N. Se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA (MRX II, DYNEX Technologies).

2.14 Western Blot

Se realiza electroforesis en gel de acrilamida tal como se detalla en el apartado 2.2. Se siembran 50 µg de cada especie. Las muestras de veneno se corren de forma no reducida mientras que las muestras de suero antiofidico, de forma reducida. Luego de la corrida, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm (Sigma). Los sitios libres se bloquean mediante incubación con PBS-Tween 20 1% overnight a 4° C. Trascorrido ese lapso se incuban con las muestras de sangre diluidas 1/10 en PBS-Tween 20 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego la membrana se lava 3 veces con PBS-T y se agrega una dilución de 1/2000 del conjugado anti IgM humano-PO (Dako) o anti IgG humano-PO (Sigma). Se incuba 1 hora a temperatura ambiente, se lava 5 veces con PBS-T y se revela con el sustrato 3 -cloro naftol (Sigma).

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVOS GENERALES

- Realizar un estudio comparativo de composición y funcional de los venenos de importancia clínica en Uruguay.**

- Analizar la respuesta clínica y bioquímica al veneno al suero antiofídico del paciente mordido por ofidios ponzoñosos en Uruguay.**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Buscar similitudes y diferencias de composición entre los venenos de *Bothrops pubescens* y *Bothrops alternatus*.**
- **Determinar similitudes y diferencias de actividad entre los venenos de *Bothrops pubescens* y *Bothrops alternatus*.**
- **Determinar, cuantificar y analizar la evolución del veneno en los pacientes mordidos por ofidios en Uruguay.**
- **Determinar, cuantificar y analizar la evolución del suero antiofídico en los pacientes mordidos por ofidios en Uruguay.**
- **Determinar, cuantificar y analizar la respuesta inmunológica humoral de los pacientes mordidos por ofidios en Uruguay contra el suero antiofídico.**
- **Determinar, cuantificar y analizar la respuesta inmunológica humoral de los pacientes mordidos por ofidios en Uruguay contra el veneno ofídico.**

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Análisis comparativo de los venenos de *Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens*

Análisis de composición.

En la figura r1 se puede observar la electroforesis comparativa entre los venenos de *Bothrops alternatus* (RA) y *Bothrops pubescens* (BP). La muestra está compuesta de la mezcla de al menos 20 ejemplares de cada especie.

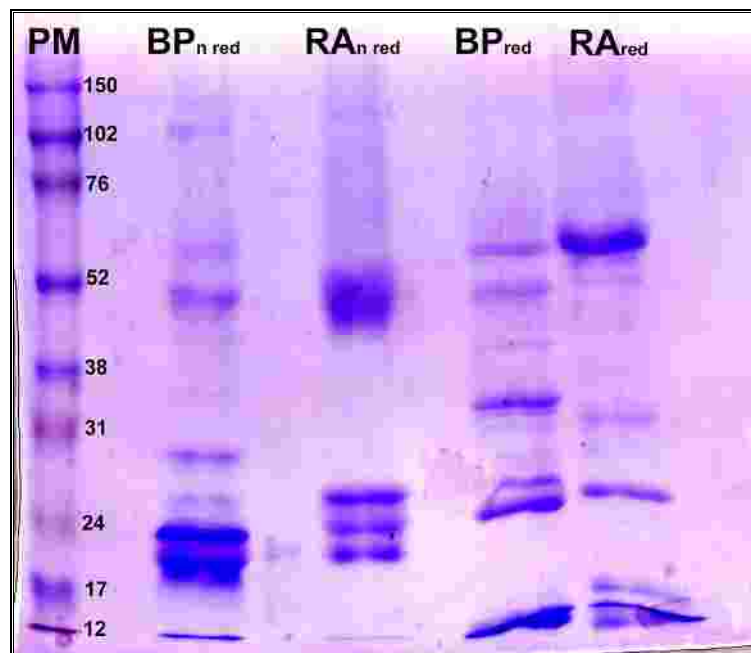


Figura r1. Perfil electroforético de ambos venenos.

PM (peso molecular). BP_{n red} (*Bothrops pubescens* sin reducir). RA_{n red} (*Bothrops alternatus* sin reducir). BP_{red} (*Bothrops pubescens* reducido). RA_{red} (*Bothrops alternatus* reducido).

En principio ambos perfiles son distintos, pero si se los compara mediante densitometría utilizando el programa GelPro 3.1 se nota que ambos venenos comparten gran parte de las bandas (figura r2). Donde si se aprecian notables diferencias es en la distribución de las concentraciones de cada banda.

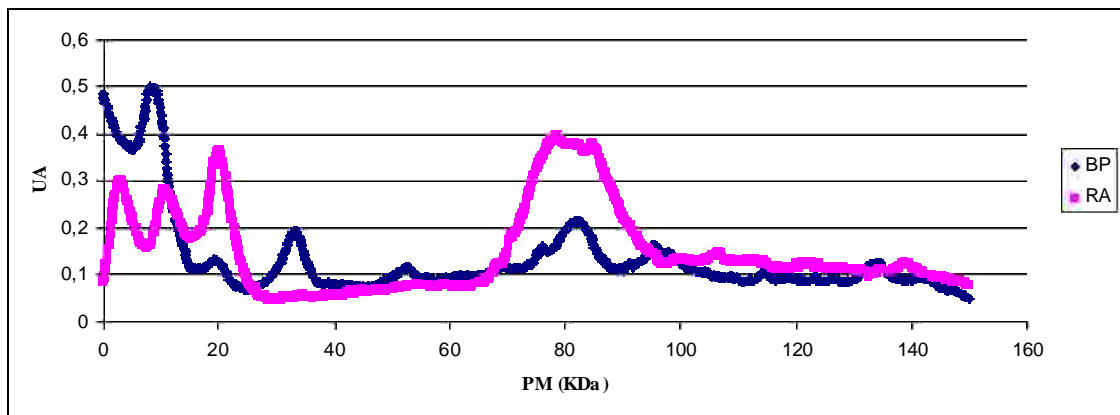


Figura r2a. Densitometría de los carriles correspondientes a ambos venenos corridos de forma no reducida.

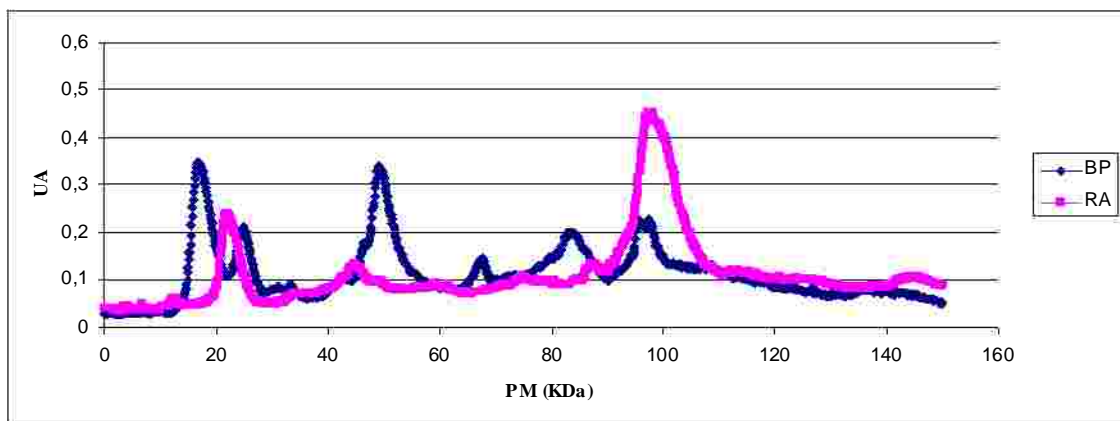


Figura r2b. Densitometría de los carriles correspondientes a ambos venenos corridos de forma reducida.

En la tabla r3 se muestran las distintas concentraciones relativas de cada banda obtenidas mediante densitometría de los carriles sin reducir. Mientras que la banda más importante en *Bothrops alternatus* (RA) se ubica entre 49 y 51 KDa y corresponde casi con la tercera parte del veneno, la misma banda en *Bothrops pubescens* (BP) corresponde solo con el 6 % del veneno. Por otra parte, la banda más importante de BP se encuentra entre 18 y 20 KDa y corresponde también a un tercio del total de veneno mientras que su contraparte en RA corresponde solo al .

Tabla r3. Concentración relativa de los componentes más abundantes de los venenos

Banda (PM)	<i>Bothrops alternatus</i>	<i>Bothrops pubescens</i>
49-51 KDa	32 %	6 %
26 KDa	12 %	2 %
23 KDa	9 %	20 %
18 –20 KDa	9 %	33 %

Al observar los perfiles electroforéticos reducidos se puede observar que la banda de 18-20 KDa de ambos venenos se divide en subunidades de 13 KDa. Por otra parte en *Bothrops alternatus* la banda localizada a 23 KDa también se divide en subunidades de 17 KDa.

En una primera etapa es posible inferir la familia de toxinas a las que pertenece cada banda según su peso molecular mediante comparación con toxinas de la misma especie o especies cercanas reportadas en la literatura.

En el caso de *Bothrops alternatus* la tarea se simplifica ya que en los últimos años se ha realizado el análisis proteómico detallado de su veneno (Öhler *et al.*, 2010). En la tabla r4 se observan las principales familias de toxinas que concuerdan con las bandas.

Tabla r4. Posibles familias de toxinas relacionadas con cada banda.

Banda (PM)	Familia Toxinas	Referencia
49-51 KDa	Metaloproteasa tipo PIII	Öhler <i>et al.</i> , 2010; Gay <i>et al.</i> , 2005
26 KDa	Metaloproteasa tipo PI Serinoproteasa	Öhler <i>et al.</i> , 2010; Rodrigues <i>et al.</i> , 2000;
23 KDa	Fosfolipasa A2	Öhler <i>et al.</i> , 2010; Geoghegan <i>et al.</i> , 1999; Ponce-Soto <i>et al.</i> , 2007 Queiroz <i>et al.</i> , 2008
18 –20 KDa	Fosfolipasa A2	Öhler <i>et al.</i> , 2010; Geoghegan <i>et al.</i> , 1999; Ponce-Soto <i>et al.</i> , 2007 Queiroz <i>et al.</i> , 2008

Análisis Funcional.

En la tabla r5 se muestran los datos de dosis letal media (LD50) y de algunos ensay bioquímicos. Se puede apreciar que el veneno de *Bothrops alternatus* es 50 % más letal que el veneno de *Bothrops pubescens* cuando es inyectado en ratones de forma intravenosa.

Ambos venenos tienen una actividad coagulante similar, aunque la actividad de *Bothrops alternatus* parece ser más sensible a la inhibición por EDTA, lo daría la pauta de una mayor participación de toxinas del tipo metaloproteasas.

Por otra parte el veneno de *Bothrops alternatus* muestra una muy baja actividad hemolítica indirecta en relación con el veneno de *Bothrops pubescens* (figura r6). A pesar de ello en el estudio de composición y en las referencias bibliográficas surge la presencia de un importante número de fosfolipasas A2 en *Bothrops alternatus*.

Tabla r5. Análisis funcional comparativo de ambos venenos.

	<i>Bothrops alternatus</i>	<i>Bothrops pubescens</i>
Dosis Letal Media ($\mu\text{g}/\text{mouse}$)	20 ± 3	30 ± 3
Actividad hemolítica indirecta específica (UA/mg)	24 ± 3	478 ± 90
Tiempo de coagulación (min.)	12 ± 3	12 ± 3
Tiempo de coagulación + EDTA (min.)	22 ± 3	17 ± 3

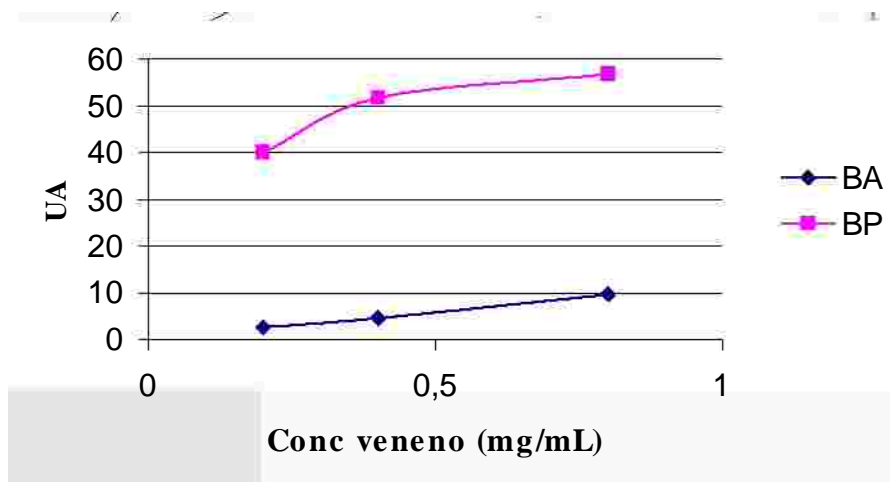


Figura r6. Actividad hemolítica indirecta para distintas concentraciones de ambos venenos. *Bothrops alternatus* (BA); *Bothrops pubescens* (BP)

En la figura r7 se puede observar el zimograma de gelatina correspondiente a ambos venenos. Mientras que en *Bothrops alternatus* (RA) se observan 2 bandas de digestión, en *Bothrops pubescens* (BP) se observan 3. La banda de digestión adicional de BP está situada entre 25 y 35 KDa y no tiene contraparte en RA, lo que corresponde a otra de las diferencias entre los venenos. La banda N° 2 de digestión que ambos venenos tienen en común se localizan justamente sobre las bandas de 49-51 KDa, lo cual concuerda con lo sospechado en el análisis de composición, acerca de la identidad de estas bandas como metaloproteasas.

