

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO NEUTRALIZANTE DEL SUERO SANGUÍNEO  
DE *Clelia equatoriana* (AMARAL, 1924) AL VENENO DE *Bothrops asper*  
(GARMAN, 1883) DEL CAUCA, COLOMBIANO**



**Álvaro Javier Patiño Jaramillo**

**Universidad del Cauca  
Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación  
Programa de Biología  
Popayán, Cauca  
2017**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO NEUTRALIZANTE DEL SUERO SANGUÍNEO  
DE *Clelia equatoriana* (AMARAL, 1924) AL VENENO DE *Bothrops asper*  
(GARMAN, 1883) DEL CAUCA, COLOMBIANO.**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

**Álvaro Javier Patiño Jaramillo**

**DIRECTOR**

**Jimmy Alexander Guerrero Vargas, PhD.**

**ASESORES**

**Diana Lorena Mora Obando, cPhD.**

**Andrés Felipe Liévano, B. Sc.**

**Universidad del Cauca  
Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación  
Programa de Biología  
Popayán, Cauca  
2017**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_

Jimmy Alexander Guerrero Vargas, PhD.

Jurado \_\_\_\_\_

Rosa Amalia Dueñas Cuellar, PhD

Jurado \_\_\_\_\_

Santiago Ayerbe Gonzáles, MD

Lugar y fecha de sustentación. Popayán, 19 de Julio de 2.017

## AGRADECIMIENTOS

Ciertamente es difícil expresar la gratitud que se tiene hacia algunas personas y para algunas personas como yo es complicado plasmarlo en palabras, es por tanto que para mí esta parte del trabajo fue la que más me costado escribir y empezar.

A través de la carrera he encontrado personas muy importantes que me han apoyado como: familiares, amigos, profesores y compañeros; así que agradezco a todas esas personas que estuvieron a través de la carrera, ya que todas me enseñaron algo y me ayudaron a través del tiempo a aprender. También quisiera agradecer a la Universidad del Cauca, al GIHT y al CIBUC por brindarme el espacio para aprender.

Debo agradecer también a mi director Jimmy y a mis asesores Diana y Felipe por su gran ayuda en el trabajo como a compañeros que estuvieron en la realización del trabajo y que también son amigos al día de hoy Alexandra, Luis Miguel y Felipe gracias por su ayuda en los experimentos y gracias por bríndame su amistad.

Y por último y no menos importante quiero agradecerle a mi madre, a mi padrino y mis tíos de Popayán por apoyarme en el estudio de la carrera puesto que sin ellos no hubiera podido estudiar aquí. No sé cómo mas expresar las gracias a todos los que ya he mencionado así que de corazón muchísimas gracias por todo...

P. D. Si eres una de las personas que acaba de encontrar este trabajo y lo estás leyendo también te agradezco, gracias por tomarte el tiempo de leer esta parte que la mayoría toma por alto.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
1. JUSTIFICACIÓN.....	5
2. OBJETIVOS .....	7
2.1 Objetivo general: .....	7
2.2 Objetivos específicos: .....	7
3. MARCO TEÓRICO.....	8
3.1 Ofidismo .....	8
3.2 Envenenamiento ofídico.....	8
3.3 Antivenenos polivalentes o poliespecíficos .....	8
3.4 Antivenenos monovalentes o mono-específicos.....	9
3.5 Suero antiofídico colombiano .....	9
3.6 Inconvenientes con los antivenenos comerciales.....	9
3.7 <i>Bothrops asper</i> .....	10
3.7.1 Veneno de <i>B. asper</i> .....	11
3.8 <i>Clelia equatoriana</i> .....	12
3.9 Moléculas antiveneno encontradas en serpientes.....	14
4. ANTECEDENTES .....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
5.1 Muestras de sangre.....	22
5.2 Veneno.....	22
5.3 El Antiveneno .....	23
5.4 Pruebas de Neutralización: .....	23
5.4.1 Neutralización del efecto hemorrágico .....	23
5.4.2 Neutralización del efecto miotóxico .....	24
5.4.3 Neutralización de la actividad edematizante .....	25
5.4.4 Neutralización del efecto coagulante.....	25
5.4.5 Neutralización de la actividad desfibrinante .....	26
5.5 Diseño Experimental .....	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28

6.1 Neutralización del efecto hemorrágico .....	28
6.2 Neutralización del efecto mitotóxico .....	31
6.3 Neutralización de la actividad edematizante .....	33
6.4 Neutralización del efecto coagulante.....	36
6.5 Neutralización de la actividad desfibrinante .....	40
6.6 Comparación entre los sueros.....	42
7. CONCLUSIONES.....	44
8. RECOMENDACIONES .....	45
9. BIBLIOGRAFÍA .....	46

### LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Formación del coágulo por acción del veneno de <i>B. asper</i> después de 2 horas de la inyección de los ratones con las mezclas veneno/antiveneno (suero sanguíneo de <i>C. equatoriana</i> y suero producido por el INS).....	40
Tabla 2. Comparación entre las Dosis efectivas del suero de <i>C. equatoriana</i> y el suero producido por el INS obtenidas para cada una de las pruebas de neutralización de los efectos producidos por el veneno de <i>B. asper</i> .....	41

### LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. A. Distribución geográfica de <i>B. asper</i> , tomado de Campbell & Lamar (2004). B. <i>B. asper</i> del Pacífico caucano (Playa Rica, El Tambo, Cauca, Colombia). Ejemplar Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca.....	11
Figura 2. Adulto de <i>C. equatoriana</i> de Popayán, Cauca (Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca).....	14

Figura 3. Localización de las poblaciones de estudio: <i>B. asper</i> y <i>C. equatoriana</i> . ©Andrés Felipe Liévano Bonilla. ....	22
Figura 4. Neutralización del efecto hemorrágico del veneno de <i>B. asper</i> por el suero sanguíneo de <i>C. equatoriana</i> . ....	28
Figura 5. Neutralización del efecto hemorrágico del veneno de <i>B. asper</i> por el suero del INS.....	29
Figura 6. Neutralización del efecto mitotóxico del veneno <i>B. asper</i> por el suero sanguíneo de <i>C. equatoriana</i> . ....	31
Figura 7. Neutralización del efecto mitotóxico del veneno <i>B. asper</i> por el suero del INS. ....	32
Figura 8. Neutralización del efecto edemático producido por el veneno <i>B. asper</i> por parte del suero sanguíneo de <i>C. equatoriana</i> . ....	34
Figura 9. Necrosis producida por el veneno de <i>B. asper</i> durante la determinación de DE <sub>50</sub> edemática: A. Control positivo (Veneno) y neutralización de los efectos con suero de <i>C. equatoriana</i> con diferentes razones B. 250; C. 500; D. 1000.....	34
Figura 10. Neutralización del efecto edemático producido por veneno <i>B. asper</i> por parte del suero del INS.....	35
Figura 11. Neutralización del efecto coagulante del veneno <i>B. asper</i> con el suero <i>C. equatoriana</i> de la cuenca del río Cauca. ....	37
Figura 12. Neutralización del efecto coagulante del veneno <i>B. asper</i> con el suero de <i>C. equatoriana</i> de la llanura pacífica. ....	37
Figura 13. Neutralización del efecto coagulante del veneno <i>B. asper</i> por el suero de INS .....	38
Figura 14. Comparación de la neutralización de los diferentes efectos ocasionados por el veneno de <i>B. asper</i> por parte del suero sanguíneo de <i>C. equatoriana</i> y del suero producido por el INS. <b>A.</b> representa el efecto hemorrágico. <b>B.</b> Efecto edematizante. <b>C.</b> Efecto Coagulante.....	42

## RESUMEN

Al igual que en muchos países de las regiones tropicales, en Colombia, el ofidismo ha sido considerado un problema de salud pública, que afecta principalmente a los habitantes de las zonas rurales. Entre las diferentes especies relacionadas con el accidente ofídico, *Bothrops asper* es la causante del 90% de las víctimas en todo el país; el envenenamiento por esta especie se caracteriza por generar cuadros clínicos locales y sistémicos, con efectos hemolíticos, mionecróticos y coagulantes. Aunque existen antivenenos polivalentes contra el veneno de *B. asper*, se presentan algunas deficiencias en cuanto a su capacidad para neutralizar los efectos sistémicos y esencialmente locales ocasionados por el veneno. Es por eso, que determinar el potencial neutralizante del suero sanguíneo de serpientes no venenosas y de mamíferos contra los componentes de los venenos, ha sido importante para la identificación de moléculas capaces de inhibir los principales efectos fisiopatológicos desencadenados por el veneno, ya que podrían ser potencialmente usadas en el diseño y producción de sueros antiofídicos. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el potencial neutralizante del suero sanguíneo de *Clelia equatoriana* frente a diferentes actividades biológicas (hemorragia, miotoxicidad, edema y actividad desfibrinante) generadas por el veneno de *B. asper* de la población del Pacífico del departamento del Cauca. Como parámetro de comparación se empleó el suero comercial polivalente del Instituto Nacional de Salud producido en Colombia. Todos los ensayos fueron realizados con ratones *Mus musculus* de cepa ICR con excepción de los ensayos de neutralización de la actividad coagulante, para la cual se realizó una prueba *in vitro* con sangre humana. La DE<sub>50</sub> del suero sanguíneo de *C. equatoriana* para el efecto hemorrágico fue 372 µl antiveneno/ mg veneno, para la actividad edematizante 663 µl antiveneno/ mg veneno; para el efecto coagulante 1270 µl antiveneno/ mg veneno; y para el efecto desfibrinante la DE correspondió a 1000 µl antiveneno/ mg veneno; no se encontró neutralización del efecto miotóxico en ninguna de las dosis experimentales suministradas. Las DE<sub>50</sub> del suero del INS fueron para el efecto hemorrágico 183 µl antiveneno/ mg veneno; para el efecto

coagulante 126  $\mu$ l antiveneno/ mg veneno; y para el efecto desfibrinante la DE correspondió a 250  $\mu$ l antiveneno/ mg veneno; los efectos edemáticos y miotóxicos no fueron neutralizados por el suero comercial. Los resultados anteriores muestran la efectividad del suero sanguíneo de *C. equatoriana* en la neutralización de los efectos sistémicos y la dificultad para actuar contra el efecto miotóxico. A pesar de que los resultados muestran que el suero de *C. equatoriana* tiene la capacidad de neutralizar las actividades biológicas, el suero comercial del INS neutralizó con mayor eficacia los efectos sistémicos (coagulante y desfibrinante) así como también el efecto hemorrágico local. Se resalta la neutralización del efecto edematizante por el suero sanguíneo de *C. equatoriana*, efecto que no logró ser neutralizado por el suero comercial.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia los accidentes ofídicos se consideran un problema de salud pública. En el año 2016, se reportaron más de cuatro mil casos en el país (SIVIGILA, 2016), de los cuales el 90% fueron causados por la familia Viperidae y *B. asper* fue la especie responsable de hasta el 70% de los casos (Otero-Patiño *et al.*, 2007). El envenenamiento por esta especie muestra un cuadro clínico con efectos locales como dolor, edema, equimosis, flictenas, hemorragia, linfadenitis regional, parestesias, hipotermia, necrosis tisular, abscesos y mionecrosis, y efectos sistémicos que incluyen shock mixto, microtrombosis masiva capilar pulmonar y/o mesentérica, falla orgánica multisistémica, síndrome compartimental y necrosis; estos efectos ocasionan graves secuelas en la salud de los pacientes, con implicaciones importantes a nivel social y económico (Ayerbe-González, 2009).

A pesar de que existen antivenenos producidos en Centro y Sur América que neutralizan los efectos sistémicos generados por el veneno de *B. asper*, su eficacia neutralizando efectos locales como la miotoxicidad es baja; lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas en la producción de antivenenos (Gutiérrez *et al.*, 1998, 1985a). Por ejemplo, se conoce que el suero sanguíneo de algunos mamíferos como las zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) (Perales *et al.*, 1986) y de colúbridos como *Clelia clelia* (Cerdas & Lomonte, 1982; Lomonte *et al.*, 1982; Lomonte *et al.*, 1990), tienen la capacidad de neutralizar, de forma natural, los efectos tanto locales como sistémicos producidos durante el envenenamiento, por lo que diferentes investigaciones se han dirigido a la búsqueda de moléculas de interés en estos sueros para mejorar los tratamientos actuales. *Clelia clelia*, es una serpiente ofiófaga con una importante resistencia al veneno de muchas serpientes, entre ellas *B. asper*; lo que sugiere la presencia de factores con efecto neutralizante sobre diferentes acciones tóxicas como hemorragia, mionecrosis y edema (Cerdas & Lomonte, 1982; Lomonte *et al.*, 1982; Lomonte *et al.*, 1990), por lo que se convierte en un género interesante desde el punto de vista farmacológico.

La especie de *Clelia* con distribución en el departamento del Cauca es *C. equatoriana*. Por lo tanto, teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el presente trabajo tuvo como propósito determinar la capacidad neutralizante del suero sanguíneo de *C. equatoriana* frente a efectos locales (hemorragia, mionecrosis y edema) y sistémicos (coagulante y desfibrinante) causados por el veneno de *B. asper* del pacífico caucano en comparación con la neutralización producida por el suero antiofídico elaborado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).

## 1. JUSTIFICACIÓN

Debido a la diversidad de ecosistemas y la singular geografía del país, las serpientes se distribuyen en toda Colombia desde los 0 hasta los 3500 metros sobre el nivel del mar (Lynch, 2012); sin embargo la mayoría de los accidentes de importancia clínica se presentan por debajo de los 1300 msnm. Colombia alberga alrededor de 272 especies, 49 de las cuales son venenosas para el hombre y pertenecen a tres familias: Viperidae, Elapidae y Colubridae (Walteros & Paredes, 2014). En el departamento del Cauca se encuentran 79 especies de serpientes, de las cuales 30 son venenosas, y de éstas, aproximadamente el 57%, hacen parte de la familia Viperidae (Ayerbe-González, 2009).

En Colombia, el ofidismo ha sido un importante problema de salud pública, que afecta principalmente a la zona rural del país; sin embargo, tan solo hasta el año 2004 se incluyó como una enfermedad desatendida de notificación obligatoria (SIVIGILA, 2016). De acuerdo con el SIVIGILA, en el año 2016 se reportaron 4636 casos de accidentes ofídicos en todo el país, de los cuales, se estima que 215 ocurrieron en el departamento del Cauca (SIVIGILA, 2016). Entre el 70% y 90% de estos casos fueron causados por *B. asper*, por lo que esta especie es considerada de gran relevancia clínica en Colombia (Otero-Patiño *et al.*, 2007).

El envenenamiento ocasionado por *B. asper* muestra un complejo cuadro clínico que incluye efectos locales como dolor, edema, equimosis, flictenas, hemorragia, linfadenitis regional, parestesias, hipotermia, necrosis tisular, abscesos y mionecrosis; y efectos sistémicos como shock mixto, microtrombosis masiva capilar pulmonar y/o mesentérica, falla orgánica multisistémica, síndrome compartimental y necrosis (Ayerbe-González, 2009). Este cuadro clínico puede variar dependiendo de la población de *B. asper* que haya ocasionado el envenenamiento. En el departamento del Cauca existen 3 poblaciones de la especie (Costa Pacífica, Valle del río Cauca y Valle del río Patía) (Folleco-Fernández, 2010; Mora-Obando *et al.*, 2014b); la población del Valle del río Patía es la más hemorrágica y letal, la del Pacífico se caracteriza por ser miotóxica y

tiene un mayor efecto en la coagulación que la del Patía y la población del Valle del río Cauca es la más coagulante (Muñoz-Gómez *et al.*, 2016); estas diferencias se explican por la variación en los componentes del veneno y podrían reflejar un proceso de divergencia al suroccidente colombiano como resultado de los procesos orogénicos de la Cordillera de los Andes (Mora-Obando *et al.*, 2014b).

