UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES EQUINOS CONTRA VENENO DE SERPIENTE CORAL UTILIZANDO MEZCLAS EQUIMOLECULARES DE VENENO-ANTICUERPO

DIANA MARCELA IBARGÜEN CHABARRO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
BOGOTÁ, COLOMBIA
2012

PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES EQUINOS CONTRA VENENO DE SERPIENTE CORAL UTILIZANDO MEZCLAS EQUIMOLECULARES DE VENENO-ANTICUERPO

DIANA MARCELA IBARGÜEN CHABARRO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister Ciencias Farmacéuticas

DIRECTOR
MILTON JOSUÉ CROSBY Q.F.
Ph.D. Doctor en Ciencias de la Vida y la Salud

Línea de investigación en:
Antisueros

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
BOGOTÁ, COLOMBIA
2012

DEDICATORIA

A Victoria mi bella hija, a mi esposo quienes han sido mi gran apoyo y compañía en este camino que he emprendido y la fortaleza espiritual para seguir luchando por mis sueños. A mi madre, mi padre (QPD) y mi hermana quienes siempre han creído en mí y han representado en mi vida el soporte para construir mis metas.

Mil gracias a DIOS y a todas las personas que se cruzaron en mi camino.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Milton Josué Crosby Granados, por su valiosa asesoría en el desarrollo de este trabajo de investigación, por su compañía en todas las actividades de campo, de laboratorio y sobre todo por creer en mis capacidades académicas y técnicas.

A la doctora Marta Gómez Cabal gerente del Laboratorio Probiol por el financiamiento del proyecto de investigación, por abrirme las puertas de su empresa, por tener fe en mi trabajo y apoyarme en el desarrollo y culminación del mismo.

Al doctor Alberto Gómez Cabal, Samec Peña Zea y Yerson, veterinarios del Laboratorio Probiol por su gran colaboración en el manejo de los equinos y su excelente asesoría en el desarrollo de las inmunizaciones en la finca ubicada en Guasca Cundinamarca.

A la doctora Marta Dorado y a las auxiliares Blanca y Cecilia del laboratorio Probiol por toda su colaboración.

A los profesores de la Universidad Nacional por su gran aporte académico.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS.	
LISTA DE TABLAS.	
LISTA DE GRAFICAS.	
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	**1**
1.2. Historia del Uso de Anticuerpos Terapéuticos	**2**
1.3 Accidente Ofídico	**3**
1.4. Serpientes	**3**
1.4.1. Corales	**4**
1.5. Veneno de serpiente	**5**
1.5.1. Sintomatología del envenenamiento	**6**
1.5.2. Clasificación del envenenamiento	**6**
1.5.3. Control y tratamiento	**6**
1.6. Generalidades de la respuesta inmune	**7**
1.6.1. Productos Derivados de Sangre	**10**
1.6.2. Antisueros	**10**
1.6.3. Propiedades biológicas	**11**
1.6.4. Usos terapéuticos de las gammaglobulinas	**13**
1.6.5. Inmunización pasiva	**13**
1.7. Obtención de gammaglobulinas	**13**
1.8. Métodos de Purificación de gamaglobulinas	**15**
1.8.1. Fraccionamiento y purificación de anticuerpos	**15**
1.8.2. Precipitación	**15**
1.8.3. Fraccionamiento Salino	**16**
1.8.4. Fraccionamiento con Solventes	**17**
1.8.5. Fraccionamiento por cambio en el pH	**19**
1.8.6. Fraccionamiento con PEG	**20**
1.8.7. Cromatografía	**21**
1.9. Inactivación viral.	**21**
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	**24**
3. HIPOTESIS	**25**
4. OJETIVOS	**25**

4.1. GENERAL **25**
4.1.1 Específicos **25**
5. MATERIALES Y MÉTODOS **27**
5.1. Reactivos **27**
5.2. Venenos **27**
5.3. Antisueros **28**
5.4. Animales **28**
5.5. Determinación de la DL_{50} **28**
5.6. Ensayo de potencia o neutralización **29**
5.7. Preparación de inoculo para inmunización **29**
5.8. Protocolo de inmunización de equinos **29**
5.9. Sangría de los equinos **30**
5.10. Separación del plasma **30**
5.11. Fraccionamiento del plasma **30**
5.12. Cuantificación de proteína total y evaluación de la pureza de IgG por SDS-PAGE (Electroforesis) **31**
5.13. Evaluación de la presencia de anticuerpos específicos (ouchterlony). **31**
5.14. Titulación de anticuerpos por ELISA **31**
5.15. Ensayo de potencia en placa **32**
6. RESULTADOS **33**
6.1. ENSAYOS BIOLOGICOS. **33**
6.1.1. Determinación de parámetros para cálculo de DL_{50} **33**
6.1.2. Ensayo de neutralización e inmunización de Equinos. **35**
6.2. Fraccionamiento del plasma **35**
6.3. Cuantificación de proteína total **37**
6.4. Evaluación del título de anticuerpos específicos anti-veneno de coral por la técnica de doble inmunodifusión (Ouchterlony). **38**
6.5. Título de anticuerpos por ELISA. **40**
6.6. Ensayo de neutralización en placa **40**
7. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS **44**
7.1. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL_{50}) **44**
7.2. Producción de suero hiperinmune equino anti-veneno de coral **44**
7.3. Fraccionamiento de suero hiperinmune anti veneno de coral **47**
7.4. Determinación del título de anticuerpos específicos anti-veneno de coral **48**
7.5. Determinación de la potencia relativa de antisuero obtenido **49**
8. CONCLUSIONES **51**
9. BIBLIOGRAFIA **52**

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo	Definición
OMS	Organización mundial de la salud
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG_2	Isotipo : Inmunoglobulina G2
IgG_{2a},	ISotipo: Inmunoglobulina G2a
IgG_3,	Isotipo: Inmunoglobulina G3
IgG_4	Isotipo: Inmunoglobulina G4
kDa	kilodaltons
CL	Cadenas livianas
CP	Cadenas pesadas
PH	Potencial de hidrogeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS- PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
TEMED	N,N,N´,N´-tetrametilentilendiamina.
DL_{50}	Dosis letal 50
DE_{50}	Dosis efectiva 50
IP	Intraperitoneal
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amonio
rpm	Revoluciones por minuto
µl	Microlitros
ml	Mililitros
v	Voltios

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura N° 1. Cinética del desarrollo de la respuesta inmunológica en animal inmuno-competente frente a la inmunización contra el tiempo y participación de mediadores hormonales asociados al desarrollo de la misma. **8**

Figura N° 2. Presentación de antígeno y desarrollo de la respuesta inmune en relación con la cascada de interleukinas en el desarrollo de la respuesta celular y humoral. **9**

Figura 3. Distribución de la proporción de los diferentes tipos de anticuerpos tipo IgG en suero de animal. En el eje Y se expresa el % y sobre el eje X el tipo de anticuerpo IgG. **11**

Figura 4. Diagrama explicativo del fraccionamiento de proteínas del plasma utilizando el protocolo de Cohn. **19**

Figura 5. Análisis del perfil de proteínas por SDS-PAGE de plasma de equino. **36**

Figura 6. Doble Inmunodifusión de Ouchterlony. **38**

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Propiedades biológicas de anticuerpos IgG 12

Tabla 2. Preparaciones de gamaglobulina autorizadas en inmunización pasiva 14

Tabla 3. Comparación entre diferentes métodos de precipitación. 21

Tabla 4. Bacterias a asociadas a productos derivados de sangre 22

Tabla 5. Virus asociados a contaminación de productos derivados de sangre 22

Tabla 6. Identificación de los venenos de coral. 27

Tabla 7. Esquema de inmunización de equinos (protocolo propuesto). 30

Tabla 8. Determinación de dosis letal 50 (DL_{50}) en ratones, para mezcla de veneno de *Micrurus.* 33

Tabla 9. Calculo de la Dosis letal 50 34

Tabla 10. Dosis letal 50 34

Tabla 11. Determinación de proteína total en fracciones de plasma precipitadas con sulfato de amonio a diferente concentración por lectura a 280 nm. 37

Tabla 12. Titulo por ELISA de suero hiper- inmune equino anticoral D.O. vs Dilución de antisuero. 39

Tabla 12a. Titulo por ELISA de anticuerpos sueros hiperinmunes anti coral obtenidos precipitación salina. 41

Tabla 13. Ensayo de neutralización de toxina de veneno de coral frente a anticuerpos por ELISA 42

LISTA DE GRAFICAS

Pág.