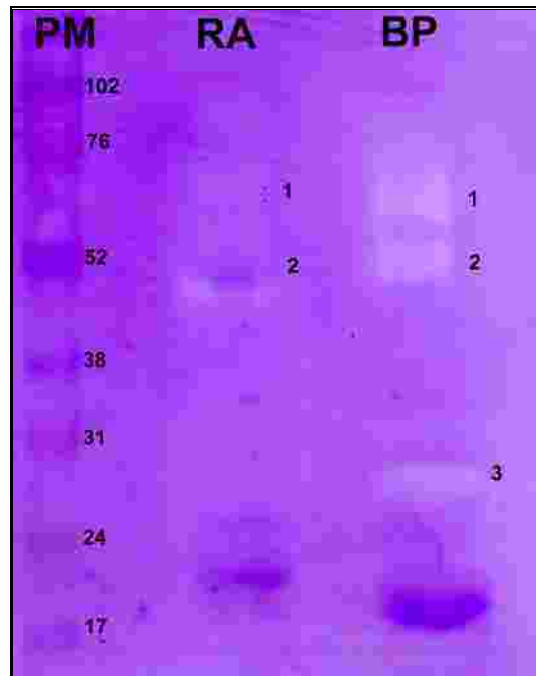


Figura r7. Zimogramma de gelatina de ambos venenos.

PM (peso molecular). RA (*Bothrops alternatus*). BP (*Bothrops pubescens*). Los números indican las distintas zonas de digestión.

Uno de los principales efectos de los venenos botrópicos sobre la coagulación se debe específicamente a su actividad sobre el fibrinógeno. En la figura r8 se puede observar el patrón de digestión de las distintas cadenas que componen el fibrinógeno. Ambos venenos digieren las cadenas α y β en tiempos relativamente cortos (menos de 2 horas) mientras que la cadena γ es digerida en tiempos mayores. Si bien la actividad de digestión es similar en ambos venenos el patrón de digestión es diferente, tal como se observa en los carriles del 5 y 9.

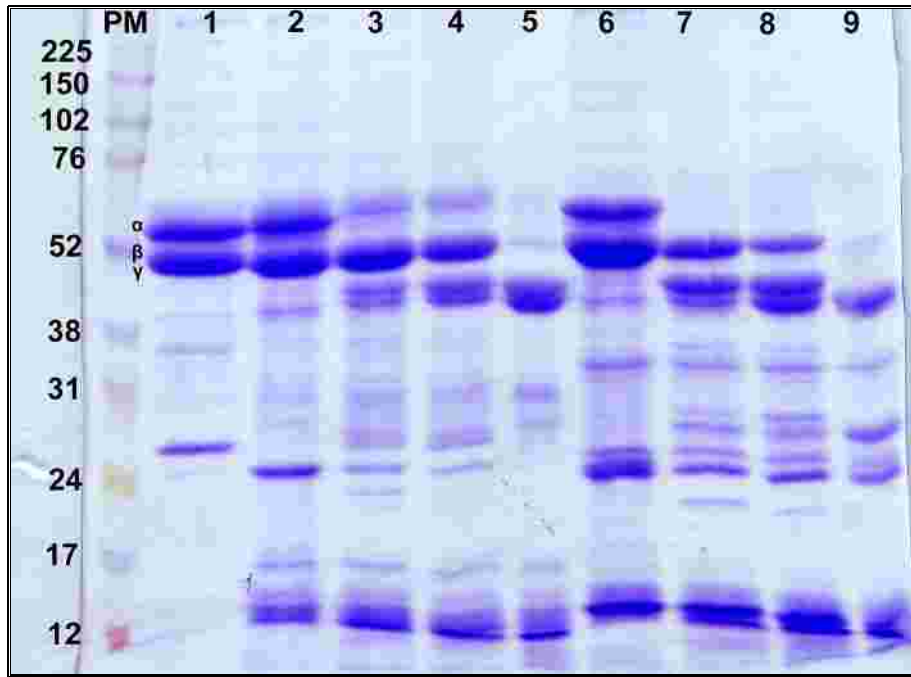


Figura r8. Cinética de digestión de fibrinógeno.

PM (peso molecular). Carril 1. Fibrinógeno bovino (50 μ g). Carriles 2 a 5. Fibrinógeno digerido por *Bothrops alternatus* a 0, 30, 80, 800 minutos respectivamente. Carriles 6 a 9. Fibrinógeno digerido por *Bothrops pubescens* a 0, 30, 80, 800 minutos respectivamente.

En lo que se refiere a la cinética de digestión, el análisis por densitometría de las bandas muestra que el veneno de *Bothrops pubescens* parece ser más activo que el de *Bothrops alternatus* en la digestión de cualquiera de las 3 cadenas de fibrinógeno. Esta diferencia se hace más notable en el caso de la cadena α (figuras r9).

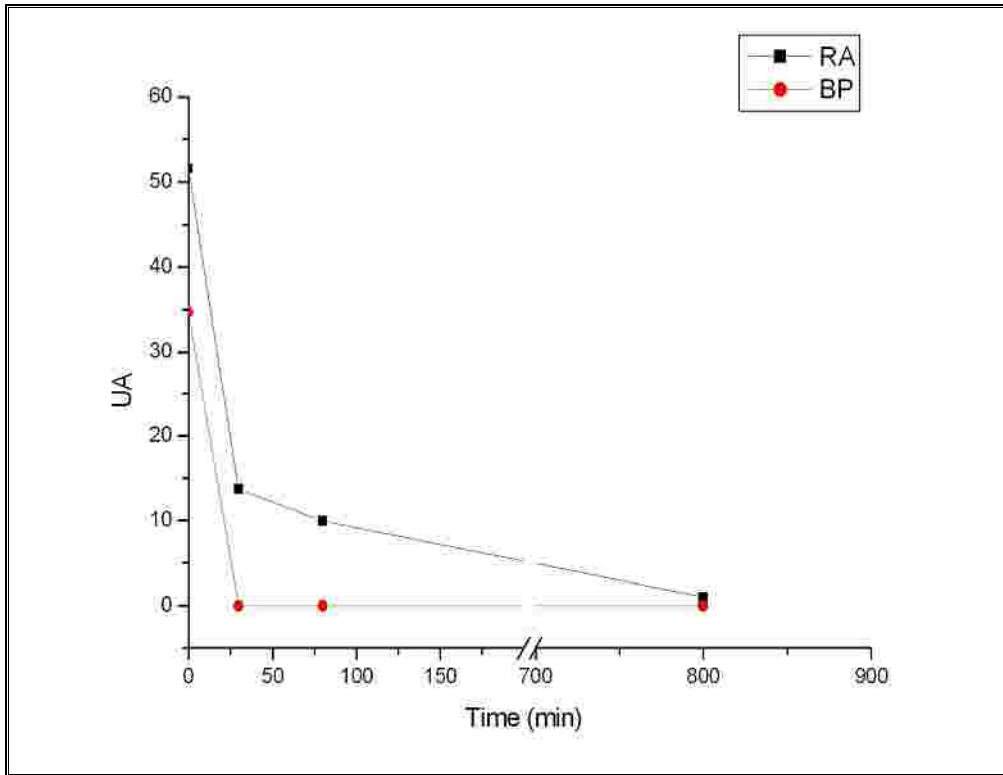


Figura r9a. Cinética de digestión de la cadena α de fibrinógeno por parte de ambos venenos.

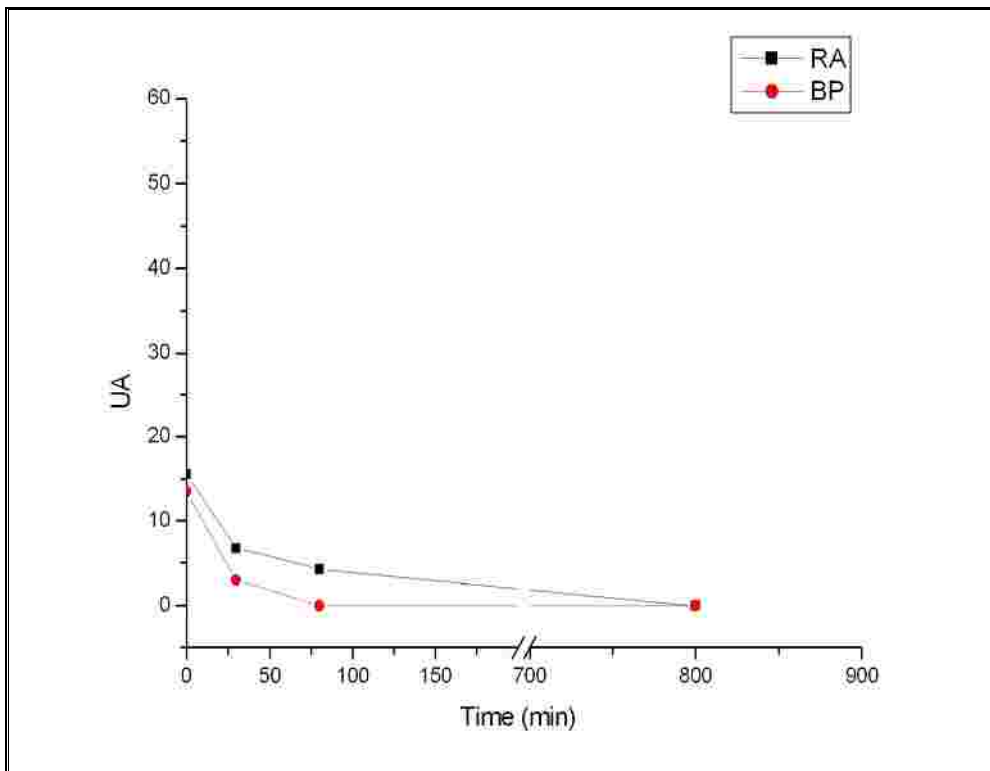


Figura r9b. Cinética de digestión de la cadena β de fibrinógeno por parte de ambos venenos.

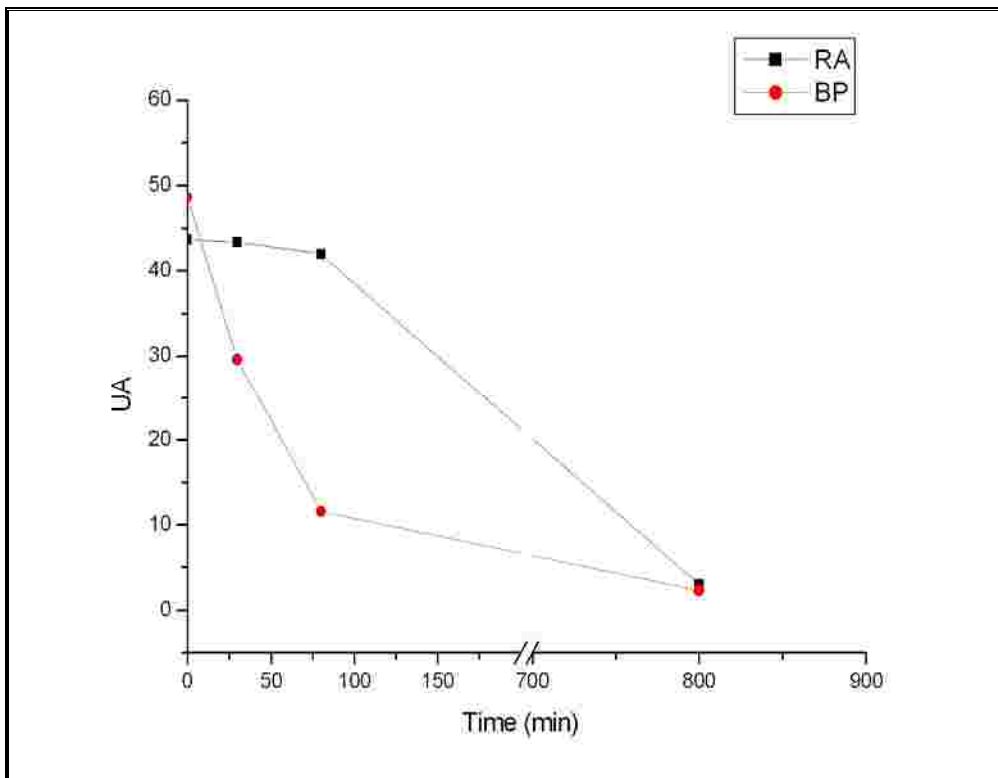


Figura r9c. Cinética de digestión de la cadena α de fibrinógeno por parte de ambos venenos.

3.2 Evolución de la concentración de veneno en los pacientes

Para el siguiente objetivo se contó con la participación de 29 pacientes de los cuales se obtuvieron 19 muestras de sangre obtenidas antes de iniciar el tratamiento con suero antiofídico (pre-saof), 19 muestras de sangre a las 12 horas de iniciado el tratamiento (post-12) y 15 muestras obtenidas a las 24 horas de iniciado el tratamiento (post-24). Las manifestaciones clínicas de los pacientes, así como sus características al arribo al hospital se muestran en la tabla r10.

En la gran mayoría de los casos el accidente se consideró entre leve y moderado, presentando al menos una de las características del envenenamiento (edema, alteraciones en el tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, niveles de fibrinógeno) (Pinho & Pereira, 2001). En dos de los casos fueron considerados como muy leves o dudosos. Estos pacientes mostraban señales de mordedura pero sin la presencia de edema. Uno de ellos presentaba parámetros normales de coagulación, protrombina y fibrinógeno mientras que el otro presentaba un mínimo descenso en los niveles de fibrinógeno sin cambios en el tiempo de coagulación. Ambos recibieron 4 viales de suero antiofídico y fueron dados de alta 4 días más tarde.

Uno de los casos fue considerado como grave. El paciente presentaba edema importante, sangrado, petequias y alteraciones serias la coagulación. Además presentaba una importante trombocitopenia. Recibió 8 viales de suero antiofídico al ingreso y 8 viales más al día 5 de tratamiento. Estuvo internado en terapia intensiva por 10 días y solo comenzó a recuperarse luego de recibir 8 viales al día 5. Fue dado de alta a las 2 semanas. Este paciente además presentó un efecto de envenenamiento tardío que se analiza más adelante en esta sección. No se reg casos.

Tabla r10.

Característica	
Género (% masculino)	72
Edad (rango de años)	14 - 68
Mordida en miembro inferior (%)	69
Tiempo transcurrido entre mordedura e inicio del tratamiento (% menor de 3 horas)	97
Presencia de doble marca de mordida (%) ^a	93
Dolor (%) ^a	55
Edema (%) ^a	59
Tiempo de coagulación (% más de 30 minutos o incoagulable) ^a	55
Equimosis (% alrededor de la mordida) ^a	34
Numero de viales de antiveneno recibido (% 4 viales)	76
Numero de viales de antiveneno recibido (% 8 viales)	21
Numero de viales de antiveneno recibido (% más de 8 viales)	3
Días de internación (% menor de 6 días)	97

a) Al arribo al hospital

Capacidad neutralizante del suero antiofídico.