La seroterapia es el único tratamiento científicamente validado para el envenenamiento ocasionado por mordeduras de serpiente (WHO, 2010); no obstante, aunque tiene un importante efecto neutralizante, no es completamente efectivo en la inhibición de la mionecrosis y la hemorragia (Gutiérrez *et al.*, 2010). Es por ello, que ha crecido el interés por investigar la inmunidad innata de algunas especies, la cual les confiere la capacidad de neutralizar los efectos tóxicos de los componentes del veneno (Duque *et al.*, 2007). Por ejemplo, estudios realizados con suero sanguíneo de *C. clelia* han demostrado la presencia de factores que inhiben alteraciones locales importantes causadas por el veneno de *B. asper* de Costa Rica (Lomonte *et al.*, 1990); sin embargo no se ha explorado el potencial neutralizante de este suero contra los efectos sistémicos del envenenamiento, ni tampoco existe ningún estudio en Colombia sobre el potencial neutralizante del suero de especies de *Clelia* distribuidas en el país. Esta investigación se convertirá en línea base para estudios posteriores sobre moléculas con poder neutralizante contra el veneno de *B. asper*, especie de mayor importancia clínica en el departamento del Cauca.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

- ✓ Determinar el potencial neutralizante del suero sanguíneo de *C. equatoriana* contra el veneno de *B. asper* en un modelo experimental en comparación con el suero comercial fabricado por el Instituto Nacional de Salud (INS).

### 2.2 Objetivos específicos:

- Identificar el efecto neutralizante del suero sanguíneo de *C. equatoriana* contra el veneno de *B. asper*.
- Comparar el efecto neutralizante del suero sanguíneo de *C. equatoriana* frente al antiveneno comercial producido por el INS.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Ofidismo**

También definido como accidente ofídico, es el evento desencadenado por las mordeduras de las serpientes ya sean venenosas o no, con inoculación de veneno o sin él (Ayerbe-González, 2009).

#### **3.2 Envenenamiento ofídico**

Hace referencia a los signos y síntomas producidos por la inoculación de veneno por parte de una serpiente venenosa (Ayerbe-González, 2009).

#### **3.3 Antivenenos polivalentes o poliespecíficos**

La producción de los antivenenos se da a partir de caballos, entre otros animales, a los cuales se les inyectan cantidades de veneno en dosis subletales de forma repetida, hasta que desarrollan una elevada inmunidad (hiperinmunización); posteriormente, se extrae sangre para separar el suero, que contiene las inmunoglobulinas específicas para la detección de antígenos derivados del contenido proteico del veneno, éstas son purificadas y liofilizadas y son la base de los antivenenos comerciales. Los antivenenos no se utilizan para inmunizar sino para neutralizar las toxinas contenidas en el veneno. Los antivenenos polivalentes contienen inmunoglobulinas capaces de reconocer y neutralizar componentes del veneno procedentes de diferentes géneros de la misma familia, también pueden presentar reactividad cruzada: neutralizar venenos de especies diferentes a las que fueron usadas para la hiperinmunización de los equinos. Este tipo de sueros han sido producidos para vipéridos o elápidos (Gutiérrez *et al.*, 2012; WHO, 2010).

### **3.4 Antivenenos monovalentes o monoespecíficos**

Los antivenenos monovalentes son producidos igualmente; sin embargo son más específicos, ya que contienen inmunoglobulinas capaces de neutralizar los componentes del veneno de la especie de serpiente con la cual fueron hiperinmunizados los equinos. Estos antivenenos también suelen ser efectivos en envenenamientos producidos por especies hermanas; además la capacidad neutralizante en cuanto al veneno de la especie es mayor que en los polivalentes (Gutiérrez *et al.*, 2012; WHO, 2010).

### **3.5 Suero antiofídico colombiano**

Los sueros antiofídicos producidos y usados en Colombia son fabricados por el INS y el laboratorio ProBiol, aunque también se importa suero antiofídico fabricado por el instituto Bioclon de México. El INS produce suero antiofídico polivalente anticrotálico/antibotrópico a partir del veneno de las especies *Bothrops atrox* y *Crotalus durissus*, pero no contiene fracción antilachesica. El suero antiofídico polivalente anticrotálico/antibotrópico producido por el instituto Bioclon y el laboratorio ProBiol, a diferencia del fabricado por INS contiene fracciones del veneno de *C. durissus*, *B. atrox*, *B. asper* y *Lachesis muta*. Estos tres laboratorios producen también suero antiofídico anticoral (Instituto Nacional de Salud, 2016; ProBiol, 2016; Bioclon, 2016).

### **3.6 Inconvenientes con los antivenenos comerciales**

Existen diferentes investigaciones que evalúan la capacidad neutralizante de los sueros producidos actualmente. Por ejemplo, se probó la eficiencia de los antivenenos comerciales en la inhibición de los efectos ocasionados por el veneno de *B. asper* de Costa Rica; aunque se encontró que presentan potencial neutralizante, la neutralización no es completa hacia moléculas que desencadenan efectos locales severos (Gutierrez *et al.*, 1981). En Colombia se comprobó que los sueros antiofídicos poseen reacciones alérgicas (Otero-Patiño *et al.*, 1998), lo cual

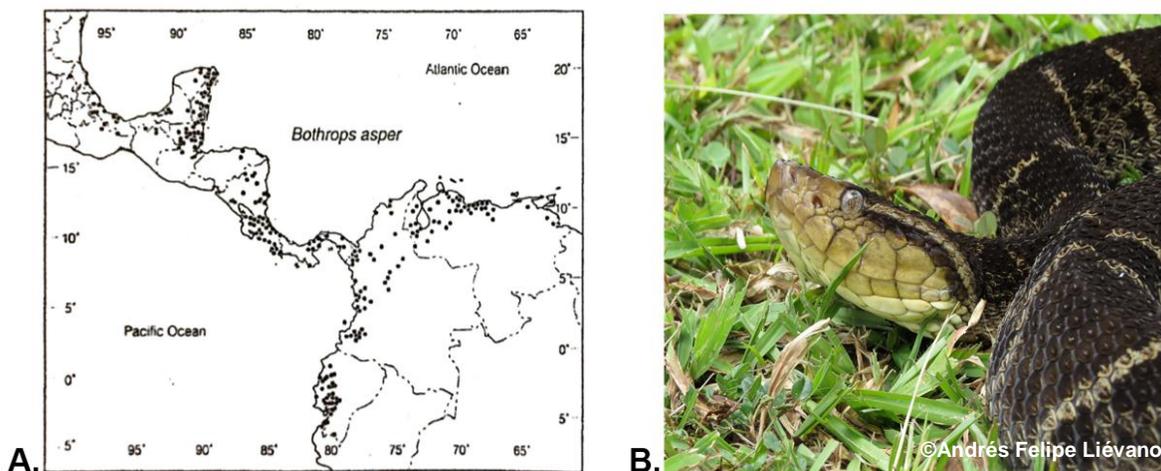
podría solucionarse buscando alternativas, como las investigaciones en moléculas naturales en animales y plantas.

### **3.7 *Bothrops asper***

Especie de serpiente conocida en algunos lugares como terciopelo, cuatronarices, equis, entre otros. Es una especie perteneciente a la familia Viperidae y subfamilia Crotalinae; como todos los vipéridos se caracteriza por poseer una cabeza lanceolada, escamas quilladas, y una dentición solenoglifa conectada a una glándula de veneno que presenta músculos especializados que le permiten inyectar el veneno de forma voluntaria. El nombre común equis se debe al patrón de triángulos que presenta a cada lado de su cuerpo que desde una vista dorsal se asemejan a una equis (Campbell & Lamar, 2004).

El dorso de la cabeza de esta especie es por lo general más oscuro que el color dorsal del resto de su cuerpo, algunos individuos presentan un color marrón oscuro irregular o marca negra en las áreas interocular y parietal, además de una barra oscura delante de los supraoculares. Su lepidosis, aunque es variable, presenta entre 1 o 2 escamas en la área interoculolabial y una sola escama loreal, generalmente tiene entre 5-11 (usualmente 6-9) escamas quilladas en el área intersupraocular; 7-9 (usualmente 7) escamas supralabiales, la segunda escama fusionada con la escama prelacunal; 8-12 (usualmente 10 ó 11) escamas infralabiales; 23-33 (usualmente 25-29) filas de escamas en la escala dorsal del cuerpo medio; 161-216 escamas ventrales en machos y 187- 240 escamas en hembras (rango de escamas ventrales en ambos sexos usualmente entre 185 y 220); 53-81 escamas subcaudales divididas en machos y 46-73 en hembras (el rango para subcaudales en ambos sexos usualmente es entre 56 a 70 escamas) (Figura 1) (Campbell and Lamar, 2004; Sasa *et al.*, 2009).

Los machos llegan a medir entre 140-180 cm, mientras que las hembras pueden alcanzar los 250 cm. Esta especie presenta una amplia distribución, desde el este del Atlántico de México y América Central, hasta parte del norte de Sur América, en Colombia, Ecuador y Venezuela. En Colombia se distribuye hacia el Pacífico, en el flanco occidental de la cordillera occidental, entre la cordillera central y occidental, así como también en el flanco oriental de la cordillera central y el flanco occidental de la cordillera oriental (Figura 1). *B. asper* es una especie principalmente de tierras bajas, ya que habita entre los 0 y 1200-1300 m.s.n.m; en Colombia se ha encontrado por debajo de los 2650 m.s.n.m (Campbell & Lamar, 2004; Sasa *et al.*, 2009).



**Figura 1. A.** Distribución geográfica de *B. asper*, tomado de Campbell & Lamar (2004). **B.** *B. asper* del Pacífico caucano (Playa Rica, El Tambo, Cauca, Colombia). Ejemplar Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca.

### 3.7.1 Veneno de *B. asper*

Este veneno está constituido principalmente por un conjunto de varias proteínas, las cuales en su mayoría presentan actividad enzimática. Se han aislado más o menos 8 familias de proteínas, como metaloproteinasas (SVMPs) (41-44%), fosfolipasas  $A_2$  (PLA<sub>2s</sub>) (29-45%), serina proteasas (SP) (4-18%), L-amino

oxidasas (LAAO) (5-9%), desintegrinas (DIS) (1-2%), similares a lectinas tipo C (0.5%), proteína secretora rica en cisteína (CRISP) (0.1%) y fragmentos DC (<0.1%) (Alape-Girón *et al.*, 2008). Este veneno contiene alrededor de 140 proteínas que producen diferentes alteraciones locales y sistémicas durante el envenenamiento. Familias como las metaloproteinasas son responsables de los efectos hemorrágicos (locales y sistémicos), edema y efectos procoagulantes, las fosfolipasas A<sub>2</sub> por su parte, generan efectos mionecróticos y también contribuyen al edema, y las serina proteasas están relacionadas con efectos procoagulantes *in vitro* (Aragón & Gubenšek, 1981; Alape-Girón *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2012).

La composición y abundancia de los componentes del veneno puede variar entre poblaciones de esta especie, e incluso a nivel ontogénico, por ejemplo, en poblaciones de *B. asper* de Costa Rica el veneno de la población de la vertiente Pacífica tiende a ser más mionecrótico debido a una mayor concentración de fosfolipasas A<sub>2</sub>, en comparación con el veneno de la población de la vertiente Caribe que por su concentración de metaloproteinasas tiende a ser más hemorrágico (Aragón & Gubenšek, 1981; Alape-Girón *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2012). En el Cauca colombiano también se han encontrado importantes variaciones entre los componentes del veneno de las poblaciones del Pacífico (*B. asper* sensu stricto) y del Valle del río Patía (*Bothrops ayerbeii* de acuerdo con Folleco-Fernández, 2010); sin embargo la población del Pacífico tiene un perfil similar a la población de *B. asper* de Costa Rica (Mora-Obando *et al.*, 2014).

### **3.8 *Clelia equatoriana***

Esta especie hace parte de la familia Colubridae y la subfamilia Dipsadinae; el género presenta seis especies, con la disposición básica de escudos de cabeza ampliados; nasal completamente dividido; una sola escama preocular; generalmente una sola escama loreal y en ocasiones ausente; una pupila verticalmente elíptica; dos pares de escamas o escudos en la barbilla; sus escamas dorsales son lisas con dos fosas apicales y fosetas termorreceptoras ausentes, 17 a 19 escamas de filas mediodorsales; la hilera de escamas

vertebrales generalmente no es alargada; una escama anal usualmente sola; escamas subcaudales divididas o con algunos escudos o escamas no divididas; dientes maxilares subiguales, 10 a 15 más 2 colmillos ranurados (dentición opistoglifa) moderadamente ampliados, separados de dientes anteriores por un diastema; presenta una glándula de Duvernoy; dientes mandibulares anteriores no marcadamente mayores que los posteriores; no hay hipofafísis en las vértebras dorsales posteriores (Zaher, 1996).

La coloración en juveniles es única, las superficies dorsales del cuerpo y la cola son rojas con una única banda negra nugal separada por una coloración blanca o crema hacia la mitad de la cabeza; el extremo de su cabeza es negro. Los adultos son de color uniforme negro azulado brillante con un vientre esencialmente sin marcas. El género *Clelia* se distribuye desde las tierras bajas tropicales de las costas Atlántica y Pacífica de México, atraviesa las tierras altas de América Central pasando por Panamá, hasta Suramérica en Colombia, la vertiente pacífica del Ecuador y el sur de Antillas y se dirige por el sureste de los Andes hacia el centro de Argentina (Zaher, 1996; Savage, 2002).

Las especies de este género son muy similares entre sí; sin embargo *C. equatoriana* presenta un tamaño entre 117,3 – 146,2 cm para hembras y entre 111,3 – 142,2 cm para machos. Los adultos de *C. equatoriana* tienen un dorso carbón brillante y escamas lisas dorsales, dispuestas en hileras al medio del cuerpo de 17 escamas (Figura 2). Se distribuyen a lo largo de América Central hasta el noroeste de América del sur, es decir, desde el noreste de Costa Rica hasta Colombia y Ecuador amazónico; habitan entre los 800 y 2150 m.s.n.m (Zaher, 1996).

Este género posee capacidad de inmunidad innata frente a diferentes tipos de venenos de serpientes, producto de la evolución debido a su hábito alimenticio ofiófago, y se caracteriza por presentar toxinas peligrosas para las serpientes,

pero con efectos menores en el ser humano (Leite Pinto *et al.*, 1991; Dos Santos-Costa *et al.*, 2000; Rojas-Morales, 2013).



**Figura 2.** Adulto de *C. equatoriana* de Popayán, Cauca (Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca).

### **3.9 Moléculas antiveneno encontradas en serpientes**

En 1969 Clark y Vortis supusieron que la albumina contenida en el suero sanguíneo de la serpiente *C. adamanteus* contenía propiedades protectoras frente a su propio veneno (Clark & Vortis, 1969). Más adelante, en 1976 por medio de inmunodifusión en gel, se demostró que los sueros de *Crotalus atrox* y *C. adamanteus* poseían actividad neutralizante debida a una proteína distinta a la albúmina presente en el plasma o alguna molécula unida a esta (Straight *et al.*, 1976).