Grafica 1. Cálculo de la DL_{50} del veneno de *Micrurus surinamensis, Micrurus isozonus*, *Micrurus medemii.* 34

Grafica 2. Título de anticuerpos antiveneno de coral por ELISA suero de equino. Densidad Óptica (OD a 620 nm) vs. Reciproco de la dilución de suero. 42

Grafica 3. Ensayo de neutralización de la reactividad de antisueros frente a Veneno de coral en dilución seriada por ELISA, mediante neutralización en solución. 43

Grafica 4. Ensayo de neutralización de la reactividad de fracciones de antisueros obtenidos por precipitación frente a veneno de coral en dilución seriada por ELISA, mediante neutralización en solución. 43

ABSTRACT

Human snake severe envenoming is a serious health problem all over the world and has a wide distribution in tropical regions with great forest areas, but also in some developed countries. In our country, was reported a total number of snakebite of 2737 in 2007 by the National Institute of Health. Envenoming may caused by not negligible number of different snake types. The function of snake venom is mainly help snake to immobilize and digest the victim, due to compounds present in the venom how enzymes and polypeptide toxins.

Snake envenoming treatment is done using antivenom prepared from animals like horses, donkeys or sheep hyper-inmunized against the snake venom and in some cases its use is restricted to particular geographical area given that specific toxic and enzymatic activities could differ with the geographic origin and age of specimens. Variability in venom proteins and enzymes between specimens have been widely documented and it is associated with ecological niche were they live.

Elapidae family snakes comprise coral species in about ane- third. Treatment coral envenoming with specific antivenom sera lead a slow victim recovery and larger antivenom volumes are needed, causing severe allergic reactions, serum sickness increasing risk for patients. At this point, is essential to improve antivenom quality and potency to diminish the adverse reactions. In this approach, we propose the establishment of alternative methodology to immunize animals including some modification in antigen preparation, dose injected and adyuvant to increase specific antibody concentration in serum and diminish total protein concentration in antivenom preparation for rapid and more effective recovery of the victim with minimal side effects.

Our result show clearly that: (i) increase venom dose do not improve significantly specific antibody concentration in serum of immunized animals, (ii) frecuency and antigen preparation procedure are the most important parameters to improve specific antibody concentration, (iii) choice of sera fractionating method and its application are decisive parameters in antibody high quality, (iv) under our laboratory experimental conditions, antivenom potency of the sera tested was about 3 times higher than this display for reference antivenom SAAC- 006 (v) In our model, ELISA method was compared with in vivo method currently used to establish the DL50 by specific antibody neutralization, showing be a good alternative.

Key Words: coral snake venom, antivenom, purification, adyuvant, ELISA, neutralization.

RESUMEN

El envenenamiento severo de humanos con veneno de serpiente es un grave problema de salud pública alrededor del mundo, siendo más frecuente en países tropicales con áreas selváticas y algunos países desarrollados. En Colombia según reportes del Instituto Nacional de Salud, para el año 2007 fueron reportados 2.737 casos de mordedura por serpiente. El accidente ofídico es causado por un amplio número de serpientes. El veneno normalmente cumple dos funciones, la primera inmovilizar la presa y la segunda ayudar al proceso de digestión, ya que contiene tanto toxinas como enzimas.

El envenenamiento por serpiente es tratado con la utilización de sueros hiperinmunes preparados contra el veneno en equinos, ovejas y asnos; en algunos casos, su uso está restringido a ciertas zonas geográficas debido a que la composición química y enzimática del veneno varía de una región a otra y de la edad de la serpiente. La variación en la composición química del veneno de una especie de serpiente en particular ha sido ampliamente documentada y se encuentra asociada con el habitad de la serpiente.

Las serpientes de la familia *Elapidae* contienen diferentes especies de coral siendo estas 1/3 del total de serpientes en este grupo. El tratamiento de envenenamiento con veneno de coral, es tratado generalmente con el empleo de sueros hiperinmunes específicos que permiten lenta recuperación del paciente y son requeridas grandes cantidades, incrementando el número de reacciones alérgicas, enfermedad del suero, falla renal, etc. En este punto, es indispensable mejorar la calidad y potencia de los sueros hiperinmunes para disminuir la aparición de reacciones adversas. En esta aproximación, se formuló establecer una metodología alternativa para inmunizar animales, incluyendo algunas modificaciones en la preparación del antígeno, dosis utilizada y composición del adyuvante, con el fin de incrementar la concentración de anticuerpo específico en suero y disminuir la concentración de proteína total en la preparación por dosis para una más rápida, segura y efectiva recuperación del paciente, con mínimos efectos secundarios.

Nuestros resultados muestran claramente que: (i) incremento en la dosis no mejora significativamente la concentración de anticuerpos en suero de animales inmunizados, (ii) la frecuencia de inmunización y metodología para preparación del inoculo, son factores importantes para mejorar el título de anticuerpos, (iii) la selección del método de fraccionamiento y su aplicación son parámetros importantes en la calidad del anticuerpo (iv) bajo las condiciones experimentales, la potencia de los sueros hiperinmunes ensayados es aproximadamente 3 veces mayor a la observada para el suero antiofídico SAAC- 006, (v) en nuestro modelo, el método de ELISA fue comparado con el método in vivo utilizado corrientemente para cálculo de la DL_{50} con base en la neutralización de anticuerpos, mostrando ser una alternativa.

Palabras clave: veneno de coral, suero hiper inmune, adyuvante, purificación, ELISA, neutralización.

1. INTRODUCCIÓN

La demostración de la presencia de anticuerpos en el suero de animales infectados o inmunizados por el científico alemán von Behring, utilizados para tratamiento de la difteria en 1890, fue el inicio de la inmunoterapia con anticuerpos o inmunización pasiva. Desde entonces, la producción de sueros hiperinmunes ha sido una de las áreas de la inmunología de mayor interés para combatir enfermedades infecciosas y accidentes con venenos biológicos causados por mordedura de animales ponzoñosos principalmente serpientes y arácnidos (1).

La reacciones adversas, desestimuló la utilización los antisueros por casi cuarenta años, hasta la validación del método de fraccionamiento de proteínas séricas por Cohn en 1940 utilizando como agente de precipitación etanol para obtención de preparados de gammaglobulinas incrementando su pureza y calidad.

La utilización de preparados de anticuerpos en terapéutica ha sido una práctica extendida en farmacología para tratamiento de diversas patologías. En terapéutica existen varias preparaciones de gammaglobulinas dentro de las cuales las mas utilizadas son: (i) preparados de gammaglobulinas humanas de uso general para administración intramuscular e intravenosa, (ii) preparaciones de gammaglobulinas especiales con contenido de anticuerpos específicos (p.e antirrábica, antidiftérica, antitetánica, etc.), (iii) preparados hiperinmunes de gammaglobulinas animales (equinas, ovinas) para tratamiento de intoxicaciones y mordedura por serpientes y arácnidos (2,3).