Durante la realización de este estudio el suero antiofídico utilizado en la clínica correspondió al procedente del Instituto Vital Brasil fragmento F(ab)₂, Instituto Vital Brasil, Antiofídico Polivalente, RJ, Brazil).

Fueron realizados los controles de potencia expresados mediante dosis efectiva media (ED50) de este suero para determinar su capacidad neutralizante frente a los venenos nacionales. Los resultados se muestran en la tabla r11.

Los requerimientos de potencia de los sueros usados en Uruguay exigen una dosis efectiva media mínima de 2,5 mg/mL para *Bothrops alternatus* y 1,5 mg/mL para *Bothrops pubescens* (Carreira et al., 2005). A pesar de que el suero Vital Brazil no contiene el componente *B. pubescens* en su fórmula, de todas formas posee una buena neutralización cruzada y cumple con lo requerido.

Tabla r11. Determinación de la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos utilizados en este estudio

	Vital Brazil (lote 085106)	Instituto de Higiene (lote 2B)
Antígenos incluidos en suero antiofídico	<i>B. jararaca</i> ; <i>B. jararacusu</i> ; <i>B. alternatus</i> ; <i>B. neuwiedi</i> ; <i>B. mojeini</i>	<i>B. alternatus</i> ; <i>B. pubescens</i>
Veneno	ED50	ED50
<i>Bothrops alternatus</i>	2,5 mg/mL	2,7 mg/mL
<i>Bothrops pubescens</i>	> 2,5 mg/mL	> 3 mg/mL

Determinación de veneno en sangre.

Para cumplir con este objetivo se desarrolló el ELISA que se detalla en la sección 2.11 de Materiales y Métodos.

Este ELISA tiene un límite de detección de 15 ng/mL y un límite de cuantificación de 20 ng/mL y presenta una respuesta lineal entre 16 y 128 ng/mL. La curva de calibración hallada se solapa cuando se utilizó cualquiera de los venenos o la mezcla de los mismos como curva. Por lo tanto se procedió a utilizar una solución que contiene 50 % de ambos venenos, siendo el resultado independiente de la especie que causó el accidente.

Los resultados de las determinaciones de veneno en sangre en los pacientes se describen en la tabla r13. De las 19 muestras obtenidas antes de comenzar el tratamiento (pre-saof) solo una muestra estuvo por debajo del límite de cuantificación del ELISA. Esta muestra casualmente correspondió a uno de los pacientes considerados dentro del grupo muy leve o dudoso. En este caso, teniendo en cuenta las manifestaciones clínicas y el resultado del ELISA podría considerarse que el ofidio inyectó muy poco veneno, no inyectó veneno o fue mordido por una especie no venenosa. En el otro caso perteneciente a este grupo se pudo cuantificar una concentración mínima de veneno (20 ng/mL) y se pudo concluir que ese paciente efectivamente había sido mordido por un ofidio ponzoñoso.

Tabla r13. Determinación de veneno en sangre obtenida de los pacientes tratados por accidente ofídico.

Muestra	Total	Muestras positivas	Promedio* (ng/mL)	Mediana* (ng/mL)	Rango (ng/mL)
Pre-Saof	19	18	57	55	140 – 0
Post-12 hrs	19	3	20	20	20 – 0
Post-24 hrs	15	0	-	-	-

* Muestras positivas

En promedio se obtuvo una concentración de veneno en sangre de 57 ng/mL con un rango de 0 a 140 ng/mL. No fue posible relacionar la concentración de veneno con la gravedad del accidente debido a que la mayoría de los pacientes presentaron manifestaciones clínicas que corresponden a accidentes leves a moderados. La distribución de las concentraciones de veneno en las muestras pre-suero se pueden observar en el histograma de la figura r14.

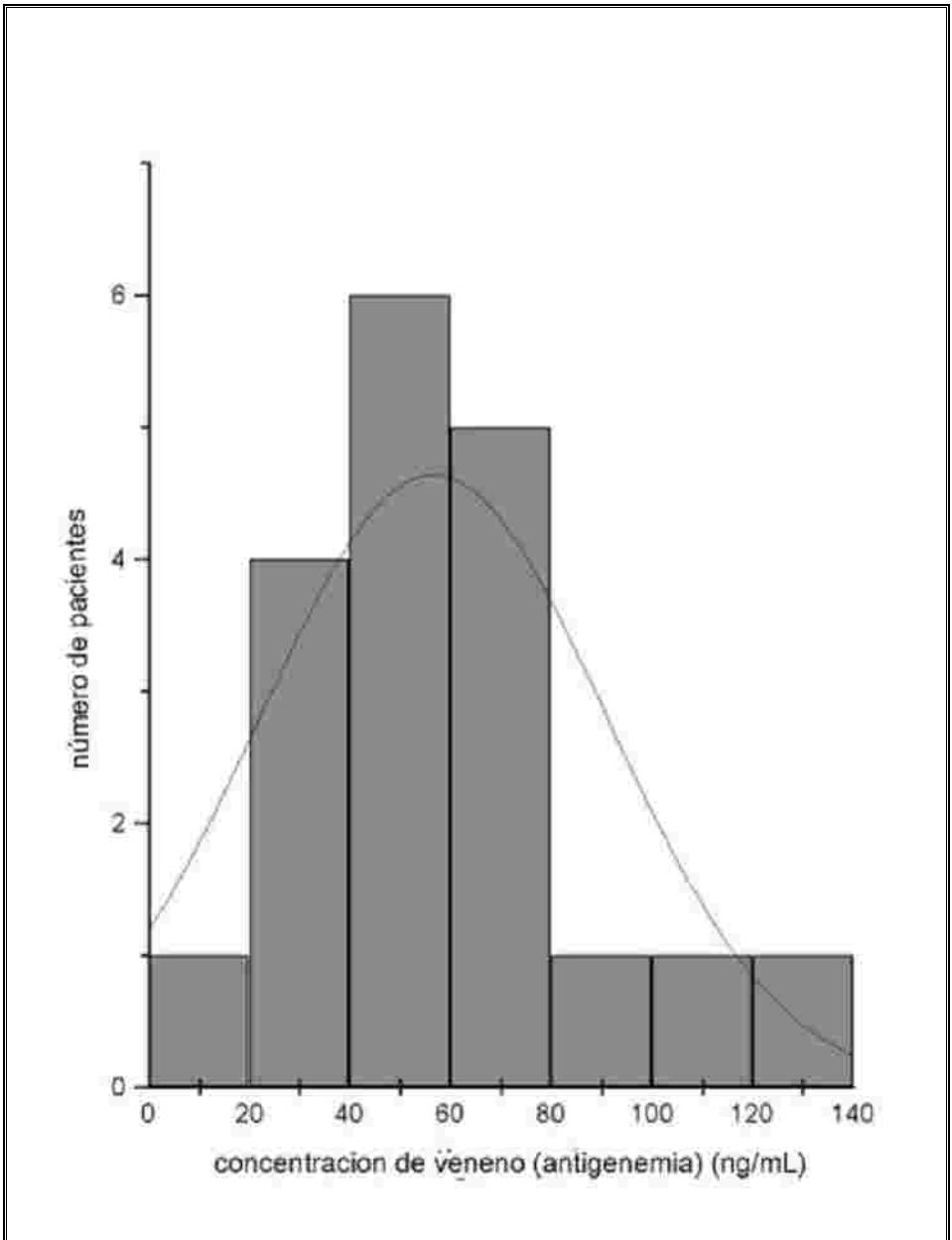


Figura r14. Histograma de distribución de las concentraciones de veneno en las muestras pre-saof

En las muestras obtenidas a las 12 horas de iniciado el tratamiento (post-12 hrs), solo se pudo detectar la presencia de veneno en 3 de las 19 muestras. En los 3 casos se determinó la concentración mínima cuantificable (20 ng/mL). Ninguno de los 3 pacientes manifestó particularidades en comparación con el resto de los pacientes.

A las 24 horas de iniciado el tratamiento (post-24 hrs) no se detectó veneno en ninguno de los 15 casos analizados.

Uno de los pacientes estudiados presentó un envenenamiento grave. Lamentablemente no se pudo obtener la muestra pre-saof de este paciente, pero si muestras posteriores en las que se determina un fenómeno de envenenamiento tardío que se detalla más adelante en esta sección.

3.3 Evolución de la concentración de suero antiofídico en sangre.

Con este propósito se desarrolló el ELISA de captura detallado en la sección 2.12, que tiene un límite de detección de 0,03 U/mL y un límite cuantificación de 0,06 U/mL con una respuesta lineal entre 0,03 y 0,5 U/mL. En este caso se utilizó como referencia para realizar la curva de calibración el suero antiofídico proveniente de Vital Brazil, del mismo origen que el usado en el tratamiento.

Se determinaron las concentraciones a las 12 hrs, 24 hrs y 15 días. Los resultados se presentan en la figura r15.

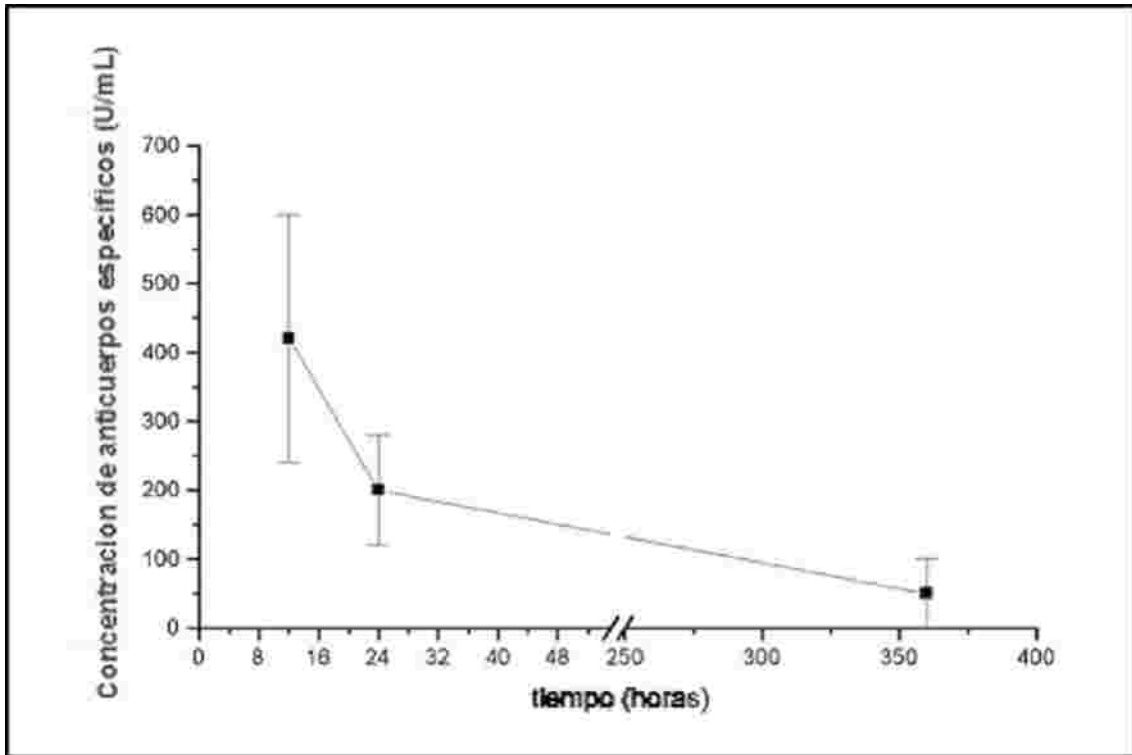


Figura r15. Evolución de la concentración de anticuerpos específicos del suero antiofídico en sangre de los pacientes

Claramente se puede observar que la velocidad de desaparición entre las 12 y las 24 horas es mucho mayor que entre las 24 horas y los 15 días

Como forma de acercamiento al tema se plantea realizar los cálculos de tiempo de vida media en ambos períodos considerando una desaparición primer orden utilizando para ello las siguientes expresiones:

$$C_t = C_i \cdot e^{-kt}$$

C_t (concentración de anticuerpos específicos de SAOF a tiempo t) ; C_i (concentración de anticuerpos específicos de SAOF inicial) ; K (constante) ; t (tiempo)

y

$$T_{1/2} = \ln 2/k$$

es el tiempo medio de desaparición

Se realizan los cálculos para cada caso y se calculan los promedios. Los resultados se muestran en la tabla r16.

Tabla r16.

	T ½ promedio (hrs)	T ½ mediana (hrs)	T ½ rango (hrs)	N (muestras)
12 -24 horas	20,0	19,8	12,7 - 31,2	12
1-15 días	115	100	46 - 223	6
	Prueba T	< 0,05		

Se comparan ambos grupos mediante una prueba T y esta indica claramente que los tiempos de vida media (T ½) son distintos. De esta forma se puede considerar que los mecanismos de desaparición de las inmunoglobulinas específicas del suero antiofídico en ambos períodos son distintos.

3.4 Envenenamiento tardío

Desde el punto de vista clínico, este fenómeno se refiere a la aparición tardía de síntomas de envenenamiento luego de que el paciente comenzara a restablecerse (Ho et al., 1990).

Este fenómeno puede darse hasta luego de varios días de comenzado el tratamiento y probablemente tenga relación con un efecto del tipo “reservorio” desde donde el veneno difunde lentamente hacia los vasos. De esta forma el suero antiofídico va neutralizando el veneno hasta que se supera su capacidad de neutralización y el paciente vuelve a manifestar síntomas de envenenamiento.

En la figura r17 se observan los valores de anticuerpos específicos del suero antiofídico y veneno determinados en un paciente con envenenamiento grave. En este caso el paciente siempre manifestó sintomatología de envenenamiento hasta la segunda administración de suero antiofídico.

Nótese la presencia de veneno en sangre entre los días 2 y 4 y también la presencia de anticuerpos específicos anti-veneno en ese momento, lo que indica que no es necesario la desaparición de todo el suero antiofídico para que se manifieste este fenómeno.