Debido a que los efectos hemorrágicos y miotóxicos son los efectos más frecuentes y graves del envenenamiento ocasionado por la mayoría de vipéridos, ha crecido el interés por investigar su inhibición. Por ejemplo, a partir del suero de la serpiente venenosa *Protobothrops flavoviridis*, se encontró una fracción capaz de inhibir los efectos tóxicos y hemorrágicos del veneno (Omari-satoh *et al.*, 1972).

El análisis de la capacidad neutralizante de los factores aislados del suero de algunas especies de Vipéridos y Elápidos, permitió concluir que mecanismos humorales y no humorales están involucrados en la resistencia a la toxicidad del veneno (Ovadia & Kochva, 1977).

De igual manera, del suero de *Vipera palaestinae* se aislaron fracciones anti-neurotóxica y anti-hemorrágica, efectos característicos del envenenamiento por esta especie (Ovadia *et al.*, 1975). Posteriormente, se profundizó sobre el conocimiento de los factores anti-hemorrágicos de *V. palaestinae* y se encontró que correspondía a una proteína termoestable (Ovadia *et al.*, 1977). Un año después, se amplió el estudio y se encontró que el factor anti-hemorrágico de *V. palaestinae* efectivamente inhibía todos los efectos anti-hemorrágicos de su veneno y de dos vipéridos más: *Echis coloratus* y *Cerastes cerastes*. También se concluyó que este componente proteico tiene actividad de caseinasa, es digerible por tripsina, es estable en temperaturas altas y pH de 6.0 a 9.5, tiene un punto isoeléctrico de 4.7 y un peso molecular de 80kDa, además no formó líneas de precipitación en las pruebas de inmunodifusión, por lo que se concluyó que este factor no era una inmunoglobulina sino una fracción tipo albúmina o  $\alpha$ -globulina. (Ovadia, 1978).

Weissenberg *et al.* (1991) purificaron los factores anti-hemorrágicos de *C. atrox*, los cuales fueron capaces de inhibir los efectos hemorrágicos y proteolíticos causados por su propio veneno. Estos factores protectores resultaron ser glicoproteínas ácidas, estables a temperaturas de 85°C y pH entre 1,3 y 11,5 durante 30 minutos y con masas moleculares entre 65 y 80 kDa (Weissenberg *et al.*, 1991).

Otros estudios sobre factores anti-hemorrágicos de vipéridos como *Crotalus*, *Vipera* y *Protobothrops* dieron resultados similares a los confirmados para *Vipera* y *Crotalus* (Pérez & Sánchez, 1999), y permitieron concluir que estos factores son

superficialmente similares a los factores anti-hemorrágicos extraídos de algunos mamíferos.

Por otra parte, se han evaluado inhibidores de metaloproteinasas, denominados SVMPIs, cuyo blanco específico está asociado con los efectos hemorrágicos, locales y sistémicos, desencadenados durante el envenenamiento, entre algunos de estos inhibidores están: BaSAH de *B. asper* (Borkow *et al.*, 1995), la BJ46a de *Bothrops jararaca* (Tanizaki *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 2001), la HSF de *P. flavoviridis* (Yamakawa & Omori-Satoh, 1992), la TMI perteneciente a *Protobothrops mucrosquamatus* (Huang *et al.*, 1999), la NtAH de *Natrix tessellata* (Borkow *et al.*, 1994), entre otras moléculas del veneno de *A. piscivorus* y *V. palestinae* (Ovadia, 1978; Perales *et al.*, 2005; Weinstein *et al.*, 1990).

Todos los SVMPIs aislados del plasma o del suero de las serpientes son de la superfamilia de cistatina / grupo fetuina (Perales *et al.*, 2005). Los inhibidores más caracterizados de esta superfamilia son HSF de *P. flavoviridis* (Yamakawa & Omori-Satoh, 1992) y BJ46a de *B. jararaca* (Valente *et al.*, 2001). Los residuos aminoacídicos de HSF y BJ46a localizados en las posiciones 323 y 322, tienen tres y cuatro sitios de N-glicosilación respectivamente, además comparten el 85% de identidad de secuencia y tienen una secuencia RGD en la porción N-terminal cuya función en la inhibición de la hemorragia no está completamente dilucidada. La secuencia de aminoácidos de HSF se determinó mediante degradación de Edman, mientras que para BJ46a se obtuvo a partir de ADNc de longitud completa y fue confirmada por secuencia parcial de aminoácidos por degradación de Edman (81%) (Yamakawa & Omori-Satoh, 1992; Valente *et al.*, 2001; Perales *et al.*, 2005). BJ46a es una proteína glicosilada con un contenido de carbohidratos del 17%. Tanto HSF como BJ46a tienen el mismo patrón de cisteínas observado para el grupo fetuina, excepto que HSF tiene una cisteína más en la posición 44, sustituida por una valina en BJ46a (Yamakawa & Omori-Satoh, 1992; Valente *et al.*, 2001; Perales *et al.*, 2005).

A pesar de estar clasificado en la superfamilia cistatina, las fetuinas, incluyendo HSF y BJ46a, es probable que no inhiban cisteína proteinasas, esto podría deberse al hecho de que la secuencia de consenso (QXVXQ) del sitio activo de cistatina, ha sido ampliamente modificada en estas moléculas. El HSF no inhibió la papaina y la catepsina B, pero inhibió varias metaloproteinasas en el veneno de Habu (*P. flavoviridis*) (Yamakawa & Omori-Satoh, 1992; Perales *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de los SVMPIs comenzó a ser aclarado por estudios realizados con BJ46a, un inhibidor efectivo de la actividad hemorrágica del veneno completo de *B. jararaca*, así como de las SVMPIs atrolisina C (PI) de *C. atrox* y jararagina (PIII) de *B. jararaca*. Se demostró que el mecanismo implica la formación de complejos no covalentes estables con estas metaloproteinasas. Esta interacción parece ocurrir en el dominio metaloproteinasas, ya que, la atrolisina C y la jararagina con dominio metaloproteinasas son inhibidas en un 100 y 97% respectivamente, sin embargo la jararagina-C no logró ser inhibida puesto que a pesar de que su secuencia es idéntica a la jararagina carece del dominio metaloproteinasas. Los estudios cuantitativos mostraron que la estequiometría de la inhibición es de un monómero inhibidor frente a dos moléculas de metaloproteinasas; se ha propuesto que el dímero BJ46a se disocia durante la formación del complejo enzima-inhibidor y su monómero tiene dos sitios de unión a las SVMPI (Valente *et al.*, 2001).

En cuanto a los estudios sobre inhibidores de miotoxinas (PLIs) en serpientes, se ha encontrado que son glicoproteínas ácidas oligoméricas, con masas moleculares entre 75 y 180 kDa, formadas por 3 a 6 subunidades de 20 a 50 kDa unidas por enlaces no-covalentes (Perales and Domont, 2002). Estas proteínas aparentemente son producidas en el hígado y se han clasificado en tres grupos: las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; originalmente encontradas en la serpiente China *Gloydius blomhoffii* (Ohkura *et al.*, 1997), y luego en plasma de *B. asper* (Lizano *et al.*, 1997). Se determinó que los PLIs  $\alpha$  son proteínas globulares compuestas de subunidades con pesos de 20 a 25 kDa, 147 aminoácidos y un sitio de N- glicosilación. Forman

estructuras de 3-6 subunidades asociadas no covalentemente con masas reportadas entre 75-120 kDa (Kohji Okumura *et al.*, 2002; Lizano *et al.*, 2003).

La característica típica de los PLIs  $\alpha$  es la presencia de dominios lectina tipo-C (CTLDs) también conocidos como motivos de reconocimiento de carbohidrato (CRDs). Estos dominios comprenden aproximadamente el 67% de cada subunidad, están cerca de la porción N-terminal, y juegan un papel importante en la unión del PLI  $\alpha$  a la PLA<sub>2</sub> (Nobuhisa *et al.*, 1998). Estos PLIs  $\alpha$  son típicos de los vipéridos (Kogaki *et al.*, 1989; Lizano *et al.*, 1997; Lizano *et al.*, 2000; Ohkura *et al.*, 1993; Soares *et al.*, 2003).

En cuanto a los PLIs  $\beta$  se encontró que son proteínas globulares de 160 kDa, compuestas de 3 subunidades de aproximadamente 50 kDa, 308 aminoácidos y 4 sitios de glicosilación por subunidad. Además presentan 9 repeticiones ricas en Leucina (LRRs), cada una de 24 aminoácidos de largo que comprenden el 67% de cada subunidad (Perales & Domont, 2002; Okumura *et al.*, 2002; Lizano *et al.*, 2003) y determinan la especificidad para las PLA<sub>2</sub>-II básicas (Okumura *et al.*, 1999). Son típicas de vipéridos (Okumura *et al.*, 1998), aunque también han sido encontradas en el colúbrido *Elaphe quadrivirgata* (Okumura *et al.*, 2002).

En cuanto a los PLIs  $\gamma$  tienen formas estructurales de tres dedos, constituidos por dos patrones en tándem de residuos de cisteína (Perales & Domont, 2002), uno de los cuales es importante en el acoplamiento de los PLIs a las PLA<sub>2</sub>s que inhiben (Nobuhisa *et al.*, 1998; Thwin *et al.*, 2000). A diferencia de los otros PLIs, no son tan específicos, por lo que actúan (Perales & Domont, 2002; Okumura *et al.*, 2002; Lizano *et al.*, 2003) sobre PLA<sub>2</sub>s I, II y III (Okumura *et al.*, 1999; Lizano *et al.*, 2003). Los PLIs  $\gamma$  han sido encontrados en vipéridos (Fortes-Dias *et al.*, 1994; Lizano *et al.*, 1997; Nobuhisa *et al.*, 1997; Ohkura *et al.*, 1997; Perales *et al.*, 1995), colúbridos (Okumura *et al.*, 1999), elápidos (Hains *et al.*, 2001, 2000; Hains and Broady, 2000; Ohkura *et al.*, 1993), boídos (Thwin *et al.*, 2000) e hidrófinos (Ohkura *et al.*, 1999). Se ha propuesto que los PLIs  $\gamma$  tienen una relación evolutiva

con las neurotoxinas y citotoxinas de la familia de tres de dedos presentes en los venenos de elápidos (3FTxs) (Perales and Domont, 2002). La distribución de estos inhibidores no es especie-específico; sin embargo, los diferentes PLIs aislados hasta ahora tienden a mostrar mayor especificidad de acción contra el tipo de PLA<sub>2</sub>s presentes en los venenos de las especies de donde fueron extraídos (Lizano *et al.*, 2000; Perales and Domont, 2002).

#### 4. ANTECEDENTES

Hace aproximadamente 200 años se demostró la existencia de un fenómeno natural de inmunidad al veneno de serpientes por parte de algunos organismos; estas interesantes propiedades han sido ampliamente estudiadas, tal como se refleja en algunas revisiones bibliográficas (Moussatché & Perales, 1989; Domont *et al.*, 1991; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998; Duque Osorio *et al.*, 2007). Fontana (1781) fue pionero en estudios sobre inmunidad, el primero en mencionar que las víboras de la misma especie tienen inmunidad a su propio veneno; observaciones sustentadas solamente 100 años después (Claude-Bernard, 1787; Dumeríl, 1854; Fayrer, 1874; Mitchell, 1861; Waddell, 1889). De igual manera, se demostró la inmunidad inter-específica natural de las serpientes (Guyon, 1861). Posteriormente, se encontró que algunos animales poseían inmunidad natural a los venenos de algunas serpientes como *Herpestes ichneumon* (Calmette, 1895) y *Erinaceus europaeus* (Phisalix & Bertrand, 1895). Por esa misma época se empezaron a desarrollar los sueros antiofídicos producidos en caballos y se administró la primera dosis a un hombre que había sido mordido por *Naja naja* (cobra), encontrando interesantes resultados en la neutralización de los efectos producidos por el veneno (Calmette, 1895).

A principios del siglo XX, se realizaron las primeras inoculaciones de veneno desecado y disuelto en solución salina en diferentes animales, además se empezó a trabajar con otras especies de animales como invertebrados, peces, batracios y mamíferos (Phisalix, 1922). Los trabajos realizados hasta esa época, con el fin de evaluar si la especie presentaba alguna clase de resistencia, fueron ejecutados de manera cualitativa y empírica, sin tener en cuenta las dosis de veneno administradas. Posteriormente, se empezaron a evaluar cantidades de veneno medidas por unidad de peso del animal (Phisalix, 1922; Kellaway, 1937; Keegan & Andrews, 1942; Swanson, 1946; Kuwajima, 1953).

Estudios realizados con serpientes, demostraron la presencia de un factor del suero responsable de la resistencia de las serpientes a los venenos. Los primeros trabajos realizados en este sentido, muestran que el suero de una serpiente de cascabel y una serpiente no venenosa, *Lampropeltis getula*, inhiben el efecto hemorrágico observado en ratas inyectadas con veneno de *Crotalus adamanteus* (Cascabel), *Agkistrodon piscivorus* y *B. atrox* (Equis) (Rosenfeld & Glass, 1946; Philpot & Smith, 1950). Otros autores establecieron conclusiones similares con otras especies de serpientes y sus venenos (Klauber, 1956; Abalos, 1963; Deoras & Mhasalkar, 1963; Ovadia *et al.*, 1975).

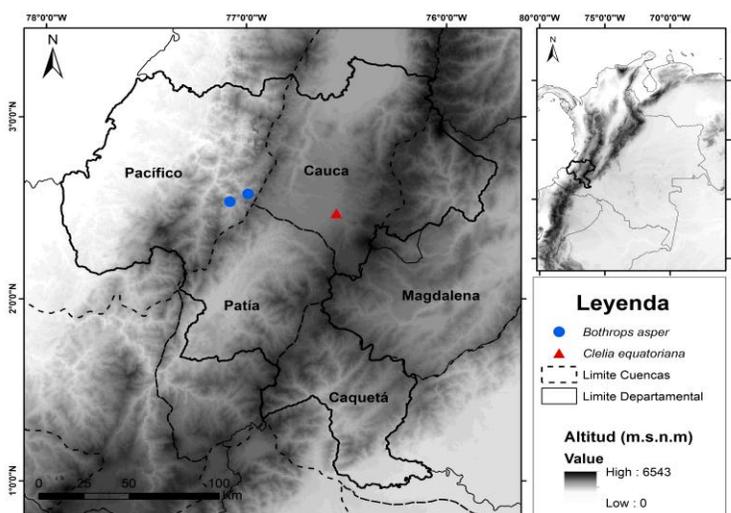
Nuevas investigaciones sobre la capacidad de los sueros de algunas especies de serpientes para neutralizar los síntomas de envenenamiento por serpientes venenosas empezaron a surgir a mediados del siglo XX; debido principalmente al gran avance tecnológico en la bioquímica y en las técnicas de separación proteica, como la cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis, que hicieron posible estudiar los componentes aislados o fracciones de los sueros de serpientes con capacidad neutralizante del veneno propio o de otras serpientes.