1.2. Historia del Uso de Anticuerpos Terapéuticos

La relación entre salud, enfermedad y muerte han estado ligadas estrechamente desde el origen de la vida en nuestro planeta. Los datos históricos relatan la atención que los grandes filósofos (p.e. Aristoteles), prestaban a estos eventos y su relación con el efecto del aire sobre la salud. La cultura babilónica, por observación de la viruela en la población, aplicó vacunas orales a la población, preparadas a partir de lesiones de pacientes basados en la evidencia de que individuos que sobrevivían a la infección no desarrollaban por segunda vez la patología, lo que ponía de manifiesto la presencia de factores dentro del individuo que protegían contra la infección y reinfección.

En estas observaciones nace el estudio de la inmunología, basado en estudios desarrollados hacia el siglo XVII y XVIII por científicos de la época. Sewall, inmunizó aves con veneno de serpiente y demostró la respuesta de anticuerpos y el desarrollo de protección de estos animales frente al veneno en 1887. Esta observación motivó a otros investigadores a la investigación sobre los factores protectores de los componentes presentes en la sangre. Fue así como E. Roux y A. Yersin, demostraron que la sangre de un animal inmunizado con toxina diftérica, protegía al animal de experimentación retado con la toxina. Basados en estos resultados E. von Behring y S. Kitasato realizan experimentos de inmunización utilizando toxina diftérica y tetánica y confirman la transferencia de la inmunidad pasiva en animales contra estas dos toxinas. De esta forma se da inicio a la era de la inmunoterapia.

El desarrollo de la inmunoterapia en preparación de antivenenos, fue abordado por otros investigadores dentro de los que podemos citar Phisalix, Bertand y Calmete, quienes trabajando por separado en Estados Unidos y Asia desarrollaron los primeros sueros antiveneno de serpientes. Los protocolos desarrollados por Calmete en preparación de antisueros, fueron tomados por otros investigadores alrededor de mundo para la preparación de antisueros contra veneno de serpientes; dentro de estos investigadores se encontraron McFarland en 1899, Tidwell en 1902, Vital Brazil 1905, Ishizaka, 1907 e Isauro Venzor en 1927. (4,5)

1.3. Accidente ofídico

El envenenamiento por mordedura de serpiente es una patología mal tratada y diagnosticada, que afecta tanto áreas rurales de países tropicales en vías de desarrollo como desarrollados y cuyos reportes no son consistentes. Los reportes sobre accidente ofídico son variables y en algunas zonas del mundo no están disponibles, sin embargo los reportes anuales sobre ocurrencia de envenenamiento por mordedura de serpiente se encuentran alrededor de 2.5 millones de envenenamientos de los cuales se producen 150.000 muertes (11).

En países desarrollados como Estados Unidos, si bien la frecuencia del accidente por mordedura de ofidios es relativamente baja, se reportan anualmente alrededor de 8.000 casos de envenenamiento con una morbimortalidad importante (12)

El envenenamiento por mordedura de serpiente presenta sintomatología anómala y no predecible. Esta situación dificulta la instauración de tratamientos efectivos y toma de decisiones por parte del cuerpo médico. Por esta razón, el accidente ofídico requiere la hospitalización en unidades de cuidado intensivo y continua vigilancia del paciente por parte del equipo médico. Las manifestaciones clínicas del envenenamiento por toxinas de serpiente pueden incluir daño localizado de tejido, dolor, edema, equimosis, alteraciones del patrón de coagulación de la sangre, alteración de la conciencia, taquicardia, alteraciones respiratorias e hipotensión. Por tal razón, los pacientes con envenenamiento por mordedura de serpiente requieren cuidado intensivo, soporte cardio-respiratorio y la aplicación de sueros antiveneno (13).

1.4. Serpientes

Las serpientes son animales grandiosos que han sido admirados desde años atrás. Se cree que aparecieron en el periodo Cretácico inferior o periodo jurásico hace más de 200 millones de años, apareciendo las serpientes venenosas hace más de 30 millones de años. Existe una gran variedad de tamaños, algunas pueden medir algunos centímetros o se encuentran las boas que pueden crecer entre 2 a 4.6 metros dependiendo del ecosistema. Aunque las serpientes pueden variar en tamaño, hay algunas características típicas y constantes en todas las especies, entendiendo que no poseen extremidades, parpados, cintura escapular, esternón, pelvis, tienen cuerpos largos, flexibles y se ha dicho en la comunidad científica, que posiblemente su origen fue a partir de los lagartos.Las serpientes de las familias de las boas, pitones y anacondas se

han descrito como las más antiguas, seguidas por especies avanzadas como los Colúbridos que aparecieron en la época del Oligocéno hace 35-25 millones de años y que en la actualidad son conocidas como especies típicas (9, 14, 15).

Si bien existe una gran diversidad de especies, se puede decir que alrededor de las 3.200 especies en el mundo, al menos 1300 de estas serpientes son venenosas. Se encuentran ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales y han sido clasificadas en diferentes familias conocidas como: *Viperidae, Colubridae, Hidrophiidae, Atractaspididae y Elapidae (*16). Los Colubroideos comprenden familias como *Viperidae* con 30 géneros y 230 especies, *Elapidae* que la conforman 63 géneros y 272 especies de corales, mambas, cobras y similares, *Atractaspididae* con 14 géneros y 65 especies de serpientes y *Colubridae* con 290 géneros y 1700 especies aproximadamente (14).

1.4.1. Corales

Las corales pertenecen a la clase Reptilia, orden Squamata, suborden *serpente*, familia *Elapidae* y la conforman los siguientes géneros de serpientes: géneros *Calliophis, Sinomicrurus, Leptomicrurus, Maticora, Micrurus y Micruroides* (17).

El género *Micrurus* es común en el sur de Estados Unidos y Suramérica (18). En Colombia este género lo conforman 29 especies, que se distribuyen geográficamente hasta los 2.000 metros sobre el nivel del mar. Dentro de las especies más frecuentes están:

Micrurus alleni.
Micrurus ancoralis.
Micrurus clarki.
Micrurus dissoleucus.
Micrurus dumerilii.
Micrurus filiformis.
Micrurus hemprichii.
Micrurus isozonus.
Micrurus karlschmidti.
Micrurus langsdorffi.
Micrurus lemniscatus
Micrurus mipartitus
Micrurus medemi
Micrurus multiscutatus.
Micrurus narduccii.
Micrurus nigrocinctus.
Micrurus psyches.
Micrurus putumayensis.
Micrurus sangilensis.
Micrurus spixii.
Micrurus spurrelli.
Micrurus surinamensis.
Micrurus stewarti

Las serpientes corales o coralillos son comúnmente llamadas rabo de ají, coral mata ganado o cabeza de chocho. Poseen colores particulares de su piel, algunas tienen anillos rojos combinados con negro o amarillos con negro, con colmillos pequeños, no móviles ubicados en

la parte anterior del maxilar (15), no poseen foseta termoreceptora, característica de otras especies como *Bothrops, Crotalus, Lachesis y Botriechis* cuyos venenos actúan por mecanismos diferentes a las corales (19, 20 ,21, 22). El tamaño de las corales es variable; entre mediano y pequeño, se caracterizan por ser delgadas con una cabeza no diferenciable del cuerpo y con ojos puntiformes. Los orificios de mordedura son pequeños debido al tamaño de sus colmillos (3 mm. aproximadamente); su ataque es agresivo de forma fuerte, razón por la cual puede inocular una gran cantidad de veneno.

Las corales pueden ser confundidas con serpientes de la familia *Colubridae*, que muestran un patrón de coloración similar al de las corales con triadas. Estas ultimas se han clasificado dentro de los géneros *Simophis rhinostoma* y también *Simophis rohdei*, debido a que pierden algunas de las características típicas.