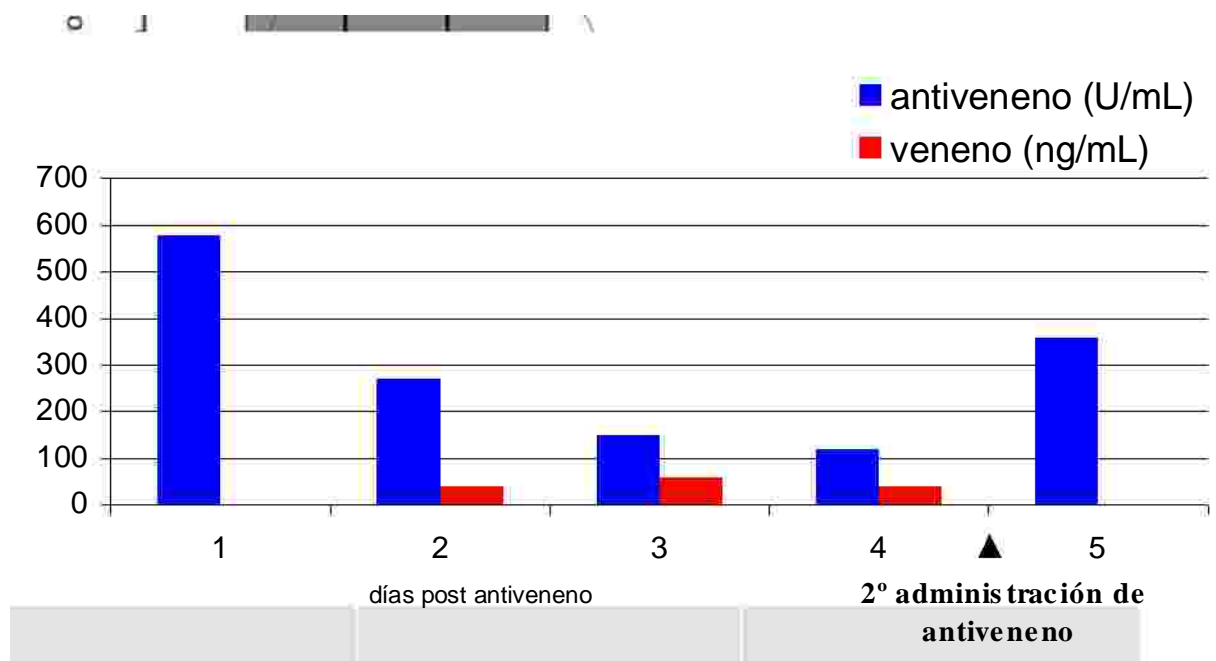


Figura r17. Evolución de los niveles de veneno y anticuerpos específicos del suero antiofídico de un paciente con envenenamiento tardío.

3.5 Análisis de la respuesta humoral de los pacientes frente al suero antiofídico

Para llevar adelante este objetivo mediante un ELISA se determinan los títulos de anticuerpos IgG e IgM reactivos contra el suero antiofídico (origen equino).

El análisis se realizó en 11 muestras de pacientes bajo tratamiento por accidente ofídico. Todos los casos fueron entre leves y moderados y recibieron 4 u 8 viales de suero antiofídico. Los pacientes (8 hombres y 3 mujeres) tenían edades de entre 10 y 58 años. Se realiza una comparación de título entre el día 0 y el día 15.

En la figura r18 se observan los títulos de IgG, mientras que en la figura r19 se observan los títulos de IgM. En color celeste se muestran los pacientes que recibieron 4 viales mientras que en azul figuran los que recibieron 8 viales.

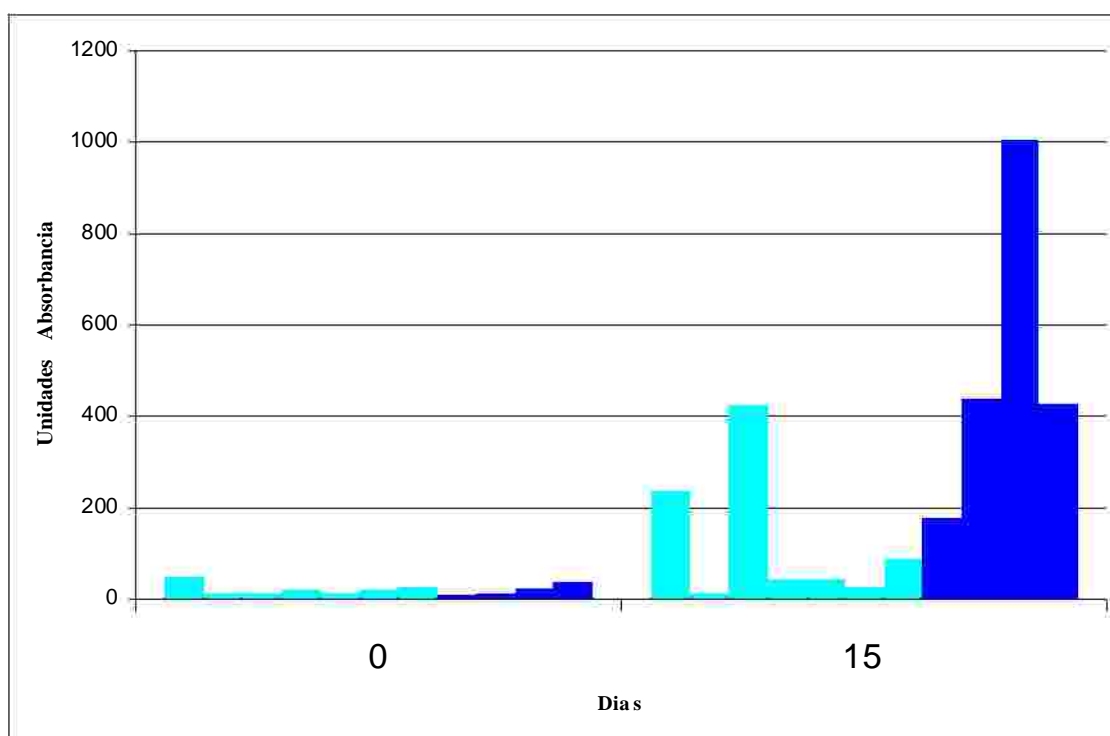


Figura r18. Evolución de los títulos de IgG contra el suero antiofídico ($F(ab')_2$ origen equino). En celeste figuran los pacientes que recibieron 4 viales y en azul quienes recibieron 8 viales.

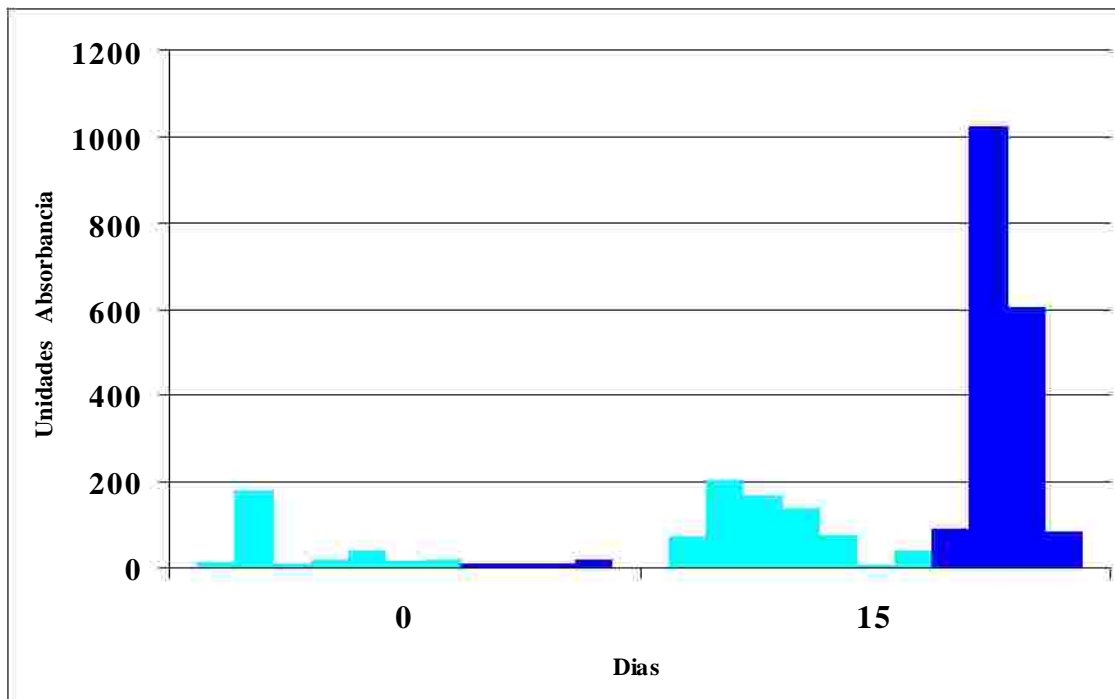


Figura r19. Evolución de los títulos de IgM contra el suero antiofídico ($F(ab')_2$ origen equino). En celeste figuran los pacientes que recibieron 4 viales y en azul quienes recibieron 8 viales.

Si bien la respuesta es heterogénea y existen pacientes que no generan título, la mayoría responde aumentando su título entre 4 y 50 veces con relación al día 0. A pesar de ello, no se registró en ninguno de estos pacientes sintomatología relacionada con la enfermedad del suero. El análisis estadístico de los datos se aprecia en la tabla r20. Los resultados expresan el fenómeno en general, aún teniendo en cuenta que existen pacientes que no generan título, de igual forma el análisis en general indica un aumento de título.

Tabla r20. Análisis estadístico de la evolución de los títulos de anticuerpos contra el suero antiofídico.

Aumento en el título de IgG		
	Día 0	Día 15
Promedio	20	265
Desvío estandar	12	299
Prueba t	0,02	
ANOVA	0,01	
Aumento en el título de IgM		
	Día 0	Día 15
Promedio	32	230
Desvío estándar	50	309
Prueba t	0,06	
ANOVA	0,05	

Por otra parte en ambas gráficas se puede observar los títulos de los pacientes que recibieron 4 viales (celeste) u 8 viales (azul). Tal como se aprecia en la tabla r21, existe una relación entre el número de viales administrados el título de anticuerpos al día 15 en el caso de las IgG, no así para el caso de las IgM. Probablemente al aumentar el número de pacientes se pueda apreciar una diferencia significativa en ambos casos.

Tabla r21. Análisis estadístico de la evolución de los títulos de anticuerpos contra el suero antiofídico según la cantidad e viales recibidos en el tratamiento.

Diferencias en el título de IgG según el número de viales		
	4 viales	8 viales
Promedio	123	512
Desvío estándar	153	351
Prueba t	0,03	
ANOVA	0,03	
Diferencias en el título de IgM según el número de viales		
	4 viales	8 viales
Promedio	102	452
Desvío estándar	72	452
Prueba t	0,07	
ANOVA	0,06	

Con el suero de 2 pacientes con alto título, se procedió a realizar un Western Blot, contra el suero antiofídico Vital Brazil (F(ab')₂) el cual se detalla en la sección 2.14 de materiales y métodos,

El resultado se muestra en la figura r22. Se observa que la respuesta es contra toda la molécula (cadenas pesadas y livianas) y también existe una respuesta contra elementos de menor peso molecular. Estos probablemente corresponden a fragmentos de inmunoglobulinas generados en el proceso de digestión péptica que se utiliza en el proceso de producción de fragmentos F(ab')₂

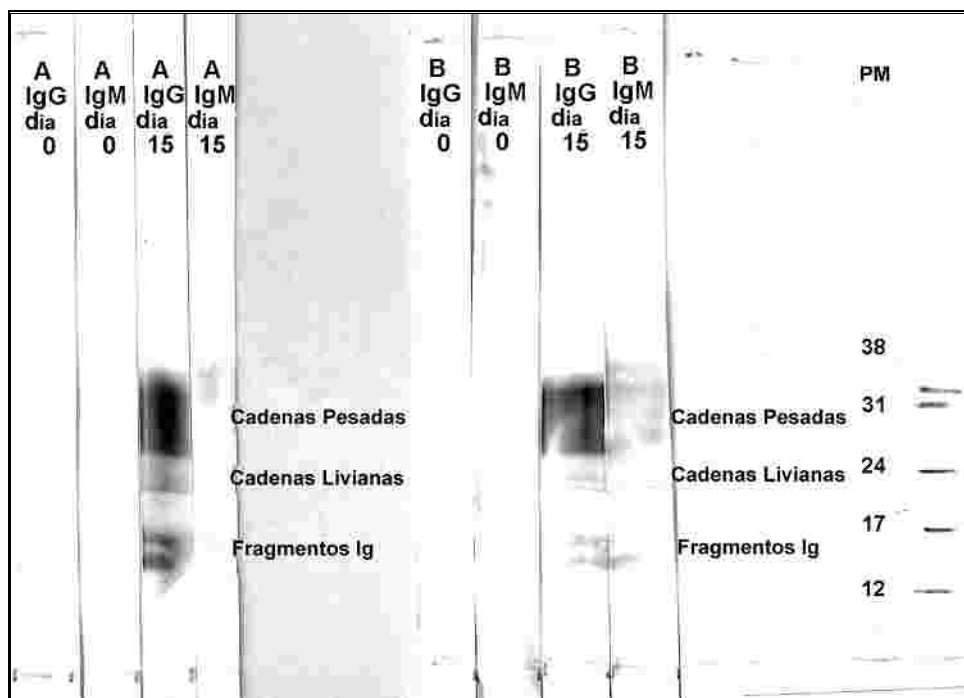


Figura r22. Identificación de la respuesta contra el suero antiofídico de 2 pacientes (A y B) seleccionados con alto título, mediante Western Blot.

3.6 Análisis de la respuesta humoral de los pacientes frente al veneno.

Para llevar adelante este objetivo se determina mediante ELISA los títulos de anticuerpos IgG e IgM reactivos contra el veneno. El análisis se realizó en las mismas 11 muestras de pacientes incluidas en el análisis anterior. El resultado de los ELISA se detalla en la figura r23.

Tal como se puede observar la respuesta es mucho más heterogénea que en el caso anterior. Es importante tener en cuenta que no es posible identificar inequívocamente cual de los dos ofidios fue el causante de accidente por lo cual se analizan ambos.