Respecto a la serpiente ofiófaga *C. clelia*, se ha observado que presenta inmunidad natural al veneno de algunas especies venenosas de serpientes y se ha confirmado su capacidad ofiófaga, concluyendo que posee resistencia completa al veneno de especies de la familia Viperidae y Elapidae, y frente a venenos de especies exóticas geográficamente hablando, como *Naja kaouthia* y *Naja melanoleuca* (cobras) (Cerdas & Lomonte, 1982). Posteriormente, se encontró que el suero sanguíneo de *C. clelia* posee factores capaces de neutralizar varias actividades tóxicas del veneno de *B. asper*, como la acción hemorrágica, mionecrótica y edematizante; no obstante, estos factores no han sido identificados (Lomonte *et al.*, 1982). Luego se detectaron las mismas propiedades en los neonatos de *C. clelia*, demostrando que dicha capacidad está presente desde su nacimiento (Lomonte *et al.*, 1990).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Muestras de sangre

La sangre se extrajo de un individuo de *C. equatoriana* mantenido en cautiverio en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), colectado en Popayán (Figura 3). Se buscó la vena coccígea ventral ubicada en la cola de la serpiente y con una jeringa de insulina se procedió a extraer la sangre. Debido a que el volumen de la sangre en reptiles varía entre el 5 y 8% del peso corporal y solo puede extraerse el 10% del volumen, se extrajeron valores menores a 1 cc de sangre cada 2 meses, debido a que la serpiente pesaba 200 g. Para la obtención del suero sanguíneo, la sangre colectada se dejó coagular y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm a una temperatura de 18 C° durante 5 minutos.



**Figura 3.** Localización de las poblaciones de estudio: *B. asper* y *C. equatoriana*.  
©Andrés Felipe Liévano Bonilla.

### 5.2 Veneno

El *pool* de veneno se extrajo de 6 individuos *B. asper* de la población del pacífico caucano (Figura 3) mantenidos en cautiverio en el CIBUC. Los individuos fueron inmovilizados manualmente, y posteriormente se les indujo a morder una película

de parafilm® ubicada sobre un embudo de cristal, el cual estaba conectado a un tubo eppendorf®. El veneno obtenido se centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos a 6°C, se extrajo el sobrenadante, se liofilizó y preservó a -40° C.

### **5.3 El Antiveneno**

Se utilizó el suero antiofídico polivalente del Instituto Nacional de Salud, el cual se recibió en donación (lote es 05SAP03).

### **5.4 Pruebas de Neutralización:**

Las pruebas se desarrollaron siguiendo la mayoría de pautas que se indican en el manual de métodos para la “determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos” del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica (2008). Las pruebas de neutralización se realizaron utilizando suero sanguíneo de *C. equatoriana* y suero antiofídico polivalente del INS, previamente incubados con una dosis fija de veneno de *B. asper* perteneciente a la población del Pacífico caucano. Para las pruebas *in vivo*, las mezclas de veneno/antiveneno fueron inyectadas a ratones juveniles *M. musculus* de cepa ICR con un peso entre 18 a 20 g y para la prueba de coagulación (*in vitro*) las mezclas de veneno/antiveneno se dispusieron sobre plasma sanguíneo humano. Las dosis de veneno/antiveneno se mezclaron antes de usarse en las pruebas para una observación más objetiva de la neutralización de los efectos, esto debido a que los efectos locales producidos por el veneno empiezan aparecer en poco tiempo, lo que complicaría una evaluación comparable de la neutralización por parte de los antivenenos. Todos los ensayos, así como los controles fueron realizados por triplicado. (Clodomiro Picado, 2008).

#### **5.4.1 Neutralización del efecto hemorrágico**

Los sueros de *C. equatoriana* y del INS fueron probados contra una dosis reto de 10 dosis hemorrágicas mínimas (DHM), calculada a partir de la dosis mínima hemorrágica (1,45 µg) previamente determinada por Mora-Obando *et al.* (2014).

Las razones de  $\mu\text{L}$  de antiveneno/mg de veneno probadas fueron: 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25; es decir en proporciones de antiveneno: veneno de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1: 16, 1:32. Grupos de 3 ratones fueron inyectados con 0.1 mL vía intradérmica con cada una de las razones. Como control positivo, un grupo de 3 ratones fue inyectado solo con veneno (10 DHMs). Los ratones fueron sacrificados al cabo de 120 minutos, se retiró el área de la piel abdominal del animal, se fotografiaron las lesiones hemorrágicas y se midió el área con el software de análisis de imágenes ImageJ versión 1.49. Posteriormente se realizó una gráfica dosis-respuesta (razón  $\mu\text{L}$  antiveneno/mg veneno en el eje de las abscisas (x) vs. mm de diámetro de la lesión eje de las ordenadas (y)) y se encontró la Dosis Efectiva 50 (dosis que redujo el área hemorrágica a la mitad), tomando como referencia el control sin antiveneno (Gutiérrez *et al.*, 1985).

#### **5.4.2 Neutralización del efecto mitotóxico**

Se prepararon mezclas de veneno/ antiveneno con una cantidad fija de veneno (dosis reto equivalente a 50  $\mu\text{g}$ ) ( Lomonte *et al.* 1982) y una cantidad variable de antiveneno. Se probaron razones de 1000 y 500  $\mu\text{L}$  de antiveneno/mg de veneno. Por cada dosis, se inyectaron grupos de 3 ratones con 0,1 mL; además se incluyó un control positivo con veneno y dos controles negativos, uno con solución salina y otro con antiveneno. Tres horas después de la inoculación de las dosis en el gastrocnemio, los ratones se anestesiaron vía intraperitoneal, con solución de xilacina/ketamina (0,1 ml/20 g) y se extrajo muestras de sangre de la vena cava descendente (aproximadamente 1mL). Posteriormente las muestras de sangre fueron enviadas al laboratorio clínico para la determinación de los niveles totales de la enzima Creatinin quinasa. Para el análisis de los resultados se construyó una gráfica de barras de las razones de veneno/antiveneno empleadas y la cantidad de creatinin quinasa liberada (Gutierrez *et al.*, 1981; Saravia *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2005).

#### 5.4.3 Neutralización de la actividad edematizante

Se prepararon mezclas que contenían una cantidad fija de veneno utilizando una dosis reto de 10  $\mu\text{g}$ . Se probaron las razones de  $\mu\text{L}$  de antiveneno/mg de veneno mencionadas en la prueba de neutralización hemorrágica. Se incluyeron dos controles, un control positivo con veneno y un control negativo con solución salina. Se inyectaron con 50  $\mu\text{L}$  de cada mezcla vía subcutánea en la almohadilla plantar derecha, 1 hora después se midió el incremento del ancho de la pata con un calibrador. Se elaboró una curva dosis-respuesta (razón  $\mu\text{L}$  antiveneno/mg veneno en el eje de las abscisas (x) vs % de edema en el eje de las ordenadas (y)), y se determinó la Dosis Efectiva 50 (razón  $\mu\text{L}$  antiveneno/mg veneno en la que el edema disminuye en un 50% respecto al grupo control) (Gutiérrez *et al.*, 1986; Rojas *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 2005).

#### 5.4.4 Neutralización del efecto coagulante

Además de las razones de antiveneno/veneno previamente probadas, en esta prueba se evaluó una razón de 2000 de  $\mu\text{L}$  de antiveneno/mg de veneno; también se realizó un experimento con suero sanguíneo perteneciente a un individuo de *C. equatoriana* del sector El Cóndor – El Tambo (PNN Munchique) el cual se encuentra más cercano a la población de *B. asper* del *pool* de veneno utilizado en las pruebas. Partiendo de la dosis mínima coagulante en plasma de 0,37 $\mu\text{g}$  (DHMP) previamente determinada (Mora-Obando *et al.*, 2014), se estableció una dosis reto igual a 2 DHMP. Se prepararon diluciones con cantidades variables de antiveneno, iguales a las de la prueba de neutralización hemorrágica, en volumen final de 0,1 mL. Las mezclas de 0,1 mL fueron incubadas a 37°C por 30 minutos y luego añadidas a 0,2 mL de plasma citratado previamente incubado durante 5 minutos a 37°C. Se realizaron 6 repeticiones por dosis y el tiempo de formación del coágulo fue registrado en segundos. Se realizó una curva de dosis-respuesta (razón  $\mu\text{L}$  antiveneno/mg veneno en el eje de las abscisas (x) vs tiempo de coagulación en segundos en el eje de las ordenadas (y)). A partir del tiempo de

coagulación del control sin antiveneno, se calculó la dosis efectiva 50, la cual correspondió a la razón de antiveneno/veneno en la que el tiempo de coagulación es 3 veces la del control sin antiveneno (Gené *et al.*, 1989).

#### **5.4.5 Neutralización de la actividad desfibrinante**

Se prepararon mezclas que contenían una cantidad fija de veneno. Se determinó una dosis reto de 2 dosis mínimas desfibrinantes (DDM) a partir de la previamente determinada (2  $\mu\text{g}$ ) por Mora-Obando *et al.* (2014). Para el experimento se prepararon razones de  $\mu\text{L}$  de antiveneno/mg de veneno entre 31,25 y 1000, como se menciona anteriormente. Se incluyeron dos controles, un control positivo con veneno y un control negativo con solución salina. Los ratones fueron inyectados con 0,2 mL de cada solución por vía intravenosa en la vena caudal; una hora después fueron anestesiados, y mediante punción cardíaca se obtuvo aproximadamente 0,2 mL de sangre. Posteriormente se colocó la sangre en tubos eppendorf y se incubó a temperatura ambiente. Dos horas después se inclinó el tubo con extremo cuidado para la observación del coágulo y se determinó la DE (razón de  $\mu\text{L}$  antiveneno/mg veneno mínima en la que se neutralizó la actividad desfibrinante) (Gené *et al.*, 1989).

#### **5.5 Diseño Experimental**

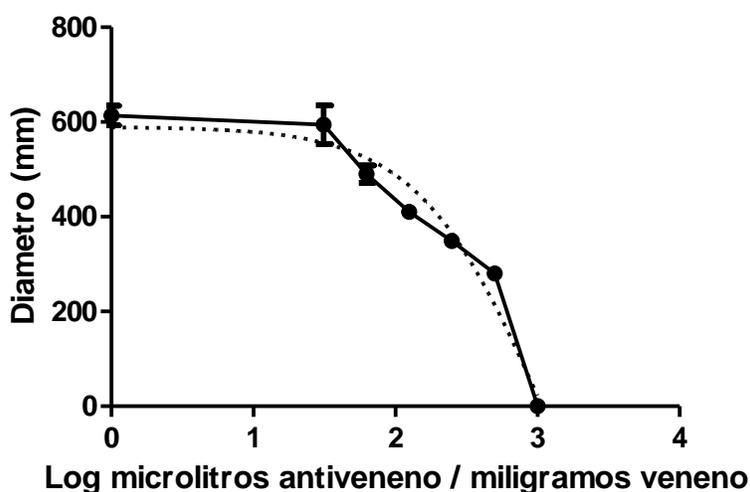
Se trabajó con un grupo control y 2 tratamientos (suero de *C. equatoriana* y suero producido por el INS). Se obtuvo una curva de tendencia de dosis/respuesta con una regresión logarítmica puesto que los datos no son lineales, donde el valor 0 representa el control positivo (veneno). Para la elaboración de las gráficas se utilizó el software GraphPad Prism 5, los datos obtenidos de estas gráficas se utilizaron para encontrar la dosis en la cual se reduce a la mitad el efecto evaluado (Dosis efectiva 50 ( $\text{DE}_{50}$ )).

Para la comparación entre el suero del INS y *C. equatoriana* se realizó un diseño completamente al azar (DCA), donde se trabajó el veneno de *B. asper*, dos tratamientos (suero comercial y suero de *C. equatoriana*) y el control positivo y negativo. Una vez obtenidos los datos se analizaron en cuanto a su ajuste a la curva normal y criterio de homogeneidad de varianza, sí los datos cumplían con estos criterios, fueron tratados con el test paramétrica de ANOVA de una vía, de lo contrario se utilizó el equivalente no paramétrico que es la prueba de Kruskal-Wallis para encontrar la significancia entre los datos, utilizando el software BioEstat versión 5.3. Los gráficos en barras para la comparación se realizaron con el software GraphPad Prism 5.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

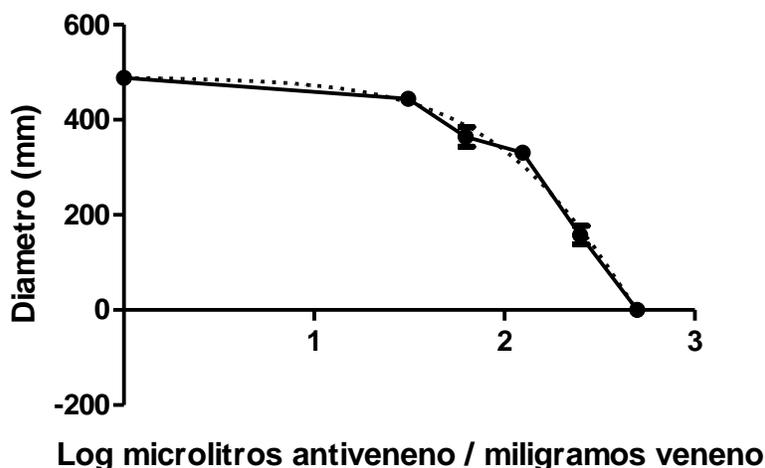
### 6.1 Neutralización del efecto hemorrágico

La figura 4 representa la capacidad neutralizante del suero de *C. equatoriana* frente al efecto hemorrágico ocasionado por el veneno de *B. asper*. Es evidente que en la mayor razón de antiveneno/veneno probada (1000), el suero de *C. equatoriana* logra neutralizar por completo el efecto, por lo que no se forma área hemorrágica.



**Figura 4.** Neutralización del efecto hemorrágico del veneno de *B. asper* por el suero sanguíneo de *C. equatoriana*. La línea punteada representa la regresión logarítmica obtenida para calcular la  $DE_{50}$  ( $R^2 = 0,9395$ ). En el eje de las abscisas, las razones de antiveneno/ veneno fueron transformadas a una escala logarítmica, así: 0= control positivo; 1,494=31,25; 1,796=62,5; 2,096=125; 2,397=250; 2,698=500; 3=1000. El eje de las coordenadas muestra el diámetro  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

La figura 5 representa el poder neutralizante del suero producido por el Instituto Nacional de Salud de Colombia. En comparación con el suero de *C. equatoriana*, este suero es capaz de neutralizar con mayor eficacia el efecto hemorrágico local, ya que con una razón de 500  $\mu$ L de antiveneno/mg de veneno es capaz de disminuir completamente la hemorragia.



**Figura 5.** Neutralización del efecto hemorrágico del veneno de *B. asper* por el suero del INS. La línea punteada representa la regresión logarítmica obtenida para calcular la  $DE_{50}$  ( $R^2 = 0,9767$ ). En el eje de las abscisas, las razones de antiveneno/ veneno fueron transformadas a una escala logarítmica, así: 0= control positivo; 1,494=31,25; 1,796=62,5; 2,096=125; 2,397=250; 2,698=500, este último punto no fue representado gráficamente ya que interfiere con el ajuste de la curva y su respectiva ecuación. El eje de las coordenadas muestra el diámetro  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

Uno de los principales efectos del veneno de *B. asper* es el hemorrágico, el cual es causante de muerte en muchos accidentes ofídicos (Chacón *et al.*, 2015). Esta actividad está dada principalmente por las enzimas metaloproteinasas (SVMPs), las cuales generan este efecto como resultado de la degradación de proteínas de la microvasculatura (Bjarnason & Tu, 1978; Bjarnason & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005), sobre todo en vasos capilares, y son capaces de degradar los principales componentes de la membrana basal de los mismos, tales como colágeno tipo IV, laminina y perlecan (Bjarnason & Fox, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2011).