1.5. Veneno de serpiente

El veneno de serpiente es una mezcla compleja de proteínas con componentes enzimáticos y no enzimáticos, producido y localizado en glándulas especializadas. La actividad enzimática de los venenos de serpiente interfiere de forma variada con la fisiología normal del tejido, afectando notablemente la cascada de coagulación, la homeostasis normal del sistema, la capacidad para reparación de tejido, disminución del fibrinógeno y produciendo necrosis local (6,7). Si bien un veneno de serpiente puede contener variado número de proteínas, las principales actividades enzimáticas del veneno incluyen: serina proteasas, Zn métaloproteasas, L-amino oxidasas y fosfolipasas A2. Además, el veneno contiene proteínas constitutivas de tejido animal, en alta concentración que cooperan en la alteración de la fisiología normal del tejido. (8-10)

El veneno se las serpientes de la familia *Elapidae,* no ha sido totalmente estudiado pero se atribuye una variación de sus componentes, según la especie y el género. El veneno posee principalmente actividad neurotóxica pero dependiendo de la especie pueden contener otras toxinas con actividad cardiotoxica y citotóxica, miotoxinas, inhibidores de acetilcolinesterasa. Algunos venenos de coral pueden tener propiedades de bloqueo pre sináptico por la presencia de fosfolipasa A2 y debido a la variación de toxinas entre especies se han descrito variaciones en las características físicas de los venenos, existiendo unos incoloros, de color ámbar oscuro y viscosidad variable (14, 15,18, 24, 35).

1.5.1. Sintomatología del envenenamiento

Es dosis dependiente; el veneno es inoculado generalmente de forma subcutánea y su distribución inicia por vía linfática y sanguínea hasta llegar a las uniones neuromusculares. Los síntomas pueden desencadenarse después de 30 minutos o varias horas. Inicialmente se presenta dolor local, edema sin síntomas exacerbados de inflamación o hemorragias. Pasado el tiempo de latencia, inician lo síntomas como ptosis parpebral, oftalmoplejia, somnolencia, pérdida del equilibrio, vómito, mialgias, dificultad para deglutir por la parálisis del velo palatino, micción y defecación, alternado por disminución del ritmo respiratorio, parálisis muscular, dilatación de pupilas, apnea, insuficiencia o falla respiratoria la cual lleva a la muerte del envenenado después de unos minutos (14, 23).

1.5.2. Clasificación del envenenamiento

Debido a la acción del veneno Elapídico, se presentan síntomas como flacidez de músculos respiratorios y cardiacos ocasionando una falla cardio-respiratoria; por esta razón los casos deben ser considerados graves, ya que pueden inducir la muerte si no son tratados a tiempo. En concordancia con las directrices en salud en Colombia, cuando los síntomas del envenenado son visión borrosa, oftalmoplejía, sialorrea, disfagia y voz débil, la clasificación del accidente ofídico es moderada, si los síntomas son molestia en el sitio de la mordedura, seguido de una hemorragia no abundante el envenenamiento es considerado leve. (18,19).

1.5.3. Control y tratamiento

El Ministerio de la Protección Social en Colombia y la OMS ha dado recomendaciones a los agricultores y personal que trabaja o habita las zonas con alta prevalencia de Elápidos y de otras especies de serpientes venenosas; dentro de las normas de seguridad se aconseja: usar botas de caña alta, guantes para el manejo de la tierra y material vegetal lo que previene el 80% de los casos. Evitar acumular residuos y material vegetal, ya que esto incrementa la probabilidad de alojamiento de roedores que son el alimento de las serpientes. Es indiscutible que teniendo en cuenta las medidas de control que existen se evitan muchos casos de envenenamiento y las posibles muertes.

Para los casos de mordedura por serpientes del género coral, se debe realizar una clasificación de la severidad del envenenamiento, del tiempo transcurrido desde la mordedura y los síntomas, con el fin de seleccionar la terapéutica con el antisuero y en caso de no tener información suficiente realizar identificación del veneno por inmunoensayo (25, 26). Además se debe tener asistencia médica y evitar la manipulación de la mordedura con remedios caseros para evitar infecciones secundarias (24).

El tratamiento consiste en la administración del antisuero específico para neutralizar el veneno de coral, obtenido por inmunización de diferentes animales como los caballos, las ovejas, los burros y las cabras; los antisueros con contenido de gamaglobulina equina es el más empleado por presentar mejor compatibilidad con humanos en términos de sero-reacción; además, en equinos se observa una excelente respuesta inmunológica. Aunque los sueros equinos son los más utilizados al rededor del mundo para tratamiento del accidente ofídico, estos pueden inducir a las dosis terapéuticas un sin numero de reacciones adversas causadas por componentes propios del suero de caballo (27, 28, 29).

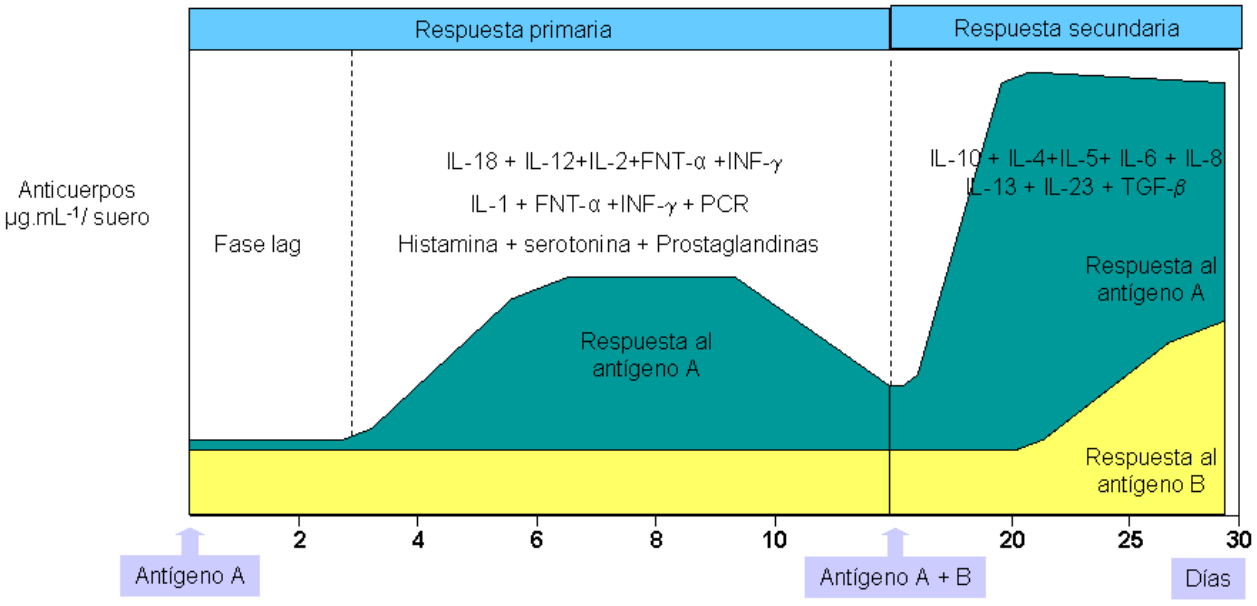
1.6. Generalidades de la Respuesta Inmune

El sistema inmune está compuesto por células efectoras y moléculas solubles que participan en el desarrollo de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida o adaptativa, según la cinética del proceso, la cual es dependiente del ingreso de un antígeno o patógeno agresor al organismo humano o animal.

La respuesta innata se desarrolla cuando las células fagocíticas o presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas o células epiteliales) reconocen el agente irritante por medio de receptores de tipo proteico presentes sobre su membrana (p.e. Toll Like Receptor -TLR). Estos receptores, reconocen y presentan los antígenos seleccionados a los linfocitos T (LT) a través de un grupo de receptores pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), proceso que permite que estos sean reconocidos como extraños y se desencadene la activación de la respuesta inmune adaptativa (30,31).