El índice de pacientes que no responden al veneno es mayor que en el caso de la respuesta contra los anticuerpos. La mejor respuesta en este caso se aprecia para las IgM contra el veneno de *Bothrops pubescens*. En principio no se puede concluir si es que la mayoría de los pacientes fueron mordidos por *Bothrops pubescens* o que esta especie genera una mejor respuesta.

Por otra parte en el caso de la respuesta en IgM contra *Bothrops alternatus*, no se detecta respuesta en ninguno de los casos, las posibles causas son las mismas que para el caso anterior.

Es muy interesante notar que uno de los pacientes es quien refleja una respuesta muy importante en IgM e IgG contra *Bothrops pubescens* y en IgG contra *Bothrops alternatus*. Este paciente no cuenta con antecedentes de haber sido mordido en alguna oportunidad anterior y casualmente es uno de los que responde mejor también en el caso de la reactividad contra el suero antiofídico. Como particularidad que puede tener relación con el título alcanzado por este paciente, se detalla en su historia clínica la presencia de una infección bacteriana concomitante con la mordedura.

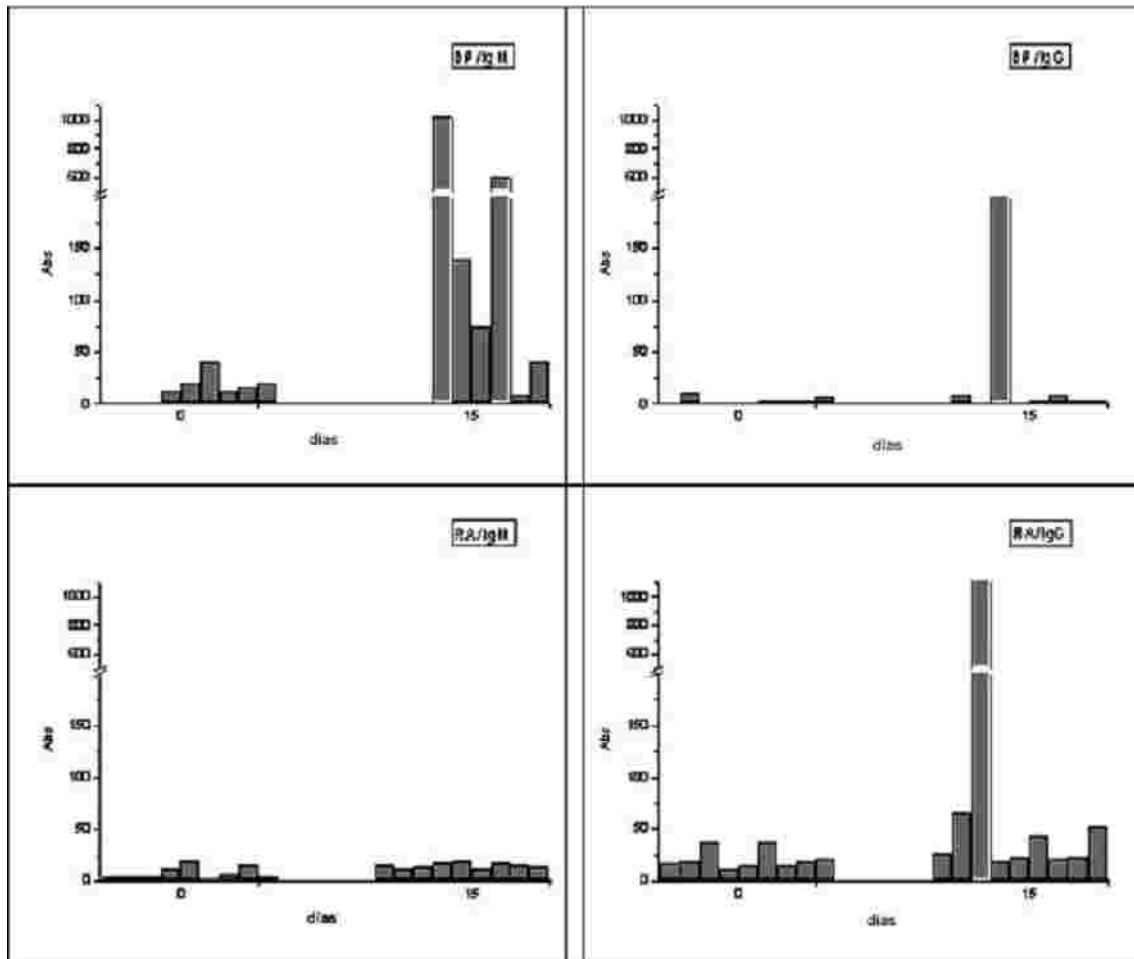


Figura r23. Evolución de los títulos de anticuerpos contra el veneno de *Bothrops pubescens* (BP) y *Bothrops alternatus* (RA). Arriba a la izquierda, respuesta IgM contra BP. Arriba a la derecha, respuesta de IgG contra BP. Abajo a la izquierda, respuesta de IgM contra RA. Abajo a la derecha, respuesta de IgG contra RA

Con el suero de este paciente se procedió a realizar un Western Blot para determinar contra que componentes se desarrolló la respuesta (figura r24). Tal como se aprecia en los carriles BP (veneno de *Bothrops pubescens* revelado con Fast Green) y BP IgG (Western blot) se puede afirmar que la respuesta es prácticamente contra todos los componentes presentes en el veneno de BP. Incluso mediante el Blot se detectan bandas que no se detectan en la tinción de proteínas de la membrana de nitrocelulosa.

Por otra parte al comparar los carriles de RA (veneno de *Bothrops alternatus* revelado con Fast Green) y RA IgG (Western blot) se puede apreciar que la respuesta no es tan extensa y solo se da en algunas bandas. Las bandas situadas a 22 KDa y 32 KDa son las que mejor reaccionan existiendo también reacción a 16 y componentes mayores a 100 KDa.

Esto da la pauta que este paciente fue mordido por una *Bothrops pubescens* y que existe una importante reactividad cruzada con *Bothrops alternatus*. En principio el Western Blot generó mejores resultados que el ELISA para poder identificar el ofidio implicado en el accidente.

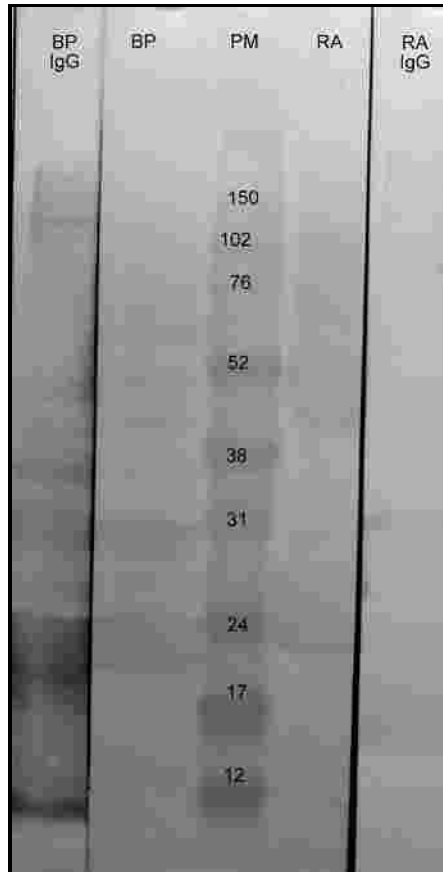


Figura r24. Identificación de la respuesta contra el veneno de *Bothrops pubescens* (BP) y de *Bothrops alternatus* (RA) de un paciente seleccionado con alto título mediante Western Blot. PM, peso molecular. BP y RA perfil proteos revelado con el colorante Fast Green. BP/IgG y RA/IgG respuesta del paciente en IgG contra ambos venenos.

DISCUSSION

4 DISCUSION

4.1 Análisis comparativo de ambos venenos.

En promedio existen en Uruguay unos 65 casos de accidentes ofídicos por año. Todos son causados por *Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens* (Carreira *et al.*, 2008).

De todos estos casos no se tienen información concreta de cuantos se deben a una u otras especie. El problema es que es difícil identificar la especie por parte de personas no expertas. En muchos casos el paciente no advierte el ofidio y en otros el contacto visual es tan acotado que no permite la identificación. Sumado a esto, la identificación por nombres comunes es confusa ya que si bien se considera como Crucera a *Bothrops alternatus* y como Yara a *Bothrops pubescens*, según la región del país se le denominan Cruceras o Yaras a todos los ofidios ponzoñosos presentes en esa zona.

En la práctica clínica la discriminación entre ambas especies no es relevante ya que la sintomatología es similar y el tratamiento es el mismo para ambos casos e incluye el mismo suero antiofídico polivalente o bivalente. Esto ofrece considerables ventajas a la hora del tratamiento ya que independientemente de cual de ambos ofidios es el involucrado, la presencia de sintomatología y la realización de los análisis clínicos correspondientes pueden indicar el inicio del tratamiento, que en todos los casos es lo adecuado.

Esta importante ventaja puede inducir el error de considerar ambas especies como la misma y simplificar el accidente solo a una especie cuando existen claras diferencias entre ambas.

En principio se consideraba que la especie *Bothrops alternatus* podía ser más peligrosa que *Bothrops pubescens* debido a que en los ensayos de DL50, *B. alternatus* posee una dosis letal media considerablemente menor que *B. pubescens*. Sumado a esto, el tamaño de *B. Alternatus* es generalmente mayor que *B. pubescens* por lo que podría inyectar más veneno.

Sin dudas este último aspecto parece más importante que el primero ya que es difícil proyectar la respuesta del veneno intravenosa en ratones la inoculación intradérmica o intramuscular en humanos. Existe otro aspecto importante a considerar que es la capacidad neutralizante de suero antiofídico frente a ambos venenos lo que se discutirá más adelante en esta sección.

Toxinas de *Bothrops alternatus*.

Existen evidencias que las toxinas más abundantes en *B. alternatus* corresponden a la familia de las metaloproteasas, principalmente del tipo PIII. Estas toxinas se corresponden con casi 1/3 del total del veneno aunque la incidencia de todos los tipos de metaloproteasas en *B. alternatus* puede sobrepasar el 50 % del total de toxinas presentes en el veneno (Öhler *et al.*, 2010). La secuenciación del n- terminal de la proteína o la digestión trípica de las bandas y posterior identificación por espectrometría de masas serían necesarias para confirmar este punto.

Las metaloproteasas tienen efectos tóxicos sistémicos lo que se refiere a alteraciones en la coagulación y hemorragias (Bjarnason & Fox, 1993; Tanjoni *et al.*, 2003) y locales generando lesión en los tejidos (Gutierrez & Rucavado, 2000; Gay *et al.*, 2005)

En el caso de este veneno las metaloproteasas parecen tener una importante participación en la actividad coagulante debido a la inhibición producida al agregar EDTA.

En relación con las fosfolipasas A2 si bien se detectó muy baja actividad hemolítica indirecta (ensayo general de fosfolipasas) en relación con *B. pubescens* esto no resta importancia a la presencia de estas toxinas en *B. alternatus*. Existen varias publicaciones que detectan actividad de fosfolipasa utilizando otro tipo de sustrato, como el 1,2-dithio análogo de diheptanoyl phosphatidylcholine (Öhler *et al.*,2010).

Por otra parte Queiroz y colaboradores (2008) realizaron en Brasil un estudio extenso acerca de la actividad de los venenos de ese país. Ellos encontraron actividad fosfolipasa en la *B. alternatus* brasilera utilizando el sustrato 4-nitro-3-octanoyloxy benzoic acid. Sin embargo en comparación con otros ofidios del género *Bothrops* poseía una actividad mucho menor.

Otra información complementaria a este tema la brinda el equipo de Ponce-Soto y colaboradores (2007). Ellos purifican, de *Bothrops alternatus*, una Fosfolipasa A2 del tipo Lys 49. llamada BaTX. Esta toxina tienen un peso molecular de 13898,71 Da y posee una alta actividad miotóxica y formadora de edema sin embargo no registra actividad in vitro utilizando el sustrato 4-nitro-3-octanoyloxybenzoic acid.

Todos estos datos pueden llevar a plantear la posibilidad de que las Fosfolipasas de esta especie son altamente selectivas o exhiben toxicidad a interactuar con su célula blanco. Un fenómeno que sucede con algunas Fosfolipasas es su activación específica en el sitio de acción. Tal es el caso de la neurotoxina Crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*. Esta toxina está compuesta por 2 subunidades, las cuales tienen baja o nula actividad Fosfolipasa. Al encontrar su receptor en los axones de los nervios motores, las unidades se separan y la subunidad B exhibe una importante actividad Fosfolipasa. (Rangel-Santosa *et al.*, 2004).

Otras toxinas informadas para el veneno de RA son: serinoproteasas (Öhler *et al.*,2010), L- aminoxidasas (Stabeli *et al.*, 2004), y Hialorunidasas (Queiroz *et al.*, 2008).

Toxinas de *Bothrops pubescens*.

Existe muy poca literatura acerca de *B. pubescens* debido que hasta el año 2000 estaba incluida en el complejo “Neuwiedi” y luego este complejo se subdividió en 7 especies (da Silva & Trefaut, 2008). *B. pubescens* es un ejemplar que queda distribuido solamente en Uruguay y sur de Brasil. Debido a esto la discusión estará apoyada en referencias de todo el complejo.

El componente más abundante detectado en *B. pubescens* correspondería al grupo de las Fosfolipasas A2 con cerca de 1/3 del total de proteínas existente en el veneno. Este resultado concuerda con el ensayo de actividad Hemolít Indirecta donde el veneno de *B. pubescens* posee una alta actividad. En principio las Fosfolipasas de este veneno estarían activas y tendrían una especificidad amplia.