Las metaloproteinasas están agrupadas en tres clases principales: La clase PI, comprende las que presentan únicamente un dominio metaloproteinasas; las clases PII y PIII también lo presentan; sin embargo, la clase PII tiene un dominio adicional

de desintegrina y la clase PIII además del dominio desintegrina tiene un dominio rico en cisteína (Bjarnason & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005; Fox & Serrano, 2010). A pesar de que se ha aislado y caracterizado varias metaloproteinasas, su mecanismo de acción no ha sido plenamente explicado.

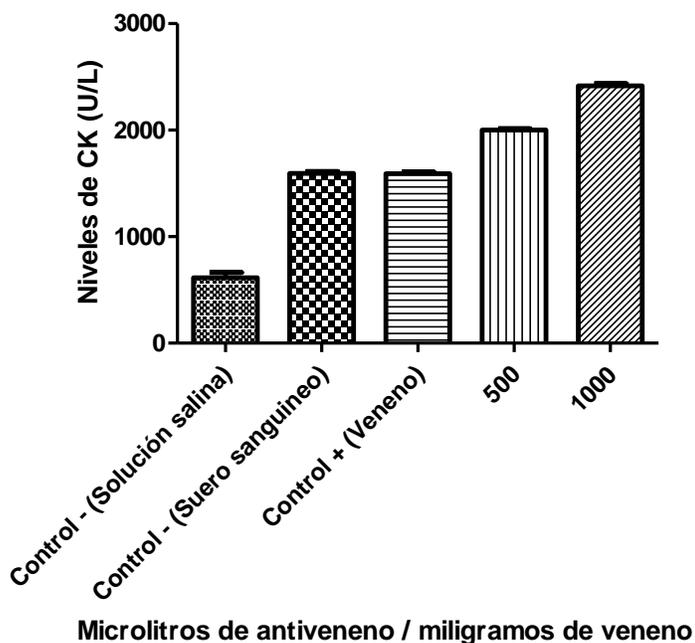
Como se abordó en el apartado de antecedentes, ha sido relevante la búsqueda de moléculas capaces de inhibir el efecto producido por las metaloproteinasas (SMVPIs). No obstante, se desconoce cómo actúan exactamente estas moléculas encontradas en el suero de las serpientes. Algunos estudios han demostrado que los SMVPIs actúan en el dominio metaloproteinasa de las SMVPs e inhiben su actividad enzimática (Perales *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2001; Yamakawa and Omori-Satoh, 1992).

En este sentido, los resultados obtenidos indican posiblemente la existencia de factores que inhiben la actividad de las SMVPs en el suero sanguíneo de *C. equatoriana* debido a que en la razón 1000 (3 Log  $\mu$ L antiveneno/mg veneno) el efecto hemorrágico se inhibió por completo (Figura 4); la naturaleza de estos factores es desconocida, por lo que a futuro será importante caracterizarlos bioquímicamente. El suero del INS presentó una mejor capacidad para neutralizar el efecto hemorrágico, puesto que desde la razón 500 (2.698 Log  $\mu$ L antiveneno/mg veneno) (Figura 5) se disminuyó por completo el efecto producido por las metaloproteinasas, eso explicaría la reducción de la mortalidad de las víctimas de accidentes botrópicos cuando llegan a tiempo para ser tratadas en los centros de salud (Gutierrez *et al.*, 1981; Muñoz-Gómez *et al.*, 2016). Los valores de  $DE_{50}$  encontrados a partir de la ecuación de la regresión logarítmica fueron de 372  $\mu$ l antiveneno/ mg veneno para el suero de *C. equatoriana* y 183  $\mu$ l antiveneno/ mg veneno para el suero producido por el INS, lo que demuestra su capacidad de neutralizar los efectos hemorrágicos ; sin embargo, cabe resaltar que se obtuvo una mejor neutralización con el suero del INS que con el suero sanguíneo de *C. equatoriana*, posiblemente este resultado este dado por diferencias en la concentración de proteínas o factores inhibitorios contenidos en

el suero sanguíneo de *C. equatoriana*, puesto que no están purificados y altamente concentrados como lo están en el suero antiofídico comercial (Tabla 2).

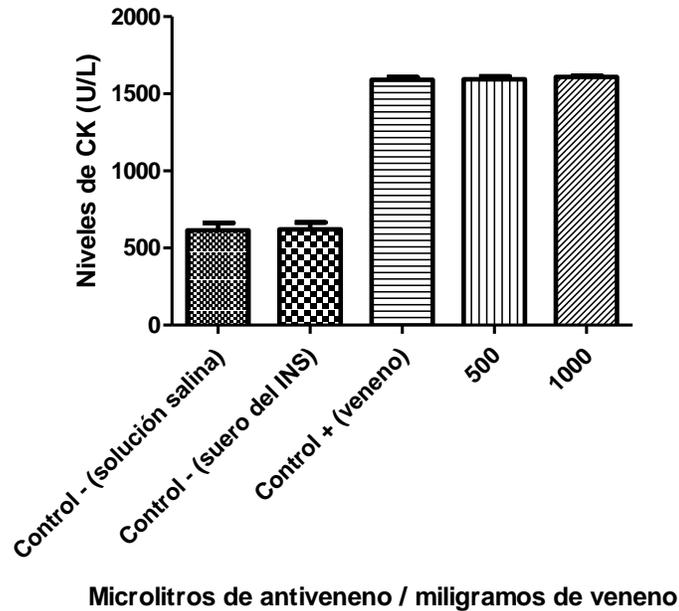
## 6.2 Neutralización del efecto mitotóxico

La actividad mitotóxica no fue neutralizada por el suero de *C. equatoriana*. Por el contrario, se observó un incremento en los niveles de CK en las mayores razones de antiveneno/veneno en comparación con el grupo control, observándose incluso que el control negativo del suero sanguíneo de *C. equatoriana* por sí mismo causa un elevado efecto mitotóxico y alcanza el doble de los niveles de CK respecto al control negativo con solución salina (Figura 6).



**Figura 6.** Neutralización del efecto mitotóxico del veneno *B. asper* por el suero sanguíneo de *C. equatoriana*. En el eje de las coordenadas los niveles de CK representan la media de 3 mediciones  $\pm$  la desviación estándar.

El suero del INS, aunque por sí mismo no causa mitotoxicidad, ya que los niveles de CK fueron similares a los del control negativo con solución salina, no neutraliza la mitotoxicidad inducida por el veneno de *B. asper* en ninguno de los ensayos probados (Figura 7).



**Figura 7.** Neutralización del efecto miotóxico del veneno *B. asper* por el suero del INS. En el eje de las coordenadas los niveles de CK representan la media de 3 mediciones  $\pm$  la desviación estándar.

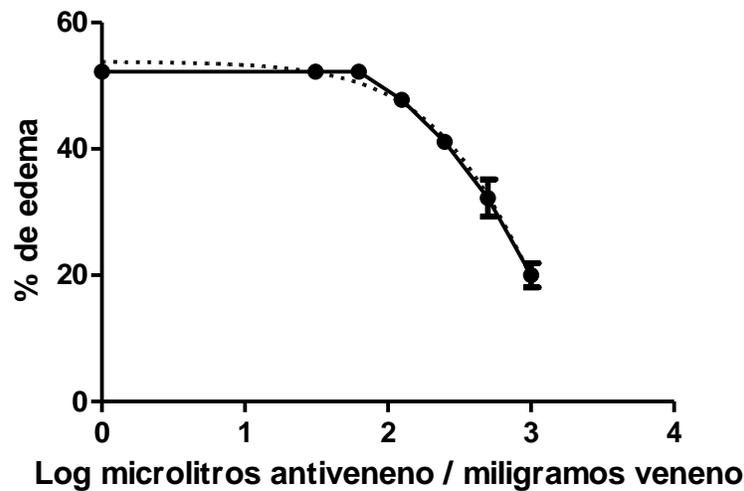
La necrosis de tejidos blandos, principalmente de músculo esquelético (miototoxicidad), es una de las manifestaciones características del envenenamiento local. Se debe esencialmente a una familia de proteínas básicas: fosfolipasas  $A_2$  de los tipos Asp49 y Lys49 las cuales coexisten en el veneno de *B. asper* (Gutiérrez *et al.*, 1984; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Lomonte *et al.*, 2003; Gutiérrez & Ownby, 2003; Gutiérrez & Lomonte, 2003). Las PLA<sub>2</sub>s Asp49, presentan un residuo de aspartato en la posición 49, como es típico de la mayoría de las fosfolipasas  $A_2$  de venenos e inflamatorias en mamíferos. Este residuo participa en la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, alterando la estabilidad de las fibras musculares y desencadenando la miototoxicidad. Por su parte, las PLA<sub>2</sub>s Lys49 presentan una substitución del residuo aspartato por uno de Lisina en la misma posición, por lo que son enzimáticamente inactivas; sin embargo, presentan un sitio altamente catiónico que le confiere una importante actividad miotóxica (Lomonte *et al.*, 1994). Aunque estos subtipos de fosfolipasas tienen mecanismos

de acción diferentes, ambas contribuyen fuertemente con la miotoxicidad e incluso se ha demostrado la existencia de sinergismo *in vivo* entre estas proteínas (Mora-Obando *et al.*, 2014).

Al igual que lo encontrado por Lomonte *et al.*, (1982) en su investigación con *C. clelia*, los valores de CK elevados, reflejan cierta miotoxicidad en los ratones que al parecer es causada por el suero sanguíneo de *C. equatoriana* (Figura 6). Este fenómeno se ha presentado anteriormente en investigaciones que evaluaron el poder neutralizante de distintos sueros de serpientes; aunque no se ha caracterizado el componente responsable de la miotoxicidad, se reporta que estos efectos pueden ser inhibidos con calor, pero como consecuencia generan una reducción de la neutralización (Clark *et al.*, 1969; Deoras and Mhasalkar, 1963; Lomonte *et al.*, 1982). La falta de neutralización por parte del suero del INS (Figura 7) concuerda con estudios donde se ha demostrado que las PLA<sub>2</sub>s presentan un bajo nivel de inmunogenicidad, posiblemente debido a su bajo peso molecular (Kini, 1997).

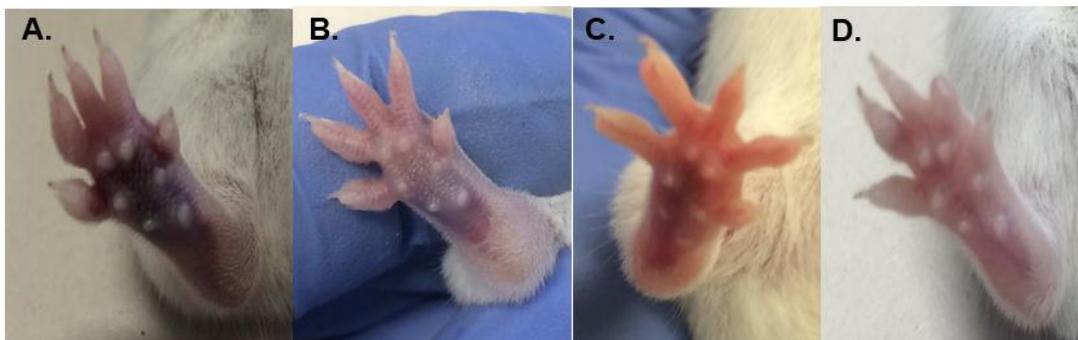
### **6.3 Neutralización de la actividad edematizante**

La figura 8 representa la neutralización del efecto edematizante ocasionado por el veneno por parte del suero de *C. equatoriana*. Aunque es evidente su capacidad de neutralización, la razón máxima de antiveneno/veneno no logra neutralizar este efecto por completo, pero disminuye el efecto en un 30% respecto al control.



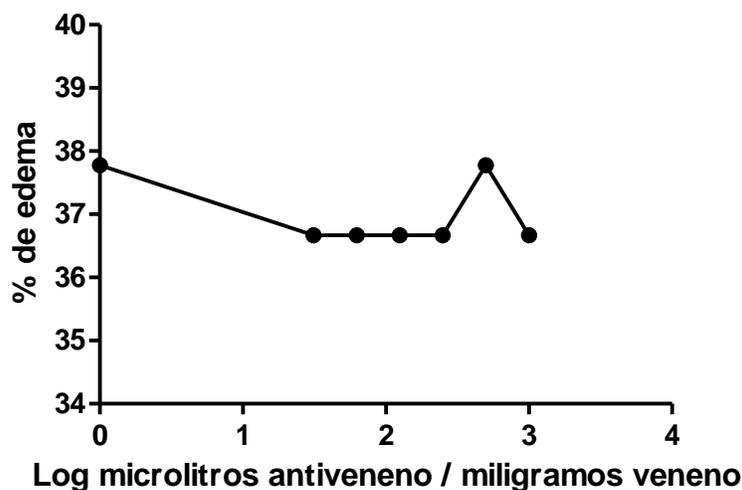
**Figura 8.** Neutralización del efecto edemático producido por el veneno *B. asper* por parte del suero sanguíneo de *C. equatoriana*. La línea punteada representa la regresión logarítmica obtenida para calcular la  $DE_{50}$  ( $R^2 = 0,9549$ ). En el eje de las abscisas, las razones de antiveneno/ veneno fueron transformadas a una escala logarítmica, así: 0= control positivo; 1,494=31,25; 1,796=62,5; 2,096=125; 2,397=250; 2,698=500; 3=1000. El eje de las coordenadas muestra el % del grosor de la pata  $\pm$  desviación estándar (n=3).

La actividad edemática puede desencadenar necrosis de tejidos, como resultado del incremento de la presión compartimental. La figura 9, muestra la necrosis en la pata de ratón inyectada con el veneno y las figuras 9B a 9D permiten observar el efecto positivo de las mezclas de antiveneno/veneno.



**Figura 9.** Necrosis producida por el veneno de *B. asper* durante la determinación de  $DE_{50}$  edemática: **A.** Control positivo (Veneno) y neutralización de los efectos con suero de *C. equatoriana* con diferentes razones B. 250; C. 500; D. 1000.

El efecto edemático por parte del suero del INS fue baja, disminuyendo cerca del 1% respecto al control. El estrecho rango de disminución, así como el margen de error en las pruebas *in vivo* podrían explicar el valor de la razón 500 en la gráfica, el cual fue similar al porcentaje de edema del control positivo.