Otras de las células involucradas en la respuesta inmune innata son los polimorfonucleares (PMN) que son células que migran inicialmente al sitio de la lesión o invasión de un antígeno, se caracterizan porque poseen un núcleo multilobulado y gránulos en su citoplasma que contienen diferentes enzimas y ayudan a combatir al antígeno o agente infeccioso.

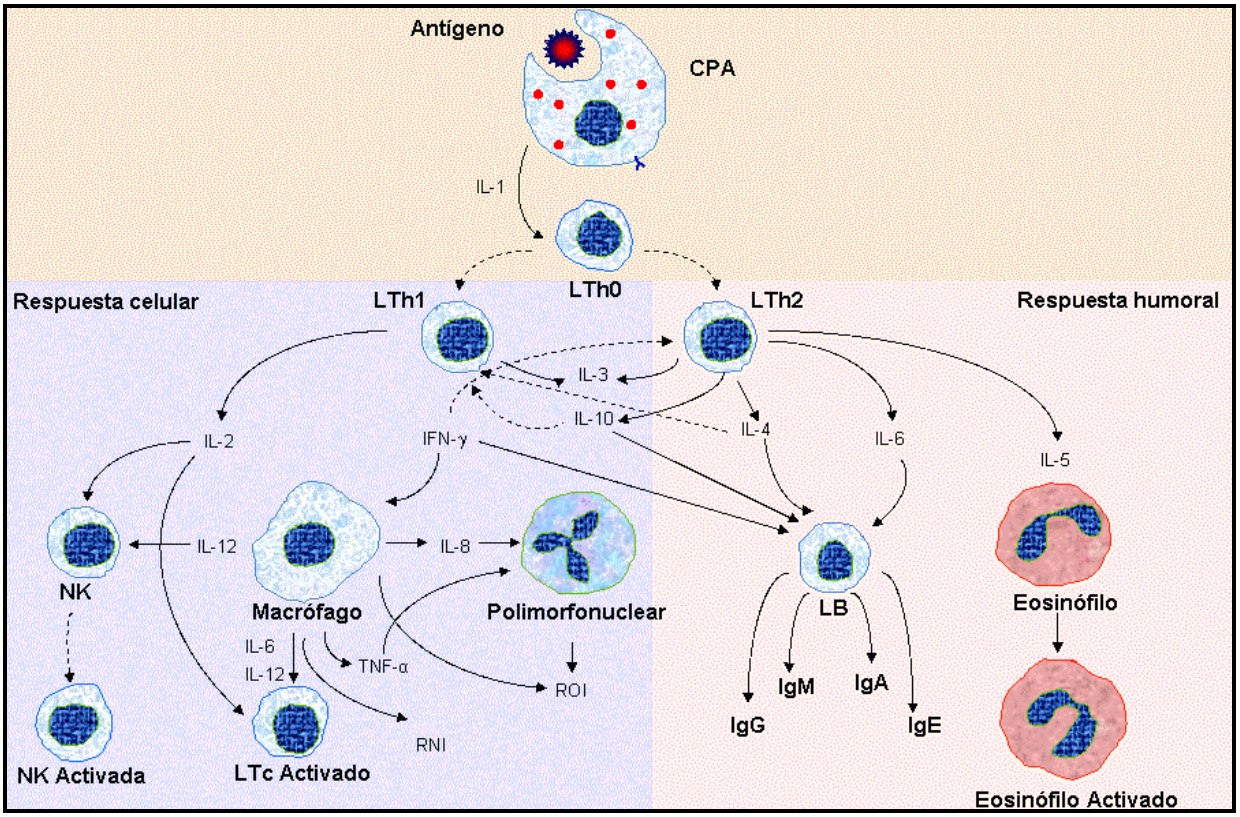
Uno de los mecanismos de inmunidad innata importante para inducir la respuesta inmune en el huésped, es la activación del sistema del complemento. Este sistema esta compuesto por una variedad de proteínas presentes en el plasma las cuales al unirse al patógeno y/o antígeno, en el caso de la vía alterna, ayudan a la opzonización y eliminación de este, o al unirse a anticuerpos en el caso de la vía clásica permite que se reconozca la fracción C3 por los receptores de las células B (CD21-CD35). La célula B o linfocito B (LB) puede reconocer directamente los antígenos agresores, esta célula se encuentran en baja proporción, por lo que es necesario que sea activada. Una vez la célula B ha realizado el reconocimiento del antígeno se diferenciará o madurará a célula plasmática (plasmocitos), quien es la responsable de la producción de los anticuerpos, glicoproteínas plasmáticas que neutralizarán y ayudaran a la eliminación del patógeno o antígeno agresor. Los anticuerpos son secretados en circulación y en fluidos de la mucosa por las células B (plasmocitos) y son los responsables de mediar la eliminación de patógenos o toxinas presentes en la sangre o en los órganos del tracto gastrointestinal o respiratorio (30,31). La figura 1, describe la cinética de activación de la respuesta inmune.



(Crosby M.J, et al. 2012)

Figura N° 1. Cinética del desarrollo de la respuesta inmunológica en animal inmuno-competente frente a la inmunización contra el tiempo y participación de mediadores hormonales asociados al desarrollo de la misma.

La expresión y secreción de citoquinas y quemoquinas, es un mecanismo que facilita la señalización y la activación de células presentadoras de antígenos, Linfocitos T (LT) y Linfocitos B (LB); este proceso tiene por objeto activar la proliferación celular, expansión clonal y desarrollo de la memoria inmunológica, que se requiere para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa específica para controlar al agente inductor (patógeno o antígeno). Dependiendo de la naturaleza del antígeno y del tipo de citoquina o quemoquina secretada, la respuesta inmune puede optar por una respuesta celular o tipo Th1, la cual es estimulada por citoquinas como interleuquina 18 y 12 (IL-18 y IL-12), interferón gamma (INF-γ) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) que son mediadores solubles presentes en la respuesta inmune de tipo pro- inflamatorio. De otra parte, si es expresada en forma dominante la interleuquina 10 (IL-10), IL-4, citoquinas antagonistas de IL-12 e INF-γ, la respuesta dominante será de tipo Th2, mediada por la producción de anticuerpos. Las figuras 1 y 2 describen las generalidades del proceso de instauración de una respuesta inmune, frente a un antígeno específico y los mediadores solubles involucrados.



(Crosby M.J. et al. 2012)

Figura N° 2. Presentación de antígeno y desarrollo de la respuesta inmune en relación con la cascada de interleukinas en el desarrollo de la respuesta celular y humoral.

1.6.1. Productos Derivados de Sangre

En terapéutica y clínica, la sangre puede ser utilizada de varias formas: (i) transfusión y (ii) componentes proteicos de la misma. Los productos derivados de sangre pueden ser clasificados en dos grupos, dependiendo del numero de individuos del cual sean preparados: (i) productos provenientes de un grupo pequeño de donantes (>20) con una sola donación (congelados de plasma y crioprecipitados) que son utilizados para transfusiones y (ii) producción industrial a partir de un grupo grande de donantes (>2.000) utilizados para preparación de medicina y excipientes como soluciones de proteínas plasmáticas y albúmina, inmunoglobulinas, factores de coagulación y antiproteasas.

1.6.2. Antisueros

Las gammaglobulinas o anticuerpos son un grupo de glicoproteinas solubles producidas por linfocitos B (LB) vía estimulación del sistema inmune por un antígeno, las cuales hacen parte del plasma con propiedades bioquímicas altamente especializadas, que confieren inmunidad humoral a los animales vertebrados. Químicamente, están compuestas por un 82 – 96% de aminoácidos y un 4 – 18% de carbohidratos. El sistema inmune sintetiza varios tipos de anticuerpos durante la estimulación de la respuesta inmune, dentro de los cuales se encuentran las IgG, IgM, IgA, IgD e IgE; cada anticuerpo desempeña una función específica en la protección del animal frente a un patógeno o antígeno. Los anticuerpos de mayor concentración en plasma son las IgG, anticuerpos sobre los cuales recae la mayor parte de la defensa frente al antígeno y la resolución de la enfermedad o patología, sea cual fuere. Dentro de los anticuerpos IgG encontramos cuatro isotipos (IgG_2, IgG_{2a}, IgG_3, IgG_4) (37-40), la figura N°3 muestra la proporción de los diferentes tipos de IgG en suero de animal.