En lo que refiere a las gelatinas ambas especies comparten similitudes, aunque a distinta concentración, sin embargo *B. pubescens* desarrolla actividad gelatinasa en el rango de 25-35 KDa mientras que *B. alternatus* carece de actividad en esta zona. En la región se encuentran reportadas la presencia de PI metaloproteasas o serinoproteasas (Rodrigues *et al*, 2000; Costa *et al.*, 2009). En relación a las serinoproteasas, Costa y colaboradores (2009) describen una enzima tipo trombina de 35 KDa en *Bothrops pauloensis* que podría estar relacionada con la banda detectada. La toxina tiene una importante actividad sobre el fibrinógeno y podría corresponder a la degradación detectada en nuestro ensayo La secuenciación del n- terminal de la proteína o la digestión trípica de las bandas y posterior identificación por espectrometría de masas serían necesarias para avanzar en este punto.

Otros aspectos de la actividad de los venenos.

La actividad enzimática sobre el fibrinógeno es de gran importancia tanto en los aspectos toxicológicos, como en los aspectos biotecnológicos y de desarrollo de nuevos fármacos. En lo que refiere a los aspectos toxicológicos, la actividad hemostática es una

de los principales y más graves efectos sistémicos producidos por los venenos de las especies pertenecientes al género *Bothrops*.

Por otro lado la activación de fibrinógeno tiene relevancia en una gran cantidad de enfermedades, entre ellas las enfermedades cardiovasculares. La identificación de enzimas fibrinolíticas es una de las líneas de investigación más importantes para el tratamiento de enfermedades vasculares ocluyentes como trombosis o infartos cerebrales.

El fibrinógeno está compuesto por 3 pares de cadenas polipeptídicas llamadas α , β y γ , unidas por puentes disulfuro (Uitte *et al.*, 2009). Cuando la Trombina es activada por cualquiera de las vías de la coagulación, esta proteasa corta 2 péptidos de las cadenas α y β (fibrinopéptidos), lo cual hace que quede expuesta una zona hidrofóbica en la molécula de fibrinógeno, produciendo la agregación del mismo debido a interacciones hidrofóbicas (Doolittle *et al.*, 1996). La Trombina también activa el Factor XIII, que es una transglutaminasa que forma enlaces covalentes entre las moléculas de fibrina, estabilizando el coágulo.

La presencia en el veneno de enzimas similares a la Trombina está publicado (Costa *et al.*, 2009) y es importante para el efecto pro-coagulante del veneno. Por otro lado, la presencia de enzimas fibrinolíticas también ha sido señalada (Marckland 1998; Swenson & Marckland, 2005) en otras especies y, por lo que se observa en el patrón de digestión de fibrinógeno, es posible que también estén presentes en estas especies.

4.2 Capacidad neutralizante del suero antiofídico.

El protocolo de tratamiento para el accidente ofídico exige que el suero antiofídico tenga como mínimo una dosis efectiva media de 2,5 mg/mL para *Bothrops alternatus* y 1,5 mg/mL para *Bothrops pubescens* (Carreira *et al.*, 2007). La mayor exigencia de potencia para *B. alternatus* no está totalmente justificada pero se considera que fue impuesta debido a en promedio un mayor tamaño de esta especie en relación con *B. pubescens*, por ende la capacidad de inocular mayor cantidad de veneno. Tal es así que una dosis de suero antiofídico (4 viales) esta pensada para neutralizar 100 mg de veneno de *B. alternatus* y 60 mg de veneno de *B. pubescens*.

Sin embargo al desarrollar el suero antiofídico bivalente en los equinos, el veneno de *B. pubescens* obtiene una mejor respuesta neutralizante que el veneno de *B. alternatus*, como se muestra en la tabla r10. Como regla general, la potencia de los sueros bivalentes es casi un 50 % mayor para el componente *B. pubescens* que para *B. alternatus*. Más interesante aún es que en los sueros polivalentes de origen brasilero, que no incluyen en su fórmula a *B. pubescens*, la regla se mantiene y neutralizan mejor el componente letal de *B. pubescens* que el de *B. alternatus*.

La posible explicación sobre este punto es que, tal como se manifestó en la sección anterior, ambos venenos comparten gran parte de la identidad de las toxinas, por lo que se genera también una importante reacción cruzada. Sin embargo, *B. alternatus* debe poseer un componente letal particular y de menor capacidad inmunogénica que los componentes de *B. pubescens* y los componentes comunes a ambos venenos. Este funciona como limitante o como toxina alfa según los postulados de Christensen mencionados en la Introducción.

En la práctica esto genera que en la clínica se disponga de sueros antiofídicos de mayor potencia sobre *B. pubescens* que sobre *B. alternatus*. Entonces un suero antiofídico que neutraliza 2,5 mg/mL del componente de *B. alternatus* (100 mg/dosis) neutraliza alrededor de 3,5 mg/mL de *B. pubescens* (140 mg/dosis). Si a esto se le suma la premisa que *B. alternatus*, al ser de mayor tamaño, puede inocular mayor cantidad de veneno que *B. pubescens*, podemos llegar a la conclusión de que los casos que requieren más de una dosis de suero antiofídico probablemente correspondan a envenenamientos por *B. alternatus* y no por *B. pubescens*. Esto conlleva también a esperar que los casos más graves detectados, donde fue necesaria la administración de hasta 4 dosis de suero antiofídico, correspondan también a envenenamientos por *B. alternatus*.

4.3 Determinación de veneno en sangre de los pacientes.

Se desarrolló un ELISA con el fin de obtener datos acerca de la concentración de veneno en sangre o la concentración de antígenos de veneno en sangre. El ensayo

desarrollado no posee una alta sensibilidad (20 ng/mL) pero es suficiente para poder cuantificar los niveles de veneno presentes en los pacientes mordidos en Uruguay.

Si se desea aumentar la sensibilidad del ensayo el uso de anticuerpos biotinilados ha demostrado aumentar la sensibilidad del ensayo hasta límites cercanos a 1 ng/mL (Kulawickrama *et al.*, 2010).

La concentración de veneno detectada al arribo al hospital depende de varios factores incluyendo la especie agresora, su tamaño y el accidente particular (O’Leary *et al.*, 2006; Kulawickrama *et al.*, 2010).

El nivel promedio de veneno encontrado en los pacientes al ingresar al sanatorio fue de 57 ng/mL con un rango entre 20 y 140 ng/mL. Resultados comparativos con otras serpientes del género *Bothrops* se muestran en la tabla d1. Tanto en Colombia como e Martinica los resultados son similares a los obtenidos en Uruguay.

Tabla d1. Cuantificación del veneno en pacientes en otros países de América con accidentes por ofidios del género *Bothrops*

País	Especie	Promedio	Media	Referencia
Brasil	<i>B. jararaca</i>	224 ng/mL	113 ng/mL	Franca <i>et al.</i> (2003)
Colombia	<i>B. atrox</i>	67 ng/mL		Otero <i>et al.</i> (1996)
Martinica	<i>B. lanceolatus</i>	6 – 80 ng/mL		Bucher <i>et al.</i> (1997)

En el caso de Martinica fue posible relacionar la cantidad de veneno del paciente al ingreso con la gravedad del accidente (Bucher *et al.*, 1997). En nuestro caso no fue posible debido a que la gran mayoría de los pacientes sufrieron un envenenamiento en el rango de leve a moderado.

En Brasil se obtienen valores sensiblemente mayores en los accidentes de *B. jararaca*. De todas formas, si se observan mejor los resultados y si se comparan con la mediana obtenida, se puede concluir que la mayoría de los casos registrados en Brasil tienen un nivel similar de veneno en sangre a los ocurridos en los otros países (Franca *et al.*, 2003). Existen sin embargo casos particulares en los cuales se detectan muy altas concentraciones de veneno en sangre (> 400 ng/mL), los cuales elevan el promedio. Esto se deba posiblemente a la detección de casos excepcionales de rápida difusión del veneno a la sangre debido a una mordedura en un tejido muy vascularizado que no se detectan en nuestro ensayo debido al número de pacientes estudiados.

4.4 Evolución de los niveles de suero antiofídico en los pacientes

En la figura r15 de los resultados se puede apreciar claramente una mayor tasa de desaparición de los anticuerpos específicos del suero en el período que va desde las 12 a 24 horas que en el periodo que va de las 24 horas a los 15 días.

Ho y colaboradores (1990) reportaron una caída de la concentración del suero antiofídico del tipo bifásica en pacientes mordidos en Asia por *Calloselasma rhodostoma*. Ellos identificaron una primera fase de eliminación rápida que denominaron de distribución y una segunda fase más lenta con una caída de primer orden que denominaron fase de eliminación. Los tiempos de vida media informados para cada fase fueron de 0,3 a 1,96 horas para la primera fase dependiendo del tipo de suero antiofídico usado, y de 45 a 96 horas para la segunda fase. En la primera fase se darían los fenómenos de distribución compartimental y ización del veneno presente en sangre, mientras que en la segunda etapa se daría la eliminación del suero antiofídico excedente.

Por otra parte Vázquez y colaboradores (2005), trabajando con suero antiescorpión en pacientes sanos, lograron determinar 4 componentes de desaparición usando una ecuación tri-exponencial. Las dos primeras fases fueron relacionadas con la distribución corporal (0,25 y 3,3 horas) mientras que las dos restantes se relacionaron con la eliminación del suero (14,2 y 161 horas).

Teniendo en cuenta los antecedentes publicados por Ho *et al.* (1990) y que el ensayo de ELISA detecta principalmente anticuerpos específicos IgG , se puede determinar que la desaparición de los anticuerpos entre las 12 y 24 horas correspondería a la neutralización del veneno que difunde de los tejidos hacia los vasos, lugar donde se da principalmente esta reacción.

En cambio, la desaparición entre las 24 horas y los 1 días correspondería a la eliminación de los anticuerpos remanente, probablemente debido a un proceso de endocitosis y de una respuesta humoral contra el suero antiofídico, tal como se detectó en este trabajo.

Los procesos de desaparición por distribución corporal y el de desaparición por neutralización del veneno presente en sangre cuando se administra el suero antiofídico se dan en tiempos menores a las 12 horas (Ho *et al.*, 1990), por lo que no fueron cubiertos por este estudio.

En conclusión, existirían al menos 4 tiempos distintos de eliminación de los anticuerpos específicos del suero antiofídico: el de distribución corporal, el de neutralización del veneno existente en sangre, el de neutralización del veneno que difunde de los tejidos, y el de eliminación del suero antiofídico excedente.

4.5 Envenenamiento tardío

En el caso considerado como severo (resultados 3.4), en la sangre del paciente se detectó la reaparición de veneno en presencia de una importante cantidad de suero antiofídico (anticuerpos específicos) a partir del segundo día de ingresado (figura r17).

Ho y colaboradores (1990) observaron que, en pacientes con señales de envenenamiento tardío, se comenzaba a detectar veneno en sangre cuando los niveles de suero antiofídico descendían por debajo del 20 % del nivel medido al ser administrado.

Este fenómeno es confuso, ya que los ensayos de ELISA, tanto para la determinación de veneno como de anticuerpos específicos del suero antiofídico, detectan principalmente ambos compuestos en forma libre. Esto significa que en un momento dado coexisten veneno y anticuerpos específicos anti-veneno, que no interactúan entre sí.

La explicación de este fenómeno se basa en la multiplicidad de toxinas que componen el veneno y la multiplicidad de anticuerpos que componen el suero antiofídico. Sin duda existen anticuerpos contra toxinas importantes del veneno que se agotan en primera instancia, por lo que esas toxinas circulan en sangre sin poder ser neutralizadas y son detectadas por nuestro ensayo de determinación de veneno. Por otra parte existen anticuerpos excedentes que reaccionan contra otras toxinas que fueron completamente neutralizadas en el paciente y son detectadas por nuestro ensayo de determinación de suero antiofídico.

Las toxinas que agotan los anticuerpos en primera instancia, pueden ser consideradas las toxinas dominantes del veneno y su identificación es de crucial importancia para entender los mecanismos de toxicidad de los venenos y para desarrollar nuevos sueros con mayor y mejor poder neutralizante.

4.6 Desarrollo de anticuerpos contra el suero antiofídico.

El accidente ofídico y su tratamiento implica el ingreso al organismo del paciente de 2 tipos distintos de antígenos que pueden generar una respuesta inmune: suero antiofídico de origen equino (inmunoglobulinas equinas) y toxinas provenientes de las serpientes.

La respuesta humoral contra el suero antiofídico está relacionada con la mayoría de las reacciones adversas causadas por este fármaco (Morais & Massaldi, 2009).

La enfermedad del suero fue reportada por primera vez principios del siglo XX, pocos años después de comenzar el uso de los sueros heterólogos por Pirquet and Schick (Silvertein, 2000). Esta es una enfermedad tardía causada por inmunocomplejos (complejos formados por una red de antígenos multivalentes y anticuerpos). En el caso de que el paciente haya estado expuesto anteriormente a suero antiofídico puede desencadenarse una enfermedad del suero temprana que se da a unos pocos días de recibido el suero antiofídico.

Estos reportes de principios de siglo son la prueba clínica de la respuesta en anticuerpos del paciente al suero antiofídico. En nuestro caso, si bien la mayoría de los pacientes mostraron respuesta contra el suero antiofídico, ninguno de los pacientes mostró sintomatología de enfermedad del suero ya que no solo es necesario la presencia de anticuerpos anti suero antiofídico sino que deben estar en la proporción correcta para producir los inmunocomplejos.

De todas formas es importante reducir o evitar esa respuesta ya que se evita esta reacción secundaria y se minimizan también las posibilidades de que el paciente genere IgE anti suero antiofídico y aumenten las posibilidades de un shock anafiláctico sistémico.

La premedicación con corticoides es una práctica antigua que aún se encuentra en uso en Uruguay y otros países con el fin de reducir la respuesta inmune. En nuestro caso, en principio los corticoides no impidieron el desarrollo de una respuesta contra el suero antiofídico. La literatura hasta el momento es controversial acerca de este procedimiento aunque cada vez aparecen más pruebas que ponen en duda su utilidad. (Williams *et al.*, 2007; Caron *et al.*, 2009).

Otra alternativa muy usada para disminuir las reacciones adversas es el uso de fragmentos de inmunoglobulinas en lugar de la molécula entera. Esta hipótesis no ha podido ser comprobada mediante la realización de ensayos clínicos. (Otero-Patiño *et al.*, 1998; León *et al.*, 2008). Por otra parte León *et al.* (2001), ensayando en ratones, encontró que las inmunoglobulinas enteras generaban una mayor respuesta humoral que los fragmentos $F(ab)_2$. En nuestro caso el uso de $F(ab)_2$ no solo no evitó la respuesta contra las inmunoglobulinas de caballo sino que además la respuesta se generó contra

ambas cadenas. En una próxima etapa de investigación se plantea comparar en humanos la respuesta a las Ig enteras y al fragmento F(ab')₂ y poder determinar si la eliminación del Fc tienen alguna implicancia en este aspecto.