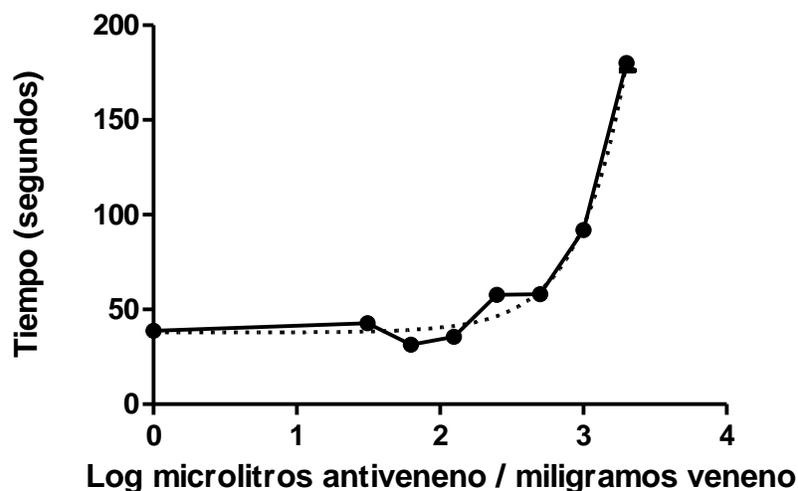
**Figura 10.** Neutralización del efecto edemático producido por veneno *B. asper* por parte del suero del INS. En el eje de las abscisas, las razones de antiveneno/ veneno fueron transformadas a una escala logarítmica, así: 0= control positivo; 1,494=31,25; 1,796=62,5; 2,096=125; 2,397=250; 2,698=500; 3=1000. El eje de las coordenadas muestra el % del grosor de la pata  $\pm$  desviación estándar (n=3).

De igual manera, uno de los efectos locales que se presenta con mayor frecuencia en los pacientes envenenados por *B. asper* es el edema, como resultado de la alteración de la estructura de la microvasculatura; lo que, desencadena el incremento en la permeabilidad vascular y la extravasación de fluidos; este efecto ha sido atribuido a la acción de las SVMPs y las PLA<sub>2</sub>s (Teixeira *et al.*, 2003). La liberación de una serie de mediadores endógenos, como resultado de la respuesta inflamatoria frente al daño tisular (Trebien & Calixto, 1989; Lomonte *et al.*, 1993; Chaves *et al.*, 1995; Rucavado *et al.*, 2002), explica la dificultad de neutralizar este efecto con los antivenenos, ya que es complicado detener la cascada de eventos inflamatorios una vez iniciada (Figura 6) (Gutiérrez *et al.*, 1998).

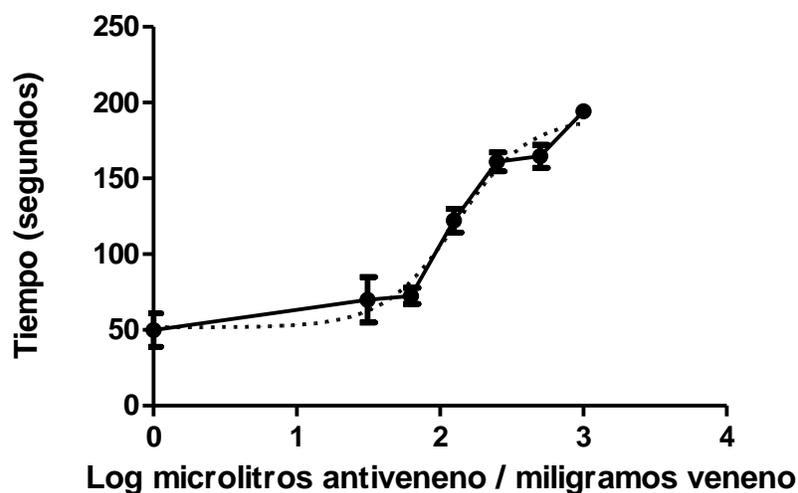
Los resultados muestran que los efectos edemáticos fueron inhibidos por el suero sanguíneo de *C. equatoriana* (Figura 9). La neutralización del efecto edemático encontrado en *C. equatoriana* se ve reflejado en la  $DE_{50}$  con un valor de 663  $\mu$ l antiveneno/ mg veneno, donde el valor de  $DE_{50}$  se encuentra por debajo de la razón 1000  $\mu$ L antiveneno/mg veneno (3 Log) (Tabla 2 y Figura 8). En cuanto a la inhibición del edema por parte del suero del INS, este fue incapaz de lograr una mejor neutralización que el suero de *C. equatoriana* en todas las dosis evaluadas, alcanzando a reducir la actividad en un 1,1 % (Figura 10), esto podría deberse en parte a que las inmunoglobulinas presentes en el suero presentan una baja inmunogenicidad frente a las  $PLA_{2s}$ , tal como se explicó en el efecto mitotóxico (Kini, 1997).

#### **6.4 Neutralización del efecto coagulante**

El efecto coagulante producido por el veneno de *B. asper* fue neutralizado por el suero de *C. equatoriana* de la cuenca del río Cauca (Figura 11); no obstante se obtuvieron mejores resultados con el suero de *C. equatoriana* del pacífico (Figura 12), ya que como se observa en la figura, a una razón de 1000  $\mu$ L antiveneno/mg veneno, el suero de *C. equatoriana* de la cuenca del río Cauca duplica el tiempo de coagulación, mientras que la población del pacífico es capaz de cuadruplicar el tiempo de coagulación respecto al control. El suero del INS presentó mayor capacidad neutralizante respecto a los sueros de las serpientes (Figura 13).

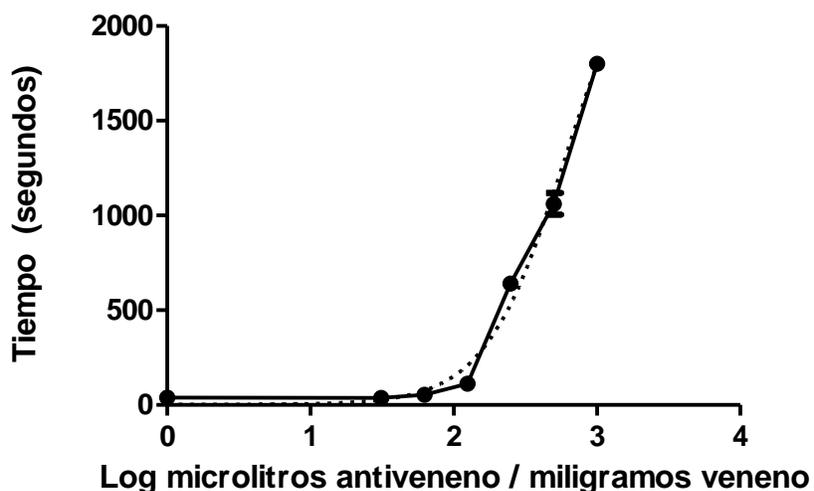


**Figura 11.** Neutralización del efecto coagulante del veneno *B. asper* con el suero *C. equatoriana* de la cuenca del río Cauca. La línea punteada representa la regresión logarítmica obtenida para calcular la  $DE_{50}$  ( $R^2 = 0,9720$ ). En el eje de las abscisas, las razones de antiveneno/ veneno fueron transformadas a una escala logarítmica, así: 0= control positivo; 0= control positivo; 1,494=31,25; 1,796=62,5; 2,096=125; 2,397=250; 2,698=500; 3=1000; 3,301=2000. El eje de las coordenadas muestra el tiempo en segundos  $\pm$  desviación estándar (n=6).



**Figura 12.** Neutralización del efecto coagulante del veneno *B. asper* con el suero de *C. equatoriana* de la llanura pacífica. La línea punteada representa la regresión logarítmica

obtenida para calcular la  $D_{E50}$  ( $R^2 = 0,9547$ ). En el eje de las abscisas, las razones de antiveneno/ veneno fueron transformadas a una escala logarítmica, así: 0= control positivo; 1,494=31,25; 1,796=62,5; 2,096=125; 2,397=250; 2,698=500; 3=1000. El eje de las coordenadas muestra el tiempo en segundos  $\pm$  desviación estándar ( $n=6$ ).



**Figura 13.** Neutralización del efecto coagulante del veneno *B. asper* por el suero de INS. La línea punteada representa la regresión logarítmica obtenida para calcular la  $DE_{50}$  ( $R^2 = 0,9891$ ). En el eje de las abscisas, las razones de antiveneno/ veneno fueron transformadas a una escala logarítmica, así: 0= control positivo; 1,494=31,25; 1,796=62,5; 2,096=125; 2,397=250; 2,698=500; 3=1000. El eje de las coordenadas muestra el tiempo en segundos  $\pm$  desviación estándar ( $n=6$ ).

Los efectos producidos por el veneno en la coagulación principalmente han sido explicados por la presencia de serina proteasas del tipo trombina, las cuales actúan de una forma similar a la trombina por lo que intervienen en la cascada de la coagulación. Actúan sobre el factor XIII de la cascada de la coagulación hidrolizando el fibrinógeno y liberando fibrinopéptidos A o B; los coágulos que se forman estructuralmente no son estables y en cuestión de tiempo se ven aclarados. La cantidad de fibrinógeno disponible en sangre se ve afectado por el veneno, evitando así la coagulación (Hutton & Warrell, 1993; Pirkle, 1998). También se ha encontrado que las moléculas de serina proteasas de *Bothrops* o

también llamadas bothrombinas actúan en el factor VIII de la cascada de la coagulación, este factor es un cofactor esencial para que la protrombina se transforme en trombina (Niewiarowski *et al.*, 1979; Nishida *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2002). Igualmente moléculas como metaloproteinasas (clase PIII) activan el factor II (protrombina) o el factor X, impulsando la formación de fibrina y generando pequeños coágulos que posiblemente podrían viajar por los vasos sanguíneos ocasionando isquemias en el sitio de la mordedura y en lugares distantes a este (Loría *et al.*, 2003; Malbranque *et al.*, 2008).

Las moléculas naturales inhibitoras de SP en animales aún no han sido estudiadas, así que se desconoce su funcionamiento; sin embargo sí se conocen inhibidores de las metaloproteinasas tal como se describió en el capítulo de antecedentes. Los dos sueros de *C. equatoriana* (Figura 11 y 12) presentan una buena inhibición de la actividad coagulante, lo que podría explicarse por la presencia de factores anti-serina proteasas y SMVPIs. Cabe resaltar que la DE<sub>50</sub> de *C. equatoriana* de la cuenca del río Cauca presentó un valor de 1270 µl antiveneno/ mg veneno mientras que la *C. equatoriana* de la llanura Pacífica tuvo un valor menor de 221 µl antiveneno/ mg veneno, indicando mejor poder neutralizante (Tabla 2); esto podría explicarse por la simpatria entre las poblaciones de *B. asper* y *C. equatoriana* del pacífico, las cuales comparten la misma área geográfica. A nivel evolutivo, las poblaciones de *B. asper* podrían haber ejercido presión selectiva sobre la población de *C. equatoriana*, dando lugar al reclutamiento de proteínas en el suero de *C. equatoriana* mejor adaptadas y con mayor capacidad neutralizante frente a los efectos ocasionados por el veneno (Janzen, 1980; Thompson, 1998).

La Tabla 2 muestra el valor de DE<sub>50</sub> por parte del suero del INS, el cual fue de 126 µl antiveneno/ mg veneno, demostrando la capacidad neutralizante de las inmunoglobulinas contenidas en el suero del INS, esto ha sido corroborado en otros estudios de neutralización, donde los efectos sistémicos son bien inhibidos por el suero comercial (Gené *et al.*, 1989; León *et al.*, 2001); además el suero del INS en la razón 1000 µL antiveneno/mg veneno (3 Log) prolongó indefinidamente

el tiempo de coagulación, hecho por el cual luego de los 1800 segundos se dejó de observar la formación del coágulo (Figura 13). Aunque los 3 tratamientos fueron efectivos en la neutralización del efecto coagulante, el suero del INS neutralizó eficazmente los efectos coagulantes del veneno de *B. asper* que las dos *C. equatoriana*.

## 6.5 Neutralización de la actividad desfibrinante

**Tabla 1.** Formación del coágulo por acción del veneno de *B. asper* después de 2 horas de la inyección de los ratones con las mezclas veneno/antiveneno (suero sanguíneo de *C. equatoriana* y suero producido por el INS). ✓ : representa la formación del coágulo y x: la no formación de este.

Antivenenos	Razones					
	31,25	62,5	125	250	500	1000
<i>C. equatoriana</i>	x	x	x	x	x	✓
INS	x	x	x	✓	✓	✓

*In vitro*, las SPs y metaloproteinasas participan en la coagulación del plasma como se mencionó anteriormente, no obstante *in vivo* la acción coagulante de estos componentes prolonga la coagulación en la sangre indefinidamente por la formación de microtrombos (acción metaloproteinasas) y consumo de fibrinógeno (acción SPs), generando problemas en la agregación plaquetaria y la formación de la red de fibrina (Niewiarowski *et al.*, 1979; Hutton & Warrell, 1993; Nishida *et al.*, 1994; Pirkle, 1998; Watanabe *et al.*, 2002; Loría *et al.*, 2003; Malbranque *et al.*, 2008).

La Tabla 1 muestra que después de dos horas, la dosis eficaz (DE) para *C. equatoriana* fue la razón 1000, corroborando lo encontrado en la anterior prueba,

posiblemente debido a la acción de las moléculas naturales de inhibición anteriormente mencionadas; sin embargo la DE encontrada para el instituto fue de 250, lo que demuestra que las inmunoglobulinas neutralizan apropiadamente las alteraciones sistémicas encontradas en la coagulación, esto concuerda con otros estudios donde los efectos sistémicos son eficientemente neutralizados por el suero antiofídico comercial (Gené *et al.*, 1989; León *et al.*, 2001). Al igual que en la prueba de neutralización de los efectos coagulantes, los valores del suero del INS al ser mayores que los encontrados para el suero sanguíneo de *C. equatoriana*, demuestran la efectividad con la que cuenta el suero comercial para neutralizar los efectos sistémicos provocados por el veneno de *B. asper*.

A continuación, la Tabla 2 presenta una síntesis de las DE<sub>50</sub> obtenidas a partir de las curvas de regresión logarítmica de cada una de las gráficas anteriores y la DE de la prueba de neutralización del efecto desfibrinante. .