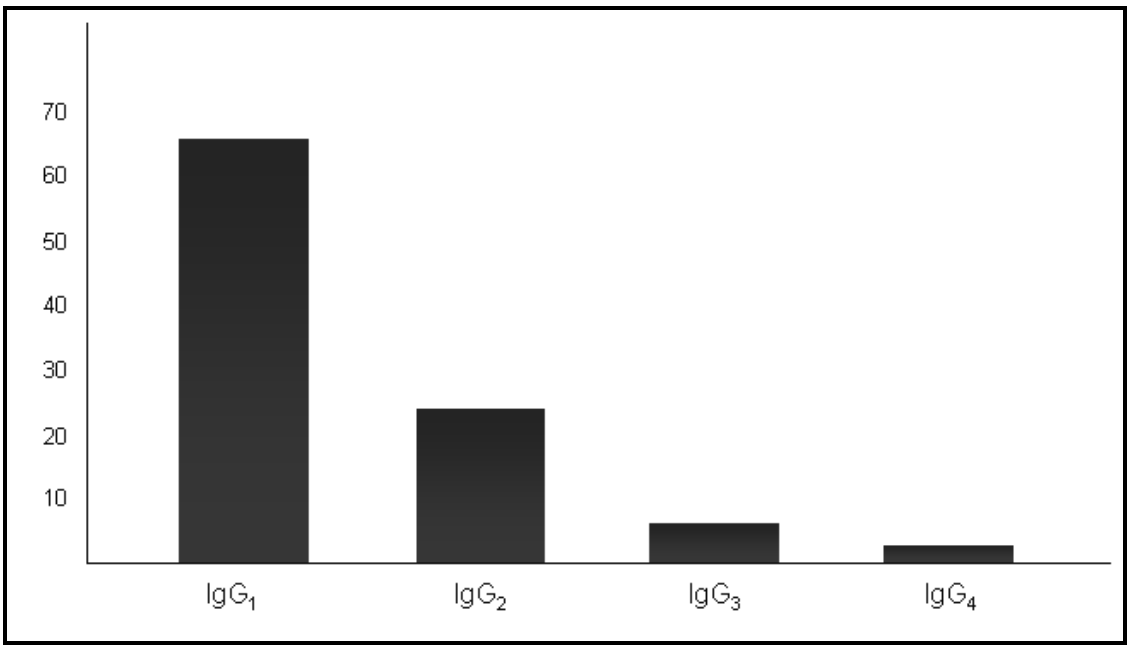


Figura 3. Distribución de la proporción de los diferentes tipos de anticuerpos tipo IgG en suero de animal. En el eje Y se expresa el % y sobre el eje X el tipo de anticuerpo IgG.

La masa molecular promedio de un anticuerpo tipo IgG oscila entre 145 -150 kilodaltons (kDa) y está conformado por cuatro cadenas polipeptídicas, dos polipéptidos de 24-25 kDa denominados cadenas livianas (CL) y dos de 57 kDa denominados cadena pesada (CP). Estos se agrupan en dímeros, formando dos parejas CL-CP para conformar los sitios de unión al antígeno o paratopes; la asociación entre las cadenas CL-CP es estabilizada por la formación de puentes disulfuro.

1.6.3. Propiedades biológicas

Las propiedades biológicas de las gammaglobulinas pueden ser clasificadas por las reacciones de la región variable (Fab), que contiene el sitio de unión al antígeno (función primaria) y las reacciones de la región constante, que contiene la porción de carbohidratos FC (función secundaria).

La concentración de cada gamaglobulina en el suero de animales sanos depende en parte del número de células plasmáticas que producen cada gammaglobulina en particular, la velocidad de síntesis, degradación e intercambio entre líquido intravascular y extravascular. Un animal

adulto posee alta concentración de IgG1 (5 – 2 mg/mL), seguida por IgG2 (2 – 6 mg/mL), IgA1 (0.5 – 2 mg/mL), IgM (0.5 – 1.5 mg/mL), IgG3 (0.5 – 1.0 mg/mL), IgG4 (0.2 - 1.0 mg/mL), IgA2 (0 - 0.2 mg/mL), IgD (0 - 0.4 mg/mL). La concentración de IgG de un individuo a otro parece estar asociada con el alotipo Gm (41), lo que esta correlacionado con la concentración del pool de subclases IgG en suero (41, 42). La tabla 1, describe las principales propiedades y funciones de los diferentes tipos de las gammaglobulinas.

Tabla 1
Propiedades biológicas de anticuerpos IgG

Propiedad	Subclase de Anticuerpo			
	IgG_1	IgG_2	IgG_3	IgG_4
Proporción de Ac en animal adulto	60.3 -71.5	19.4 - 31.0	5.0 - 8.4	0.7 - 4.2
Diferencia de concentración en suero (mg/mL)	8	4	0.8	0.4
Concentración normal en suero (mg/mL)	5 - 12	2 – 6	0.5 - 1	0.2 – 1
Distribución de subclases en LB circulantes %	40	48	8	1
Distribución de subclases en LB, medula, bazo y amígdalas	64	26	8	1
Tiempo de vida media	21-23	20-23	7-8	21-23
Transporte a través de placenta	++	+	++	++
Fijación de complemento	++	+	++	–
Respuesta frente a:				
Proteínas	++	+/–	++	+/–
Polisacáridos	+	++	–	–
Alergenos	+	–	–	++
Reacciones no inmunológicas				
Proteína A estaphyloccocal	+	+	–	+
Factor de fibrosis quistica	+	+	–	–
Factor reumático	+	+	–	–
Unión a proteína A	++	++	ND	++
Unión a proteína A	++	++	++	++

Anderson, C.L., and Looney, R.J. 1986. Human leukocyte IgG Fc receptors. Immunol. **7**, 264 (73).

1.6.4. Usos terapéuticos de las gammaglobulinas

En clínica existen tres preparados farmacéuticos con la misma aplicación: antibióticos, vacunas y antisueros, los tres, con utilidad en tratamiento de infecciones principalmente. A diferencia de otros medicamentos, estos tres grupos tienen indicaciones tanto de tipo profiláctico como terapéutico en infectología. La utilidad terapéutica de los anticuerpos se inicia en el siglo pasado, siendo aplicada al tratamiento de la difteria y el tétano, patologías infecciosas de alta incidencia y mortalidad.

1.6.5. Inmunización pasiva

A diferencia de la inmunidad activa, que induce memoria inmunológica y protección por largos periodos de tiempo, la inmunidad pasiva hace referencia a la transferencia de anticuerpos de un individuo a otro para conferir protección por cortos periodos contra un agente infeccioso o veneno.

La inmunización pasiva no siempre es efectiva; la duración puede variar entre una a seis semanas y fuertes reacciones indeseables pueden desarrollarse si la preparación no es de origen humano. Las gammaglobulinas deben ser aplicadas solo en los casos indicados y posteriores a un test de hipersensibilidad del paciente. Cualquier patología preexistente debe ser notificada al médico y sobre todo alergias a medicamentos, asma o rinitis, las cuales pueden exacerbar las reacciones adversas. La tabla 2, describe las preparaciones de gammaglobulinas utilizadas en terapéutica, indicando el animal de procedencia y la patología para la cual está indicada.