Por último la relación existente entre el nivel de la *anti-toxina* y la cantidad de viales administrados da la pauta de lo importante que sería la reducción de la cantidad de proteína inyectada manteniendo el poder neutralizante. Se cuantificó la cantidad de proteínas de uno de los lotes del suero Vital Brazil y se obtuvo una concentración de 45 mg/mL. Esto implica que un paciente recibe 1,8 g de inmunoglobulinas equinas cuando se le administran 4 frascos de suero antiofídico y 3,6 g cuando se le administran 8 frascos. Estos valores reflejan la cantidad importante de proteína heteróloga inyectada al paciente de forma intravenosa. Por todo esto se vuelve importante el desarrollo de protocolos de inmunización que mejoren los títulos y además desarrollo de sistemas de purificación que seleccionen principalmente los anticuerpos neutralizantes con el fin de reducir la cantidad de proteína heteróloga inyectada al paciente.

4.7 Desarrollo de anticuerpos contra el veneno.

El conocimiento de la respuesta inmune humoral contra *veneno* es importante para entender cómo el sistema inmune interacciona con las toxinas. También puede ser útil para desarrollar sistemas de diagnóstico que identifiquen la especie involucrada en un accidente en particular.

Uno de los primeros trabajos realizados en este área fue realizado por Theakston y colaboradores en Nigeria en el año 1981 (Theakston et al. 1981). Ellos detectaron anticuerpos contra el veneno de *Echis carinatus* sólo a los 2 meses después del accidente, pero no lograron detectarlos a las 2 semanas.

Años después, Domingos y colaboradores (1990), realizaron un extenso trabajo acerca de la respuesta en IgG e IgM en pacientes mordidos por *Bothrops jararaca*. Ellos encontraron una respuesta en IgG a partir del décimo día luego del accidente y una respuesta más temprana en IgM pero que desaparecía a partir del día 20.

En nuestro caso, solo un paciente tuvo una importante respuesta contra ambos venenos. El resto en general muestra una respuesta nula o baja en IgM. En este caso se obtuvo una mejor respuesta contra *Bothrops pubescens* que contra *Bothrops alternatus*. Las causas de este resultado pueden ser que *B. pubescens* tenga componentes más antigénicos que *B. alternatus* y por lo tanto genere mejor respuesta (tal como se observa al inocular los equinos para la producción del suero antiofídico) o que simplemente la mayoría de los pacientes hayan sido mordidos por *B. pubescens*.

Este último punto es muy difícil de comprobar, ya que es difícil identificar la especie por parte de personas no expertas. Sumado a esto, la identificación por nombres comunes es confusa ya que si bien se considera como Crucera a *B. alternatus* y como Yara a la *B. pubescens*, según la región del país se le denominan Cruceras o Yaras a todos los ofidios ponzoñosos presentes en esa zona.

En lo que refiere a la identificación de las especies, Oliveira y colaboradores (2010) encontraron una banda característica de *Bothrops erythromelas* a 38 KDa. Esta banda era reactiva mediante Western Blot con las IgM de los pacientes mordidos por *B. erythromelas* a partir de las 24 horas.

En nuestro trabajo el Western Blot mostró una reacción extensa contra *B. pubescens*, reaccionando contra todas las bandas presentes en el veneno, no así contra el veneno de *B. alternatus*. Esta técnica en principio podría permitir una mejor identificación de la especie causante del accidente que el ELISA.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Los venenos de *Bothrops pubescens* y *Bothrops alternatus* tienen similitudes en composición pero varían en la abundancia relativa de cada toxinas.

Los venenos de *Bothrops pubescens* y *Bothrops alternatus* son similares en actividad en términos generales pero tienen una importante variación en lo que refiere a la actividad de Fosfolipasas A2.

El accidente por *Bothrops alternatus* en general parece ser más peligroso que el de *Bothrops pubescens* no solo por la toxicidad sino principalmente por la cantidad de veneno que pueden inocular y sobre todo por la diferencia de la actividad del suero antiofídico frente a ambos venenos.

Los niveles de veneno circulantes en pacientes mordidos por *Bothrops* en Uruguay son similares a los obtenidos en otros países con ejemplares del mismo género.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y publicaciones anteriores se puede concluir que existen al menos 4 etapas de desaparición de los anticuerpos específicos del suero antiofídico en sangre, que se dan en forma secuencial y simultánea: distribución corporal, neutralización de veneno en sangre, neutralización de veneno que difunde de los tejidos, eliminación del suero antiofídico excedente.

El suero antiofídico genera una respuesta humoral en IgM e IgG contra las inmunoglobulinas de caballo en la mayoría de los pacientes a los cuales se les administra.

Existe una relación entre el título de anticuerpos anti suero antiofídico alcanzado en pacientes y la cantidad de viales de suero antiofídico administrado. Quienes recibieron mayor número de viales generaron un título mayor de anticuerpos.

El veneno ofídico genera una respuesta humoral de menor proporción que el suero antiofídico y principalmente en IgM a los 15 días.

La respuesta humoral contra el veneno es contra la mayoría o todos los componentes del veneno.

Existe una reactividad cruzada entre ambos venenos en los anticuerpos humanos desarrollados contra el veneno de una especie según se evidencia por Western blot.

PEERSPECTIVAS
FUTURAS

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta tesis es el primer estudio acerca de los venenos de los ofidios que causan accidentes en Uruguay. Previamente el único estudio que existía consistía en la determinación de variaciones intraespecíficas del veneno de *B. pubescens* (Morais *et.al.*, 2006).

La próxima etapa a ser abordada es el análisis proteómico de ambos venenos. Mediante técnicas de electroforesis en 2D y espectrometría de masas, así como secuenciación del n-terminal de proteínas. Esto permitirá confirmar varias de los puntos tratados en esta tesis así como comenzar con el estudio particular de cada toxina.

Este último punto es de gran importancia en el área biotecnológica ya que muchas toxinas de ofidios figuran como candidatos a potenciales fármacos en un futuro cercano, para el tratamiento de diversas patologías como enfermedades cardiovasculares o cáncer.

En lo que refiere al mejoramiento del producto suero antiofídico, actualmente se encuentra en marcha un ensayo clínico doble entre el suero antiofídico producido por el Instituto de Higiene y el suero antiofídico Vital Braz 1. Se propone la comparación en efectividad, reactogenicidad y reacciones adversas. Este es un desafío importante para el suero local ya que los sueros Brasileños son reconocidos por su gran calidad.

Otros aspectos a abordar en un futuro es lo que refiere a la identificación de las toxinas limitantes para el suero antiofídico (las que se consumen primero) con el fin de poder enriquecer estos antígenos en el protocolo de inmunización y así obtener un aumento en la potencia.

En conclusión, muchas líneas de investigación tanto en el área clínica como básica se abren a partir de esta tesis esperando puedan ser llevadas adelante en un futuro no muy lejano.

REFERENCIAS

7 REFERENCIAS

Ahmed N, Gaddis R, Tennant K, Lacz J. 1990.

Biological and thrombolytic properties of fibrolase- anew fibrinolytic protease from snake venom.

Haemostasis 20, 334-340.

Ariaratnam CA, Meyer WP, Perera G, Eddleston M, Kuleratne AM, Attapattu W, Sheriff R, Richards AM, Theakston RDG, Warrel DA. 1999.

A new monospecific ovine Fab fragment antivenom for the treatment of envenoming by the Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelli russel i*): a preliminary dose-finding and pharmacokinetics study.

Am J Trop Med Hyg 61, 259 – 265

Atkinson JP. 1900.

The fractional precipitation of the globulin and albumin of normal horse's serum and diphtheria antitoxic serum, and the antitoxic strength of the precipitates.

J Exp Med 5, 67-76

Berghman LR, Abi-Ghanem D, Waghela SD, Ricke SC. 2005.

Antibodies: An Alternative for Antibiotics?

Poult Sci 84(4), 660- 666.

Bjarnason JB, Fox JW 1995.

Snake Venom Metalloendopeptidases: Reprolysins.

Chap 21. *Methods in Enzymology* 248, 345-368.

Boviatsis E, Kouyialis A, Papatheodorou G, Gavra M, Korfias S, Sakas D. 2003

Multiple Hemorrhagic brain infarcts after viper envenomation.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 68, 253 – 257

Bucher B, Canonge D, Thomas L, Tyburn B, Robbe-Vincent A, Choumet V, Bon C, Ketterlé J, Lang J, and other members of Research Group on Snake in Martinique, 1997.

Clinical indicators of envenoming and serum levels of antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91, 186 - 190.

Bull CG. 1915

The mechanism of the curative action of antipneumococcus serum.

J Exp Med 22, 457-464.

Calmette A. 1894

Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation.

Ann Inst Pasteur 8, 275 – 291

Calmette A. 1895

Contribution à l'étude des venins, des toxines et des sérums antitoxiques.

Ann Inst Pasteur 9, 225 - 251

Carrasco P., Mattoni C., Leynaud G., Scrocchi G. 2012.

Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae)

Zoologica Scripta, in press

Caron EJ, Manock SR, Maudlin J, Koleski J, Theakston RDG, Warrell DA, Smalligan RD, 2009.

Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: Was it prophylaxis or method of administration?

Toxicon 54, 779-783.

Carreira S, Meneghel M, Achaval F. 2005

Reptiles del Uruguay.

Ed. DIRAC Facultad de Ciencias UDELAR Montevideo

Carreira S, Negrin A, Tortorella MN, Pino A, Menéndez C. 2008.

Ofidismo en Uruguay. Especies peligrosas y características del accidente ofídico.

Montevideo. CID/CEUR. Tradinco, 2008.

Calvete JJ 2010.

Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms.

Toxicon 56, 1284 - 1291.

Cheng A, Winkel K, Bawaskar HS, Bawaskar PH. 2001

Call for global snake-bite control and procurement funding.

Lancet 357, 1132

Chippaux JP, Goyffon M. 1998

Venoms, antivenoms and immunotherapy.

Toxicon 36, 823 – 846

Chippaux JP, Stock RP, Massougbojji A. 2010.

Methodology of clinical studies dealing with the treatment of envenomation.

Toxicon 55, 1195-1212

Christensen PA. 1966.

Venom and antivenom potency estimation.

Mem. Inst. Butantan 33, 305-326.

Clark R, McKinney P, Chase P, Walter F. 2002.

Immediate and delayed allergic reactions to Crotalidae Polyvalent Immune Fab (ovine) antivenom.

Ann Emerg Med 396, 671 – 677

Costa F, Rodrigues R, Izidoro L, Menaldo D, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo M, Fuly A, Soares S, Selistre-de-Araújo H, Barraviera B, Soares A, Rodrigues V. 2009. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 54, 725 - 735.

da Silva VX, Trefaut Rodrigues M. 2008. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phyllomedusa* 7, 45 – 90.

De Haro L, Lang J, Bedry R, Guelon D, Harry P, Marchal-Mazet F, Jouglard J. 1998. Envenimations par vipères européennes. Étude multicentrique de tolérance du ViperfabTM, nouvel antivenin par voie intraveineuse *Ann Fr Anesth Reanim* 17, 681 – 687.

De Roodt AR, Litwin S, Angel S. 2003. Hydrolysis of DNA by 17 snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 135, 469-479.

Domingos MO, Cardoso JL, da Silva AM, Mota I. 1990. The humoral immune responses of patients bitten by the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 28, 723-726.

Doolittle RF, Everse SJ, Spraggon, G. 1996. Human fibrinogen: anticipating a 3-dimensional structure. *FASEB J* 10, 1464-1470.

Dos Santos MC, D'Imperio MR, Furtado GC, Colletto GM, Kipnis TL, Dias W. 1989
Purification of anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG
fragments with high neutralization activity, purity and yield.
Toxicon 27, 297 – 303.

Du X, KJ Clemetson. 2002
Snake venom L-amino acid oxidases.
Toxicon 40, 659 – 665

European Directorate for the Quality of Medicines (EDQ) 1997.
European viper venom antiserum.
In: European pharmacopoeia. Strasbourg: EDQM; 1997. p. 806.

Fan H, Marcopito L, Cardoso J, França F, Malaque C, Ferrari R, Thekston RDG,
Warrell D. 1999.
Sequential randomised and double blind trial of promethazine prophylaxis against early
anaphylactic reactions to antivenom for *Bothrops* snake bites.
BMJ 318, 1451 – 1453.

Fenwick AM, Gutberlet Jr RL, Evans JA, Parkinson CL. 2009.
Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South
American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes:
Viperidae).
Zool J Linn Soc 156, 617 - 640.

França FO, Barbaro KC, Fan HW, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Tomy SC, Lopes MH,
Warrell DA, Theakston RDG, Butantan Institute Antivenom Study Group. 2003.
Envenoming by *Bothrops jararaca* in Brazil: association between venom antigenaemia
and severity at admission to hospital.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 97, 312 - 317.

- Gay CC, Leiva LC, Maruñak S, Teibler P, Acosta de Pérez O. 2005.
Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom.
Toxicon 46, 546 - 554.
- Geoghegan P, Angulo Y, Cangelosi A, Díaz M, Lomonte B. 1999.
Characterization of a basic phospholipase A2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina.
Toxicon 37, 1735 - 1746.
- Guidolin R., Stephano M., Higashi H., Ferreira O., Da silva W. 1990.
Purificação de plasma anticrotálico de origem equina.
Bol. Biotecnol. 1, 11-15.
- Gutierrez JM, Rucavado A. 2000.
Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage
Biochimie 82, 841 – 850.
- Harms A.J. 1948.
The purification of antitoxic plasmas by enzyme treatment and heat denaturation.
Biochem. J 42, 390 - 397.
- Hasson SS, Theakston RDG, Harrison RA. 2004.
Antibody zymography: a novel adaptation of zymography to determine the protease-neutralising potential of specific antibodies and snake antivenoms.
J Immunol Meth 292, 131 - 139.
- Hawgood B. 1999.
Doctor Albert Calmette 1863 – 1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination.
Toxicon 37, 1241 – 1258.