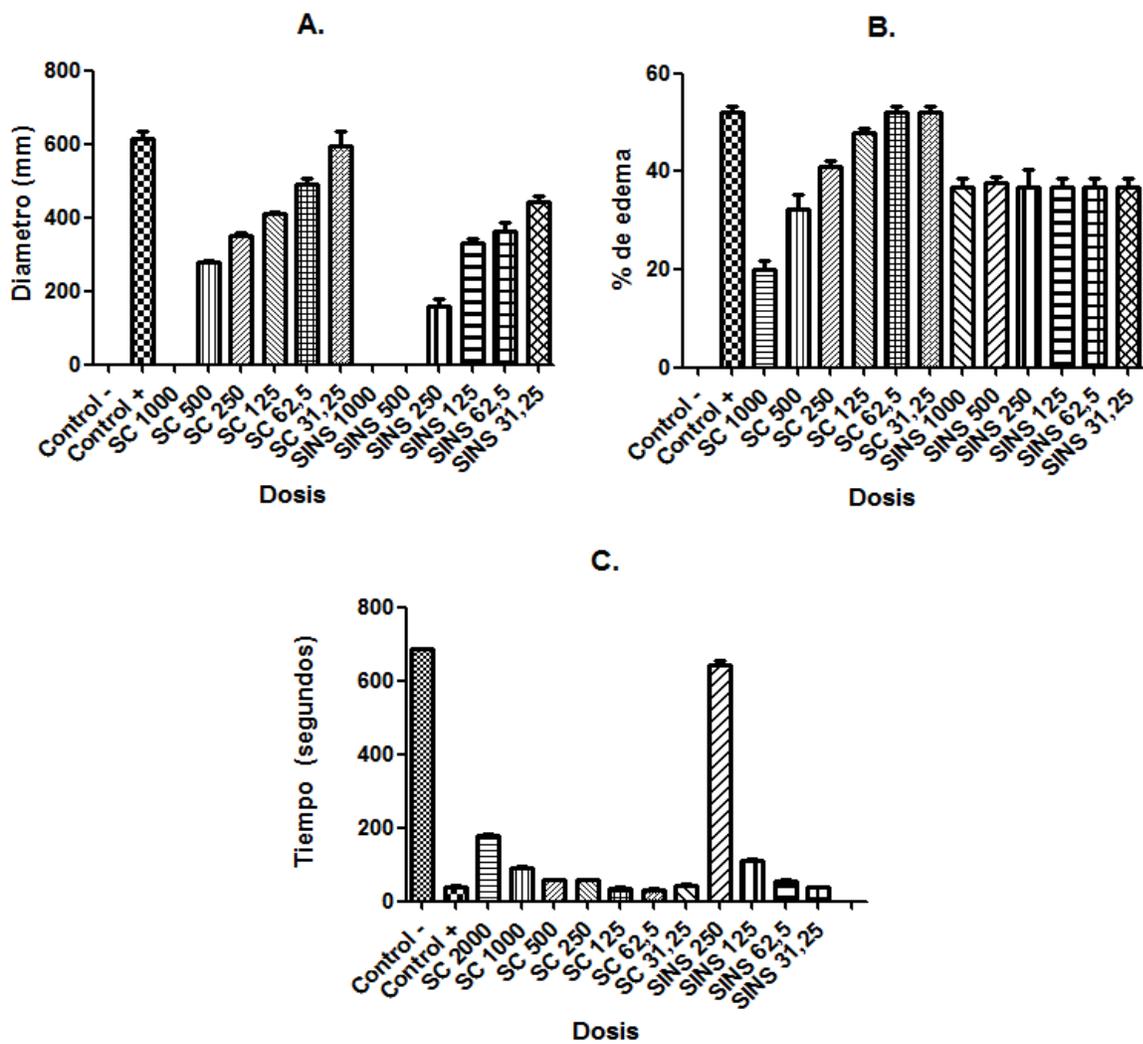
**Tabla 2.** Comparación entre las Dosis efectivas del suero de *C. equatoriana* y el suero producido por el INS obtenidas para cada una de las pruebas de neutralización de los efectos producidos por el veneno de *B. asper*.

PRUEBAS	ANTIVENENO		
	INS	<i>C. equatoriana</i> de la cuenca del río Cauca	<i>C. equatoriana</i> de la llanura pacífica
<b>Neutralización del efecto hemorrágico local</b> <i>DE</i> <sub>50</sub> ( $\mu$ l antiveneno/ mg veneno)	183	372	-
<b>Neutralización del efecto miotóxico</b> <i>DE</i> <sub>50</sub> ( $\mu$ l antiveneno/ mg veneno)	-	-	-
<b>Neutralización del efecto edemático</b> <i>DE</i> <sub>50</sub> ( $\mu$ l antiveneno/ mg veneno)	-	663	-
<b>Neutralización del efecto</b>			

<b>coagulante</b>	126	1270	221
<i>DE</i> <sub>50</sub> ( $\mu$ l antiveneno/ mg veneno)			
<b>Neutralización de la actividad desfibrinante</b>	250	1000	-
<i>DE</i> ( $\mu$ l antiveneno/ mg veneno)			

## 6.6 Comparación entre los sueros

La Figura 12 muestra una comparación estadística entre los datos obtenidos a partir de los ensayos de neutralización.



**Figura 14.** Comparación de la neutralización de los diferentes efectos ocasionados por el veneno de *B. asper* por parte del suero sanguíneo de *C. equatoriana* y del suero

producido por el INS. **A.** representa el efecto hemorrágico. **B.** Efecto edematizante. **C.** Efecto Coagulante. Ningún valor se ajustó a la curva normal, ni a la homogeneidad de varianza, por lo tanto se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existía o no diferencia significativa entre los grupos.

La comparación entre los datos de neutralización de la hemorragia por el suero del INS y el suero de *C. equatoriana* mostró que no existen diferencias significativas, a pesar de que la gráfica muestra que el les más eficaz en la neutralización, esto indica que aunque con algunas variaciones, ambos sueros tiene la capacidad de neutralizar el efecto (Figura 14 A.). En cuanto a la neutralización del edema, el suero de *C. equatoriana* mostró una diferencia significativa con un valor de  $P < 0,01$ , que se ve reflejado en las gráficas y los datos encontrados, puesto que el suero del INS solo pudo neutralizar un 1,1% el edema en cambio el suero de *C. equatoriana* logro neutralizar más de 30% del edema causado por el veneno (Figura 14 B). Los valores de neutralización de coagulación si mostraron diferencia significativa entre los grupos con un valor  $P < 0,05$ . En la gráfica es evidente que en la razón 250, el tiempo de coagulación por parte del suero del INS se prolonga considerablemente frente al del suero de *C. equatoriana*, siendo incluso mayor que el valor reportado para la razón 2000 del suero de *C. quatoriana* (Figura 14 C.). Lo anterior confirma que el suero del INS es más eficiente en la neutralización de efectos sistémicos como la coagulación; sin embargo se debe tener en cuenta que en el suero sanguíneo *C. equatoriana* las proteínas o factores que inhiben los efectos ocasionados por el veneno, no están purificadas, ni concentradas como si lo están en el suero comercial.

## 7. CONCLUSIONES

- ✓ El suero sanguíneo de *C. equatoriana* inhibió los efectos locales como hemorragia y edema, así como también los efectos sistémicos del veneno de *B. asper*. El efecto hemorrágico fue el mejor neutralizado con una DE<sub>50</sub> de 372 µl antiveneno/ mg veneno.
- ✓ La neutralización del efecto miotóxico presentado por el suero sanguíneo de *C. equatoriana* fue deficiente, por el contrario, su administración incrementó los valores de CK.
- ✓ La población de *C. equatoriana* simpátrica con la población de *B. asper* neutralizó mejor el efecto coagulante, con un valor 5.7 veces menor que la población de *C. equatoriana* de la cuenca del río Cauca.
- ✓ El suero del Instituto Nacional de Salud neutralizó mejor los efectos sistémicos en comparación con el suero sanguíneo de *C. equatoriana*. El efecto coagulante fue el mejor inhibido, en el cual el tiempo de coagulación se prolongó indefinidamente con la razón 1000 µl antiveneno/ mg veneno.
- ✓ El suero del Instituto Nacional de Salud no logró neutralizar los efectos edemático y miotóxico, lo que concuerda con lo reportado hasta el momento respecto a su capacidad neutralizante.

## 8. RECOMENDACIONES

Se sugiere estudiar la respuesta inmune de *C. equatoriana* contra los venenos, puesto que se desconoce que otros componentes actúan, ya que los estudios realizados *in vivo* solo han evaluado la supervivencia de los individuos.

Se recomienda aislar las proteínas inhibidoras de *C. equatoriana* de efectos hemorrágicos, edemáticos y coagulantes para realizar una mejor comparación con el antiveneno comercial y estudiar mejor los mecanismos de inhibición involucrados en la neutralización de las diferentes actividades biológicas producidas por los venenos, con la finalidad de mejorar el antiveneno comercial con las proteínas inhibitorias.

Además se sugiere estudiar por que se dan los efectos miotóxicos con el suero sanguíneo de las serpientes, es decir que componente está generando dichos inconvenientes.

Es necesario, además, probar ambos antivenenos (suero de *Clelia* e INS) en conjunto para verificar si se aumenta el poder neutralizante.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abalos, J.W., 1963. The ophidiofagus habits of *Pseudoboa cloelia*. *Toxicon* 1, 90–91.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571. doi:10.1021/pr800332p
- Aragón, F., Gubenšek, F., 1981. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon* 19, 797–805. doi:10.1016/0041-0101(81)90076-3
- Ayerbe-González, S., 2009. Ofidismo en Colombia, Enfoque, Diagnostico y Tratamiento. In C. A. Ordóñez, R. Ferrada, & R. Buitrafo, eds. *Cuidado Intensivo y Trauma*. Bogotá Editor. Médica 1304.
- Bioclon, I., 2016. Bioclon, Instituto. URL <http://www.bioclon.com.mx/bioclon/pdf/ANTIVIPMYN%252>
- Bjarnason, J., Fox, J., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol . Ther* 62, 325–372.
- Bjarnason, J.B., Tu, A., 1978. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. *Biochemistry* 17, 3395–3404.
- Borkow, G., Gutierrez, J.M., Ovadia, M., 1995. Isolation, characterization and mode of neutralization of a potent antihemorrhagic from the serum of the snake *Bothrops asper*. *BBA - Gen. Subj.* 1245, 232–238.
- Borkow, G., Gutierrez, J.M., Ovadia, M., 1994. A potent antihemorrhagin in the serum of the non-poisonous water snake *Natrix tessellata*: isolation, characterization and mechanism of neutralization. *BBA - Gen. Subj.* 1201, 482–490.

- Calmette, A., 1895. Experiences sur l'immunité de le mangouste.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.
- Cerdas, L., Lomonte, B., 1982. Estudio de la capacidad ofiofaga y la resistencia de la zopilota (*Clelia clelia*, Colubridae) de Costa Rica a los venenos de serpiente. *Toxicon* 20, 936–939. doi:10.1016/0041-0101(82)90083-6
- Chacón, F., Oviedo, A., Escalante, T., Solano, G., Rucavado, A., José María Gutiérrez, 2015. The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: Pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate in vitro assay. *Toxicon* 93, 41–50.
- Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J., 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33, 31–39.
- Clark, W.C., Voris, H.K., 1969. Venom neutralization by rattle snake serum albumin. *Science* (80- ). 164, 1402–1404.
- Clark, W.C., Voris, H.K., Weinstein, S.A., Dewitt, C.F., Smith, L.A., Weinstein, S.A., Dewitt, C.F., Smith, L.A., Katzenbach, J.E., Foy, D.S., 1969. Venom Neutralization by Rattlesnake Serum Albumin. *Science* (80- ). 164, 1402–1404. doi:10.1111/vec.12349
- CLaude-Bernard, 1787. Leçons sur l'effet des substances toxiques.
- Clodomiro Picado, I., 2008. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y neutralización por antivenenos.
- Deoras, P.J., Mhasalkar, V.B., 1963. Antivenin activity of some snake sera. *Toxicon* 1, 89–90. doi:10.1016/0041-0101(63)90052-7
- Domont, G.B., Perales, J., Moussatche, H., 1991. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon* 29, 1183–1194. doi:10.1016/0041-0101(91)90191-S

- Dos Santos-Costa, M.C., Outeiral, A.B., D'Agostini, F.M., Cappellari, L.H., 2000. Envenomation by the neotropical colubrid *Boiruna maculata* (Boulenger, 1896): A case report. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 42, 283–286. doi:10.1590/S0036-46652000000500008
- Dumeríl, A., 1854. Notice historique sur la ménagerie des reptiles du Museum d'Hist. Nat. Arch. du Mus.
- Duque Osorio, J.F., Sánchez, A., Fierro, L., Garzón, S., Castaño, R.S., 2007. Venenos de Serpientes y Moléculas Antiveneno. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Fis. y Nat.* 31, 109–137.
- Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson, M., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0028017
- Fayrer, J., 1874. The Thanatophidia of India.
- Folleco-Fernández, 2010. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García 1896) y descripción de una nueva especie.
- Fortes-Dias, C.L., Diniz, C.R., Liu, T.H., Lin, Y., 1994. A Phospholipase A2 Inhibitor from the Plasma of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J Biol Chem* 269, 15641–15646.
- Fox, J., Serrano, S., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 42, 915–931.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2010. Snake venom metalloproteinases, in: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 95–113.
- Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of

- Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841–848. doi:10.1016/0041-0101(89)90096-2
- Gutiérrez, J., Lomonte, B., 2003. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. En: Cardoso, JLC, Franca, FOS, Wen, FH, Málaque, CMS, Daddad, V. (Eds.) *Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Accidentes.*, Sarvier, Sao Paulo.
- Gutiérrez, J., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424.
- Gutiérrez, J., Ownby, C., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915–931.
- Gutiérrez, J., Ownby, C., Odell, G., 1984. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.* 40, 367–379.
- Gutiérrez, J., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997–1011.
- Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla, E., 1981. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19, 493–500.
- Gutiérrez, J.M., Gené, A., Rodas, G., Cerdas, L., Picado, I.C., Microbiología, F. De, Rica, U.D.C., José, S., Rica, C., Rica, I.N.C., 1985a. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 887–893.
- Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Rodas, G., Cerdas, L., 1985b. Neutralization Of Proteolytic And Hemorrhagic Activities Of Costa Rican Snake Venoms By A Polyvalent Antivenom. *Toxicon* 23, 887–893.
- Gutiérrez, J.M., León, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., Chaves, F., 1998.

- Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 36, 1529–1538.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Rucavado, A., Chaves, F., 2012. Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América: bioquímica y fisiopatología, in: *Emergencias Por Animales Ponzosñosos En Las Américas*. pp. 461–489. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A., Cerdas, L., 1986. Comparative study of edema-formating activity of costa rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.* 85C, 171–175.
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.020
- Guyon, J., 1861. Le venin des Serpents exerce-t-il sur eux-mêmes l'action qu'il exerce sur d'autres animaux? *C. R. Ac. des Sc . Comptes rendus LIII*, 12–18.
- Hains, P.G., Broady, K.W., 2000. Purification and Inhibitory Profile of Phospholipase A2 Inhibitors from Australian Elapid Sera. *Biochem J* 346, 139–146.
- Hains, P.G., Nield, B., Skuloski, S., Dunn, R., Broady, K., 2001. Sequencing and two-dimensional structure prediction of a phospholipase A2 inhibitor from the serum of the common tiger snake (*Notechis scutatus*). *J Mol Biol* 312, 875–884.
- Hains, P.G., Sung, K.L., Tseng, A., Broady, K.W., 2000. Functional Characteristics of a Phospholipase A2 Inhibitor from *Notechis ater* Serum. *J Biol Chem* 275, 983–991.
- Huang, K.F., Chow, L.P., Chiou, S.H., 1999. Isolation and characterization of a novel proteinase inhibitor from the snake serum of Taiwan Habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Biochem Biophys Res Commun* 263, 610–

616.

Hutton, R.A., Warrell, D.A., 1993. Action of snake venom components on the haemostatic system. *J. Voice* 7, 176–189. doi:10.1016/0268-960X(93)90004-N

Instituto Nacional de Salud, 2016. Instituto Nacional de Salud. URL <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/Biblio>

Janzen, D.H., 1980. When is it Coevolution? *Evolution* (N. Y). 34, 611–612.

Keegan, H.L., Andrews, T., 1942. Effects of Crotalid Venom on North American Snakes. *Copeia* 4, 251–254.

Kellaway, C.H., 1937. Snake Venoms. Immunity. *Bulletin of The Johns Hopkins Hospital*. 60, 159–177.

Kini, R.M., 1997. *Venom Phospholipase A2 Enzymes. Structure, Function and Mechanism*, Function and Mechanism 1st ed., Chichester, UK: John Wiley and Sons.

Klauber, L., 1956. *Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind*, Univeristy of California Press.