1.7. Obtención de gammaglobulinas

Debido a su origen, los productos biológicos como los antisueros deben ser sometidos a un estricto control de calidad, para garantizar su inocuidad en pacientes (29). Dentro de los parámetros que deben ser tenidos en cuenta para la fabricación de este tipo productos podemos citar: (i) poseer protocolos estandarizados de operación, (ii) documentación para trazabilidad de donantes (fecha, procedimientos analíticos, historia clínica etc), (iii) especificaciones para el origen de las muestras, (iv) control de marcación, almacenamiento y transporte de muestras y (v) establecer auditorias de calidad.

Tabla 2
Preparaciones de gammaglobulinas autorizadas en inmunización pasiva

Producto	Nombre de Marca	Uso
Inmunoglobulinas humanas séricas	HISG, Gammaglobulina, IVIG, IGIV	Tratamiento de inmunodeficiencias, púrpura de trombocitopenica autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad inflamatoria.
Gammaglobulinas intramusculares	ISG, IG, HISG	Tratamiento de inmunodeficiencia, prevención de hepatitis A y sarampión.
Gammaglobulinas especiales		
Inmunoglobulina anti-VHB	HBIG	Prevención y tratamiento de hepatitis B
Inmunoglobulina anti-varicela zoster	VZIG	Prevención y tratamiento de la varicela
Inmunoglobulina anti-Rábica	RIG	Prevención y tratamiento de la rabia
Inmunoglobulina anti-tetánica	TIG	Prevención y tratamiento del tétanos
Inmunoglobulina anti-varicela	VIG	Prevención y tratamiento de varicela
Gammaglobulinas animales		
Anti-toxina tetánica	TAT	Prevención y tratamiento de tétanos
Anti-toxina difteria	DAT	Prevención y tratamiento de la difteria
Anti-toxina botulínica		Prevención y tratamiento del botulismo
Anti-veneno de crotalido polivalente		Tratamiento accidente ofídico
Anti-veneno de micrurus fulvius		Tratamiento mordedura de coral

(65) Feasby, T., et al. 2007/ (68) Hammarstrom 1990/ (69) Sawyer, L. A 2000

Dentro de los riesgos inherentes a la producción de antisueros, debido al protocolo de aislamiento y purificación de los anticuerpos, debe ser puesta especial en consideración durante los diferentes pasos del proceso a: (i) contaminación microbiana y acumulación de pirógenos, (ii) contaminación viral, (iii) introducción de sustancias químicas durante su purificación por cromatografías (solventes, enzimas, detergentes), (iv) métodos de producción que pueden alterar la estructura de las proteínas séricas induciendo la formación de neoantígenos o activando factores de coagulación.

1.8. Métodos de Purificación de Gammaglobulinas

1.8.1. Fraccionamiento y purificación de anticuerpos

Los métodos de fraccionamiento se basan en la solubilidad diferencial de las proteínas plasmáticas en relación con el pH, la temperatura, concentración de proteínas, constante dieléctrica y fuerza iónica.

Métodos físico-químicos como la crio precipitación son utilizados de rutina para la obtención de factor de coagulación VIII. La precipitación y adsorción son útiles para obtención de otros factores de coagulación y cromatografía para inactivación y eliminación de agentes virales. El plasma crióprecipitado es utilizado para obtención de albúmina y gammaglobulinas.

Tanto los métodos físicos como químicos, son utilizados de preferencia para obtención de albúmina y gammaglobulinas. La precipitación con alcohol, método de Cohn, es el procedimiento más empleado por la industria farmacéutica. Para la aplicación de este método de fraccionamiento de proteínas séricas, es requerido determinar la concentración de proteína, pH del plasma, temperatura y fuerza iónica para una optima eficiencia. Además, métodos cromatográficos como filtración en gel, intercambio iónico y afinidad son utilizados para diversos componentes de origen proteico presentes en plasma (54, 55).

1.8.2. Precipitación

La precipitación de proteínas es un fenómeno que ha sido observado durante cientos de años. Las proteínas pueden ser precipitadas por perturbaciones creadas en su medio ambiente (cambios de pH, temperatura, etc.).

Las proteínas son definidas como moléculas de alto peso molecular, estructura, propiedades eléctricas y composición de aminoácidos definida. Forman soluciones verdaderas cuando se comparan con las dispersiones coloidales. Algunas de las propiedades más relevantes de las proteínas pueden ser resumidas así:

- Son polielectrolitos de PM mayor de 10.000 daltons, con una variedad extensa de cargas sobre su molécula.

- La solubilidad depende de la interacción con el solvente.
- La concentración de la proteína es un factor crítico.

Más que purificar anticuerpos con el empleo de esta técnica, lo que se consigue es concentrar la muestra, reduciendo su volumen. En algunos casos, dependiendo de la concentración final del agente de precipitación, se consigue retirar parte de las proteínas contaminantes, pero esto conlleva también a perdida de parte del anticuerpo. Esta técnica puede ser empleada como paso inicial de purificación. Sin embargo algunos anticuerpos pueden sufrir denaturación durante la precipitación; de ser posible este paso debe ser omitido o utilizado con cuidado (53). Las técnicas más ampliamente usadas para fraccionamiento de proteínas son: fraccionamiento salino, fraccionamiento con solventes orgánicos, fraccionamiento con polietilenglicol.

1.8.3. Fraccionamiento Salino

La mayoría de las interacciones entre la cadena polipeptídica de una proteína, que la mantienen en una conformación estable de mínima energía son: ion-ion, ion-dipolo, dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas. La superficie exterior de las proteínas interactúa con el solvente mediante las cadenas laterales de los aminoácidos polares y ácidos, los que están distribuidos apropiadamente en la cadena polipeptídica (54, 55).

Las perturbaciones producidas por la interacción proteína-solvente pueden producir transiciones en la estructura nativa de la proteína, por alteración de todas las interacciones químicas originales, creando unas nuevas. Por esta razón, las sales en concentración y fuerza iónica superior a la del medio tisular producen precipitación de proteínas.

La precipitación ocurre por: neutralización de cargas en la superficie de la proteína; disminución de la actividad química de la proteína y por disminución de la concentración efectiva de agua. La concentración de cualquier sal, necesaria para producir precipitación de una proteína en particular, esta relacionada con: número y distribución de cargas; número de grupos no iónicos e hidrofóbicos; forma y tamaño de la proteína.

Un gran número de sales inorgánicas pueden ser utilizadas para realizar solubilización, precipitación o fraccionamiento de proteínas de una manera diferencial. Las más útiles incluyen:

NaCl	Saturación a 20ºC, 5.33 M.
Na_2SO_4	Saturación a 20ºC, 1.88 M.
$(NH_4)_2SO_4$	Saturación a 4ºC, 4.00 M.

El sulfato de sodio no es una buena alternativa para precipitación por "Salting-Out", debido a su baja solubilidad; además, todos los pasos de precipitación utilizando esta sal, deben ser efectuados a Temperatura de Cuarto (TC), con lo que el grado de denaturación de las proteínas aumenta. La sal más empleada hasta el momento para efectuar fraccionamiento salino es el sulfato de amonio (56). Sus mayores ventajas son:

- La saturación es de suficiente molaridad para producir precipitación de la mayoría de proteínas.
- No tiene calor de solución alto, así el calor generado es disipado fácilmente.

- A la concentración de saturación (4.04 M), la solución tiene una densidad de 1,235 g/mL, la que no interfiere con la sedimentación de muchos precipitados de proteínas por centrifugación.
- La solución saturada previene la contaminación bacteriana.

- En solución, protege a muchas proteínas de la denaturación.

Esta última propiedad es muy útil en la preservación de proteínas purificadas, ya que pueden ser mantenidas en suspensión en soluciones saturadas de sulfato de amonio.

Para poder emplear el método de fraccionamiento salino, este debe ser estandarizado con anterioridad y ser además reproducible. Las condiciones del proceso que deben ser monitoreadas y registradas son: volumen de la solución, concentración de proteínas, valor de pH, temperatura, velocidad de centrifugación y tiempo empleado en cada paso.