Ho M, Silamut K, White NJ, Karbwang J, Looareesuwan S, Phillips RE, Warrell DA. 1990.

Pharmacokinetics of three commercial antivenoms in patients envenomed by the Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*, in Thailand.

Am J Trop Med Hyg 42, 260 - 266.

Jadhav SS, Kapre SV. 1991.

Antivenom production in India

Handbook of natural toxins Vol 5, Reptil and amphibian venoms, New York, Marcel Dekker, 584 – 608.

Jobling JW. 1909.

Standardization of the antimeningitis serum.

J Exp Med 11, 614 - 621.

Jones RGA, Carteling RL, To HP, Bhogal G, Landon J. 1999.

A novel Fab based antivenom for the treatment of the mass bee attacks.

Am J Trop Med Hyg 61, 361-366.

Junqueira-de-Azevedo I, Ho P. 2002.

A survey of gene expression and diversity in the venom of snake

Bothrops insularis through the generation of expressed sequence tags (ESTs).

Gene 299, 279 – 291.

Kini RM. 2003.

Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes.

Toxicon 42, 827 – 840.

Kini RM. 2005.

Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms.
Pathophysiol Haemost Thromb 34, 200–204.

Krifi MN, El Ayeb M, Dellagi K. 1999.

The improvement and standarization of antivenom production in developing countries:
comparing antivenom quality, therapeutical efficiency, and cost.

J. Venom. Anim. Toxins 5, 128 – 141.

Kulawickrama S, O’Leary MA, Hodgson WC, Brown SGA, Jacoby T, Davern K,
Isbister GK. 2010.

Development of a sensitive enzyme immunoassay for measles virus antigen in
serum.

Toxicon 55, 1510 - 1518.

Laemmli UK. 1970.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680 – 685.

Laing GD, Renjifo JM, Ruiz F, Harrison RA, Nasidi A, Gutierrez JM, Rowley PD,
Warrell DA, Thekston RDG. 2003.

A new Pan African polyespecific antivenom developed in response to the antivenom
crisis in Africa.

Toxicon 42, 35 – 41.

Laloo D, Thekston D, Warrell D. 2002.

The African challenge.

Lancet 359, 1527.

León G, Stiles B, Alape A, Rojas G, Gutierrez JM. 1999.
Comparative study on the stability of IgG and f(ab')₂ antivenoms to neutralize lethal and myotoxic effects induced by *Micrurus nigrocinctus* (coral snake) venom.
Am J Trop Med Hyg 61, 266 – 271.

León G, Monge M, Rojas E, Lomonte B, Gutierrez JM. 2001.
Comparison between Ig and F(ab')₂ polyvalent antivenoms: neutralization of systemic effects induced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation of muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions.
Toxicon 39, 793 – 801.

León G, Segura A, Herrera M, Otero R, de Siquiera Franca FO, Barbaro KC, Costa Cardoso JL, Hui Wen F, de Medeiros CR, Lopes Prado JC, Sant'Ana Malaque CM, Lomonte B, Gutiérrez JM. 2008.
Human heterophilic antibodies against equine immunoglobulins: assessment of their role in the early adverse reactions to antivenom administration.
Trans R Soc Trop Med & Hyg 102, 1115-1119.

Maria W, Cambuy M, Costa J, Velarde D, Chavez-olortegui C. 1998.
Neutralizing potency of horse antithrotoppic antivenom. Correlation between in vivo and in vitro methods.
Toxicon 36, 1439 – 1998.

Markland F. 1998.
Snake venoms and the hemostatic system.
Toxicon 36, 1749 – 1800.

- Martins LJ, de Araújo PMF, Bon C, Hyslop S, de Araújo AL. 2009.
In vitro hemolytic activity of *Bothrops lanceolatus* (Fer –de-lance) venom.
J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 15, 498 - 508.
- Maruñak SL, Ruíz RM, Teibler GP, Gay CC, Leiva L, Acosta O. 2006.
Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación
sanguínea.
InVet 8, 119 - 128.
- Matsui T, Fujimura Y, Titani K. 2000.
Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis.
Biochim Biophys Acta 1477, 146 – 156.
- McNamee D. 2001.
Tackling venomous snake bites worldwide.
Lancet 357, 1680.
- Morais V, Massaldi H. 2005.
Effect of pepsin digestion on antivenom activity of equine immunoglobulins.
Toxicon 46, 876 – 882.
- Morais V, Massaldi H. 2006.
Economic evaluation of snake antivenom production in the public system.
J Venom Anim Toxins inc Trop Dis 12, 497 – 511.
- Morais V, Baráibar M, Carreira S. 2006.
Intraespecific variation of *Bothrops pubescens* (Cope, 1869) venom in Uruguay
(Serpentes: Viperidae).
J Venom Anim Toxins inc Trop Dis 12(4), 604 – 611.

Morais V. 2007.

El suero antiofídico: antecedentes históricos, uso presente y perspectivas futuras.

Biomedicina UM. 3(1), 47 – 53.

Morais V, Massaldi H. 2007

Evolution of endotoxin contamination during production of a therapeutic serum.

PDA J Pharm Sci Tech 61 375-382.

Morais V, Massaldi H. 2009.

Snake antivenom: adverse reactions and production technology.

J Venom Anim Toxins inc Trop Dis 15(1), 2 – 18.

Morais, V., Massaldi, H. 2012.

A model mechanism for protein precipitation by caprylic acid: Application to plasma purification.

Biotech Appl Biochem 59, 50 – 54.

MSP. Grupo de trabajo asesor en Ofidismo. 1989.

El accidente ofídico en Uruguay.

Almanaque banco de Seguros del Estado 89, 223 – 231.

O’Leary MA, Isbister GK, Schneider JJ, Brown SGA, Curr BJ. 2006.

Enzyme immunoassays in brown snake (*Pseudonaja* spp.) envenoming: Detecting venom, antivenom and venom–antivenom complexes.

Toxicon 48, 4-11.

Öhler M, Georgieva D, Seifert J, von Bergen M, Arni RK, Genov N, Betzel C. 2010.

The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities.

J Prot Res 9, 2422 – 2437.

Oliveira Luna KP, Xavier EM, Magalhães Pascoal VP, Martins-Filho OA, Alves Pereira VR. 2010.

Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*.
Rev Soc Bras Med Trop 43, 731 - 732.

Otero R, Gutiérrez JM, Núñez V, Robles A, Estrada R, Segura E, Toro MF, García ME, Díaz A, Ramírez EC, Gómez G, Castañeda J, Moreno ME, Regional Group on Antivenom Therapy Research, (REGATHER).1996.

A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia.
Trans R Soc Trop Med Hyg 90, 696 – 700.

Otero-Patiño R, Cardozo J, Higashi H, Núñez V, Díaz A, Toro M, García M, Sierra A, García L, Moreno A, Medina M, Castañeda N, Silva J, Murcia M, Cardenas S, Dias W, regional group of antivenom therapy research. 1998.

A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia.
Am J Trop Med Hyg 58, 183 – 189.

Otero-Patiño R, Gutierrez JM, Rojas G, Nuñez V, Díaz A, Miranda E, Uribe AF, Silva JF, Ospina JG, Medina Y, Toro MF, García ME, León G, García M, Lizano S, De La Torre J, Márquez J, Mena Y, González N, Arenas LC, Puzón A, Blanco N, Sierra A, Espinal Me, Arboleda M, Jiménez JC, Ramírez P, Díaz M, Guzmán MC, Barros J, Henao S, Ramírez A, Macea U, Lozano R. 1999.

A randomized, blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in *Bothrops* and *Porthidium* snake bites Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms.
Toxicon 37, 895 – 908.

Pepin-Covatta S, Lutsch C, Grandgeorge M, Scherrmann JM. 1997.

Immunoreactivity of a new generation of horse F(ab)₂ preparations against European viper venoms and the tetanus toxin.
Toxicon 35, 411 – 422.

Pereira P, Medeiro S, de Cássia M, Wen H, Costa J, Siqueira F, Corallo S, Sano-Martins I, Cirillo M, Colombini M, Koderá N, Moura-da-Silva A, Ferreira D, Toledo D, Kamiguti A, Theakston R, Warrel D. 2004.

Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil.

Trans R Soc Trop Med Hyg 98, 28 – 42.

Pinho FMO, Pereira ID. 2001.

Ofidismo.

Rev Ass Med Brasil 47, 24 – 29.

Ponnundurái G, Chung M, Ten NH. 1994.

Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom.

Arch Biochem Biophys 313(2), 373 – 378.

Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. 2007.

Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*.

Biochim Biophys Acta 1770, 585 – 593.

Pope CG. 1938.

Disaggregation of proteins by enzymes.

Br J Exp Path 19, 245.

Pope CG. 1939.

The action of proteolytic enzymes on the antitoxin and proteins in immune sera: I True digestion of the proteins.

Br J Exp Path 20, 132.

Pope CG. 1939.

The action of proteolytic enzymes on the antitoxin and proteins in immune sera: II Heat denaturation after partial enzyme action.

Br J Exp Path. 20, 201.

Queiroz GP, Alves Pessoa L, Portaro F, Furtado MF, Tambourgi D. 2008.

Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus.

Toxicon 52, 842 – 851.

Ramos OHP, Carmona AK, Selistre-de-Araujo HS. 2003.

Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom metalloprotease.

Protein Expr. Purif. 28, 34 - 41.

Rangel-Santosa A, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso DF, Mota I. 2004.

A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*.

Toxicon 43, 801 - 810.

Raw I, Guidolin R, Higashi H, Kelen E. 1991.

Antivenins in Brazil: Preparation.

Handbook of natural toxins Vol 5, Reptil and amphibian venoms, New York, Marcel Dekker, , 557 – 583.

Raweerith R, Ratanabanangkoon K. 2003.

Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography.

J Immunol Meth 282, 63 – 72.

Rial A, Morais V, Rossi S, Massaldi H. 2006.

A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms.

Toxicon 48, 462 - 466.

Rodríguez VM, Soares A, Guerra-Sa´ R, Rodríguez V, Fontes M, Giglio J. 2000.

Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venoms.

Arch Biochem Biophys 381(2), 213 – 224.

Rojas G, Jimenez JM, Gutierrez JM. 1994.

Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a single procedure for antivenom production.

Toxicon 32, 351 – 363.

Saetang T, Treamwattana N, Suttijitpaisal P, Ratanabanangoon K. 1997.

Quantitative comparison on the refinement of horse antivenom by salt fractionation and ion-exchange chromatography.

J Chromatog B 700, 233 – 239.

Sasa M, Vazquez S. 2003.

Snakebite envenomation in Costa Rica: a revisión of incidence in the decade 1990 – 2000.

Toxicon 41, 19 – 22.

Serrano SMT, Marounb RC. 2005.

Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved.

Toxicon 45, 1115–1132.

Silverstein AM. 2000.

Clemens Freiherr von Pirquet: Explaining immune complex disease in 1906.

Nat Immunol 1, 453 – 455.

Sjostrom L, Al-Abdulla I, Rawat S, Smith D, Landon J. 1994.

A comparison of ovine and equine antivenoms.

Toxicon 32, 427 – 433.

Stabeli R, Marcussi S, Carlos GB, Pietro R, Selistre-de-Araújo H, Giglio J, Oliveira E, Soares A. 2004.

Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom

Bioorganic & Medicinal Chemistry 12, 2881 - 2886.

Steinbuch M, Audran R. 1969.

The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid.

Arch Biochem Biophys 134, 279 – 284.

Stewart C. 2003.

Snake bite in Australia: first aid and envenomation management.

Acc Emerg Nurs 11, 106 – 111.

Swenson S, Markland Jr. FS. 2005.

Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes.

Toxicon 45, 1021–1039.

Tanjoni I, Butera D, Bento L, Della-Casa M, Marques R, Takehara H, Gutierrez JM, Fernandes I, Moura da Silva A. 2003.

Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies.

Toxicon 42, 801 – 808.

Theakston RDG, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. 1977.

Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody.

Lancet. 2, 639 - 641.

Theakston RDG, Reid HA. 1979.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency.

Toxicon 17, 511 - 515.

Theakston, R.D.G., Pugh, R.N.H., Reid, H.A., 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay of venom-antibodies in human victims of snake bite.

J. Trop. Med. & Hyg. 84, 109-112.

Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. 2003.

Report of a WHO workshop on the standarization and control of antivenoms.

Toxicon 41, 541 – 557.

Toombs CF. 2001.

Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic meta loproteinase for thrombolysis.

Haemostasis 31, 141 - 147.

Uitte de Willige S, Standeven KF, Philippou H, Ariëns RAS. 2009.

The pleiotropic role of the fibrinogen ? chain in hemostasis.

Blood 114, 3994 – 4001.

Vázquez H, Chávez-Haro A, García-Ubbelohde W, Mancilla-Nava R, Paniagua-Solís J, Alagón A, Sevcik C. 2005.

Pharmacokinetics of a F(ab')₂ scorpion antivenom in healthy human volunteers.
Toxicon 46, 797 – 805.

Vital Brasil. 1898.

Alguns casos de diphtheria tratados pelo serum anti-diphtherico.
Rev Med São Paulo 1, 51 - 56.

Vital Brasil. 1901.

Contribuição ao estudo do veneno Ophidico.
Rev Med São Paulo 4(21), 255 - 260, 296 - 300, 375 - 380.

Vital Brasil. 1902.

Contribuição ao estudo do veneno Ophidico.
Rev Med São Paulo 5,6 (2, 13), 22 - 25, 265 - 278.

White J. 1998.

Envenoming and antivenom use in Australia.
Toxicon 36, 1483 – 1492.

WHO. 2007.

Rabies and envenomings, a neglected public health issue.
Report of a Consultative Meeting. Geneva, World Health Organization, 2007.
http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf).

WHO 2010.

WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins.

Publications of the World Health Organization, WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Williams DJ, Jensen SD, Nimorakiotakis B, Müller R, Winkel KD. 2007.

Antivenom use, premedication and early adverse reactions in the management of snake bites in rural Papua New Guinea.

Toxicon 49, 780 - 792.

ANEXOS