Kogaki, H., Inoue, S., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T., Hamaguchi, K., 1989. Isolation and Fundamental Properties of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Blood Plasma of *Timeresurus flavoviridis*. *J Biochem* 106, 966–971.

Kuwajima, Y., 1953. Immunological researches on the main Formosan poisonous snakes, especially on the venoms. III. Pathological changes in rabbits due to the experimental inoculation of Crotalidae snake venoms. *Jpn. J. Exp. Med.* 23, 465–471.

Leite Pinto, R.N., Silva Nelson Jorge da, J., Aird, S.D., 1991. Human envenomation by the South American opisthoglyph *Clelia clelia plumbea* (Wied). *Toxicon* 29, 1512–1516. doi:10.1016/0041-0101(91)90008-F

León, G., Monge, M., Rojas, E., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2001. Comparison between IgG and F(ab')<sub>2</sub> polyvalent antivenoms: Neutralization of systemic

effects induced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon* 39, 793–801. doi:10.1016/S0041-0101(00)00209-9

Lizano, S., Angulo, Y., Lomonte, B., Fox, J.W., Lambeau, G., Lazdunski, M., Pharmacologie, I. De, National, C., Scientifique, R., Antipolis, S., 2000. godmani which selectively inhibit two different group-II phospholipase biological properties. *Changes* 639, 631–639.

Lizano, S., Domont, G., Perales, J., 2003. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* 42, 963–977. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.007

Lizano, S., Lomonte, B., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 1997. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. J.* 326, 853–9.

Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of Lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.

Lomonte, B., Cerdas, L., Gené, J. a., Gutiérrez, J.M., 1982. Neutralization of local effects of the terciopelo (*Bothrops asper*) venom by blood serum of the colubrid snake *Clelia clelia*. *Toxicon* 20, 571–579. doi:10.1016/0041-0101(82)90051-4

Lomonte, B., Cerdas, L., Solorzano, A., Martinez, S., 1990. The serum of newborn *Clelia clelia* (Serpentes: Colubridae) neutralizes the hemorrhagic action of *Bothrops asper* venom (Serpentes: Viperidae). *Rev Biol Trop* 38, 325–326.

Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L., Maccarana, M., 1994. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem* 269, 29867–29873.

- Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93–105.
- Loría, G.D., Rucavado, A., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Fox, J.W., Alape, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Characterization of “basparin A”, a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 13–24.
- Lynch, J.D., 2012. El contexto de las serpientes de Colombia con un análisis de las amenazas en contra de su conservación. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias* 36(140), 435–449.
- Malbranque, S., et al, 2008. Case report: Fatal diffuse thrombotic microangiopathy after a bite by the “Fer-de-Lance” pit viper (*Bothrops lanceolatus*) of Martinique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 856–861.
- Malbranque, S., Piercecchi-Marti, M.D., Thomas, L., Barbey, C., Courcier, D., Bucher, B., Ridarch, A., Smadja, D., Warrell, D.A., 2008. Case report: Fatal diffuse thrombotic microangiopathy after a bite by the “Fer-de-Lance” pit viper (*Bothrops lanceolatus*) of Martinique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 856–861.
- Mitchell, W., 1861. Physiology and toxicology of the venom of the rattlesnake.
- Mora-Obando, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2014a. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A2 Myotoxins of Viperid Snake Venom In Vitro and In Vivo. *Public Libr. Sci.* 9, e109846. doi:10.1371/journal.pone.0109846
- Mora-Obando, D., Guerrero-Vargas, J.A., Prieto-Sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., Ayerbe, S., Lomonte, B., 2014b. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *J. Proteomics* 96, 159–172. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.005

- Moussatché, H., Perales, J., 1989. Factors Underlying the Natural Resistance of Animals Against Snake Venoms.pdf. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.
- Muñoz-Gómez, L.M., Appel-Uruburu, V.A., Guerrero-Vargas, J.A., 2016. Determinación del poder neutralizante del suero sanguíneo de *Didelphis marsupialis* (LINNEAUS, 1758) y del suero antiofídico producido por el instituto nacional de salud usando el veneno de tres poblaciones de *Bothrops asper* (GARMAN, 1883) del suroccidente. Univ. del Cauca.
- Niewiarowski, S., Kirby, E.P., Brudzynski, T.M., Stocker, K., 1979. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry* 18, 3570–35707.
- Nishida, S., Fujimura, Y., Miura, S., Ozaki, Y., Suzuki, M., Titani, K., 1994. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 33, 1843–1849.
- Nobuhisa, I., Chiwata, T., Fukumaki, Y., Hattori, S., Shimohigashi, Y., Ohno, M., 1998. Structural Elements of *Trimeresurus flavoviridis* Serum Inhibitors for Recognition of its Venoms Phospholipase A2 Isozymes. *FEBS Lett* 429, 385–389.
- Nobuhisa, I., Inamasu, S., Nakai, M., Tatsui, A., Mimori, T., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, S., Kihara, H., Ohno, M., 1997. Characterization and Evolution of a Gene Encoding a *Trimeresurus flavoviridis* Serum Protein that Inhibits Basic Phospholipase A2 Isozymes in the Snake's Venom. *Eur J Biochem* 249, 838–845.
- Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1993. Isolation and Amino Acid Sequence of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Blood Plasma of *Agkistrodon blomhoffii sineticus*. *J Biochem* 113, 413–419.
- Ohkura, N., Kitahara, Y., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1999. Isolation and Amino Acid Sequence of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Blood Plasma of the Sea Krait, *Laticauda semifasciata*. *J Biochem* 125, 375–382.

- Ohkura, N., Okuhara, H., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1997. Purification and Characterization of Three Distinct Types of Phospholipase A2 Inhibitors from the Blood Plasma of the Chinese Mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem J* 325, 527–531.
- Okumura, K., Inoue, S., Hayashi, K., Ikeda, K., 2002. Identification of b-type Phospholipase A2 Inhibitor in a Nonvenomous Snake, *Elaphe quadrivirgata*. *Arch Biochem Biophys.* 408, 124–130.
- Okumura, K., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 2002. Identification of  $\beta$ -type phospholipase A2 inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 124–130.
- Okumura, K., Masu, N., Inoue, S., Ikeda, K., Kayashi, K., 1999. Purification, Characterization and cDNA Cloning of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Serum of the Nonvenomous Snake *Elaphe quadrivirgata*. *Biochem J* 341, 165–171.
- Okumura, K., Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1998. A Novel Phospholipase A2 Inhibitor with Leucine-rich Repeats from the Blood Plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*: Sequence Homologies with Human Leucine-rich a2- glycoprotein. *J Biol Chem* 273, 19469–19475.
- Omari-satoh, T., Sadahiro, S., Ohsaka, A., Murata, R., 1972. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of an anti-hemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. A Crotalidae. *Bioch. Biophys.* 285, 414–426.
- Otero-Patiño, R., Cardoso, J.L.C., Higashi, H.G., Nunez, V., Diaz, A., Toro, M.F., Garcia, M.E., Sierra, A., Garcia, L.F., Moreno, A.M., Medina, M.C., Castañeda, N., Silva-Diaz, J.F., Murcia, M., Cardenas, S.Y., Dias da Silva, W.D., 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., Silva-Haad, J.J., Acevedo, M.J.B., Castaño, M.F.T., Castillo,

- J.C.Q., Cadavid, A.D., Vélez, I.C.V., Rivera, V.R., Figueroa, C.I.D., Ceballos, M.F., Audiber, S.A., Chaverra, N.L.C., Restrepo, C.A.M., Giraldo, C.E.R., Vides, A.B.A., Julio, E.A.C., Zabaleta, T.I.R., Castañeda, M.V.G., Agudelo, A.D.S.A., Guerra, J.J.L., Bedoya, N.O., Prada, D.M.M., Delgado, O.F.J., Agudelo, H.D.P., Saldarriaga, M.E.E., Ballestas, J.M.C., 2007. Accidente Bothrópico en Colombia: Estudio Multicéntrico de la Eficacia y Seguridad de Antivipmyn-Tri, un Antiveneno Polivalente Producido en Mexico. IATREIA 20, 244–262.
- Ovadia, M., 1978. Purification and Characterization of an Antihemorrhagic Factor from the Serum of the Snake *Vipera palaestinae*. *Toxicon* 16, 661–672.
- Ovadia, M., Kochva, E., 1977. Neutralization of Viperidae and Elapidae Snake Venoms by Sera of Different Animals. *Toxicon* 15, 541–547.
- Ovadia, M., Kochva, E., Moab, B., 1977. Neutralization mechanism of vipera palestina neurotoxin by purified factor from homologous serum. *Bioch. Biophys.* 491, 370–386.
- Ovadia, M., Moav, B., Kochva, E., 1975. Factors in the blood serum of vipera Palaestinae neutralizing fractions of its venom, in: *Toxicon*. p. 113.
- Perales, J., Domont, G.B., 2002. Are Inhibitors of Metalloproteases, Phospholipases A2 and Myotoxins Members of the Innate Immune System?, in: *Perspectives in Molecular Toxinology*, Wiley, Chichester. pp. 435–456.
- Perales, J., Muñoz, R., Moussatché, H., 1986. Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (*Didelphis marsupialis*) serum, with protecting property against the Bothrops jararaca snake venom. *An Acad Bras Cienc.* 58, 155–162.
- Perales, J., Neves-Ferreira, A.G.C., Valente, R.H., Domont, G.B., 2005. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1013–1020. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.028
- Perales, J., Villela, C.G., Domont, G.B., Chourmet, V., Saliou, B., Moussatché, H.,

- Bon, C., Faure, G., 1995. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur J Biochem* 227, 19–26.
- Pérez, J.C., Sánchez, E.E., 1999. Natural Protease Inhibitors to Hemorrhagins in Snake Venoms and Their Potential Use in Medicine. *Toxicon* 37, 703–28.
- Philpot, V., Smith, R.G., 1950. Neutralization of pit viper venom by king snake serum. *Proc. Soc. Exper. Biol. Medic.* 74, 521–523.
- Phisalix, C., Bertrand, G., 1895. Sur (immunité du Hérisson contre le venin de Vipère (Rep. à Lewin).
- Phisalix, M., 1922. Animaux Venimeux et Venins, in: Paris: Mason & Cie. Editeurs . pp. 744–759.
- Pirkle, H., 1998. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an update inventory. *Thromb. Haemost.* 79, 675–683.
- ProBiol, L., 2016. Laboratorio ProBiol. URL <http://www.probiol.com/images/pdf/probiolsueropoli>
- Rojas-Morales, J.A., 2013. Description of ophiophagy in *Clelia equatoriana* (Amaral, 1924) (Serpentes: Dipsadidae) in captivity. *Herpetol. Notes* 6, 425–426.
- Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., Rojas, G., Gutierrez, J.M., 2005. Neutralization of four peruvian *Bothrops* sp snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: Preclinical assessment. *Acta Trop.* 93, 85–95.
- Rojas, G., Jiménez, J., Gutiérrez, J., 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32, 351–363. doi:10.1016/0041-0101(94)90087-6
- Rosenfeld, S., Glass, S., 1946. The inhibiting effect of snake blood upon hemorrhagic action of viper venom on mice. *Americ. J. Med. Sci.* 109, 482–

486.

- Rucavado, A., Escalante, T., Teixeira, C., Fernandes, C., Díaz, C., Gutiérrez, J., 2002. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Med. Inflamm* 11, 121–128.
- Saravia, P., Rojas, E., Escalante, T., Arce, V., Chaves, E., Velásquez, R., Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., 2001. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 39, 401–405.
- Sasa, M., Wasko, D.K., Lamar, W.W., 2009. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon* 54, 904–922. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.024
- Savage, J.M., 2002. *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica*, Chicago: University of Chicago Press.
- SIVIGILA, 2016. El Sistema de Salud Pública (SIVIGILA) [WWW Document]. El Sist. Salud Pública Colomb. URL <https://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/SIVIGILA.aspx>
- Soares, A.M., Marcussi, S., Stábeli, R.G., França, S.C., Giglio, J.R., Arantes, R.J., Ward, E.C., 2003. Structural and Functional Análisis of BmjMIP, a Phospholipase A2 Myotoxin Inhibitor Protein from *Bothrops moojeni* plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 302, 193–200.
- Straight, R., Glenn, J.L., Snyder, C.C., 1976. Antivenom activity of rattlesnake blood plasma. *Nature* 260, 259–260. doi:10.1038/260170a0
- Swanson, P.L., 1946. Effects of the snake venoms on snakes. *Copeia* 1946, 242–249.
- Tanizaki, M.M., Kawasaki, H., Suzuki, K., Mandelbaum, F.R., 1991. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 29, 673–681.

- Teixeira, C., Landucci, E., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon* 42, 947–962.
- Thompson, J.N., 1998. Rapid evolution as an ecological process. *Trends Ecol. Evol.* 13, 329–32. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01289.x
- Thwin, M.M., Gopalakrishnakone, P., 1998. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991-1997). *Toxicon* 36, 1471–82. doi:10.1016/S0041-0101(98)00137-8
- Thwin, M.M., Gopalakrishnakone, P., Kini, R.M., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 2000. Recombinant Antitoxic and Antiinflammatory Factor from the Nonvenomous Snake *Python reticulatus*: Phospholipase A2 Inhibition and Venom Neutralizing Potential. *Biochemistry* 39, 9604–9611.
- Trebien, H., Calixto, J., 1989. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions* 26, 292–300.
- Valente, R.H., Dragulev, B., Perales, J., Fox, J.W., Domont, G.B., 2001. Domont Cloning and characterization of BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Bothrops jararaca* serum. *Eur. J. Biochem.* 268, 3042–3052.
- Waddell, L.A., 1889. Are venomous snakes sutotoxic? An enquiry into the effects of serpent venoms upon the serpents themselves. *Sci. Mem. by Med. Off. Army India* 4.
- Walteros, D., Paredes, A., 2014. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, ACCIDENTE OFÍDICO, MINSALUD, paz equidad y educacion, Instituto Nacional de Salud.
- Watanabe, L., Vieira, D.F., Bortoleto, R.K., Arni, R.K., 2002. Crystallization of Bothrobin, a Fibrinogen-Converting Serine Protease Isolated From the Venom of *Bothrops Jararaca*. *Acta Crystallogr. D. Biol.* 58, 1036–1038.
- Weinstein, S.A., Lafaye, P.J., Smith, L.A., Copeia, S., Aug, N., Weinstein, S., Lafaye, P., Smith, L., 1990. Observations on a venom neutralizing albumin fraction isolated from serum of the northern copperhead *Agkistrodon contortrix*

mokasen. *Toxicon* 28, 629.

Weissenberg, S., Ovadia, M., Fleminger, G., Kochva, E., 1991. Antihemorrhagic Factors from the Blood Serum of the Western Diamondback Rattlesnake *Crotalus atrox*. *Toxicon* 29, 807–818.

WHO, 2010. WHO Guidelines for the Production Control and Regulation Of Snake Antivenom Immunoglobulins. Geneva.

Yamakawa, Y., Omori-Sato, T., 1992. Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double headed cystatin domain. *J. Biochem.* 112, 583–589.

Zaher, H., 1996. A new genus and species of Pseudoboine snake, with a revision of the genus *Clelia* (Serpentes, Xenodontinae). *Bolletino Mus. Reg. di Sci. Nat.* 14, 289–337.