1.8.4. Fraccionamiento con Solventes

Los solventes orgánicos han sido utilizados en algunos casos para fraccionamiento de proteínas. Los solventes actúan modificando la constante dieléctrica de la solución, lo que produce disminución en el grado de solvatación de la proteína.

Los solventes orgánicos más ampliamente usados en este tipo de técnicas son: acetona, metanol, etanol, butanol; todos miscibles en agua. Estos solventes al interactuar con el agua producen un pequeño aumento de temperatura de la solución, produciendo además una contracción de volumen en aproximadamente un 4 - 5%. Todos estos solventes tienden a denaturar proteínas, especialmente a temperaturas superiores a 0ºC.

La ventaja de esta técnica radica en poder efectuar fraccionamiento selectivo de cada una de las proteínas de una mezcla compleja, debido a la diferencia de solubilidades que pueden presentar las proteínas en el punto isoeléctrico. La adición de un solvente orgánico, disminuye la solubilidad de la proteína y produce la precipitación. Generalmente, a mayor diferencia entre el punto isoeléctrico del solvente y la proteína, mayor cantidad de solvente se requerirá para producir la precipitación.

Algunas de las condiciones indispensables para la utilización de esta metodología son: concentración de la proteína este entre 5 - 30 mg/ml; pH de la solución reguladora este al rededor de 7.0; la fuerza iónica sea similar a la encontrada en condiciones fisiológicas (150 mM en cloruro de sodio), y que los recipientes sean de vidrio, para facilitar la conducción de calor. La figura 4 describe el proceso de fraccionamiento de proteínas plasmáticas.

Una vez se haya adicionado todo el solvente, se deja reposar la mezcla para que alcance el equilibrio y se centrífuga a 5.000 g, por 15 min. El pellet puede ser separado y almacenado a –70ºC, hasta que vaya a ser procesado. Para procesos de purificación posteriores es necesario en algunos casos, retirar el solvente; para esto se coloca la muestra en una cámara de vació convencional o en un liofilizador (56-57).

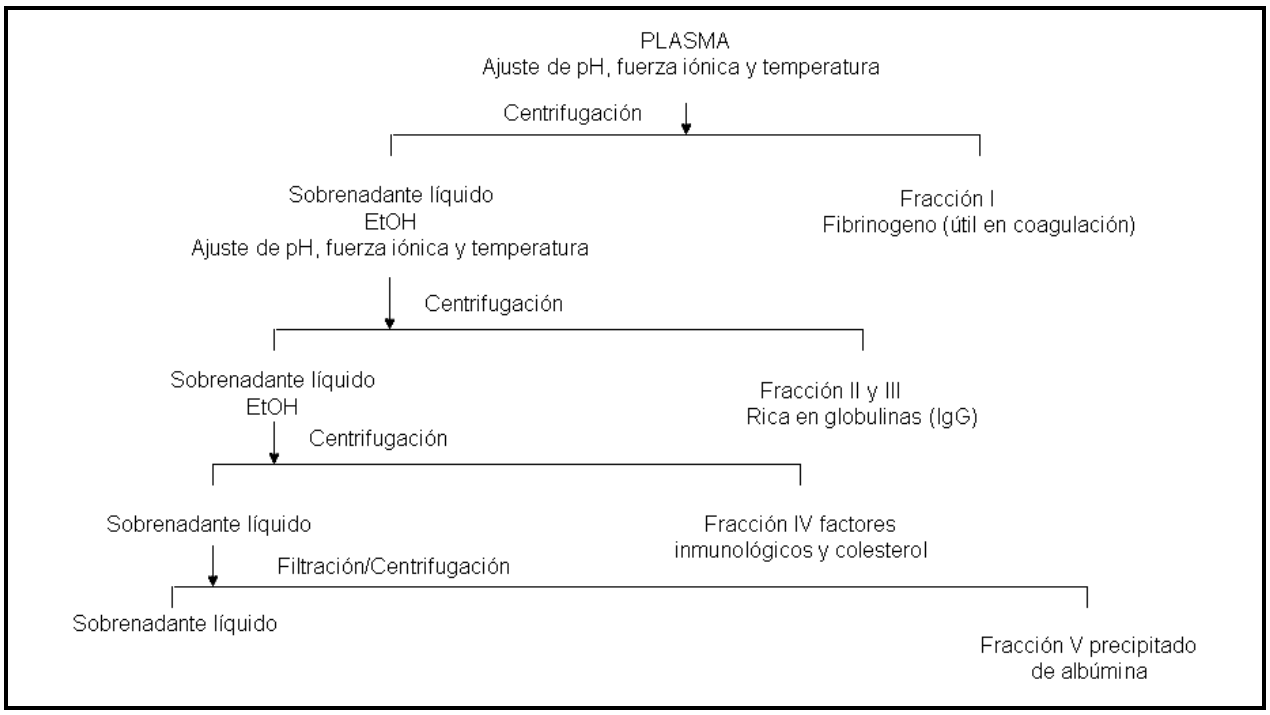


Figura 4. Diagrama explicativo del fraccionamiento de proteínas del plasma utilizando el protocolo de Cohn-Oncley.

1.8.5. Fraccionamiento por cambio en el pH

Este método es empleado para fraccionamiento selectivo de proteínas, variando el pH hasta alcanzar el pI de la proteína de interés, en el cual la proteína es excluida de la solución. Uno de los inconvenientes de esta técnica es la alta probabilidad de producir denaturación de proteínas (57).

Para alcanzar los valores de pH deseados no deben emplearse ácidos o bases fuertes. Tris o Acido Acético, pueden emplearse para alcanzar pH en el rango de 5.0 a 8.5; para pH inferiores a 5.0, se debe emplear Acido láctico u otro ácido similar. Para pH superiores a 9.0 puede emplearse Trietanolamina o Carbonato de sodio para alcanzar pH de 10.5.

Cuando esta metodología va a ser utilizada por primera vez, deben efectuarse ensayos a nivel piloto para seleccionar las condiciones óptimas para precipitar la proteína de interés.

1.8.6. Fraccionamiento con PEG

El empleo de polímeros no iónicos para fraccionamiento de proteínas, fue introducido por Plosen en 1964, cuando empleo Polietilenglicol (PEG), para precipitar inmunoglobulinas presentes en el suero sanguíneo.

La ventaja que ofrece el empleo de PEG en el fraccionamiento de proteínas se debe en parte a la poca o nula reactividad química de este compuesto con las proteínas, siempre y cuando se encuentre dentro de ciertos límites de concentración con respecto a las proteínas en la mezcla.

El experimento de precipitación empleando PEG y proteínas purificadas, muestra que la solubilidad de la proteína disminuye en forma exponencial al ir aumentando la concentración de PEG, este tipo de precipitación es independiente del pH y fuerza iónica del medio, pero dependiente del peso molecular de la proteína y del PEG.

Ensayos efectuados utilizando PEG de diferente peso molecular, han mostrado que PEG de peso entre 4.000 - 6.000, no ofrecen ventajas en el fraccionamiento de proteínas, ya que las soluciones de estos polímeros poseen una viscosidad elevada y dificultan el proceso de sedimentación de las proteínas de la solución. Para algunas proteínas se ha observado que empleando PEG de peso molecular bajo, se obtiene una mejor eficiencia en la purificación.

Para calcular la concentración óptima de PEG en la precipitación de una proteína determinada en una mezcla compleja, se beben efectuar ensayos a nivel piloto, en los cuales se adiciona un volumen igual de PEG en diferentes concentraciones a la solución, hasta alcanzar una concentración entre 25 - 30%, el incremento pueden variar un 3% de tubo a tubo. Después de una hora de incubación, se centrífuga la mezcla y se determina la actividad de la proteína de interés en el sobrenadante; se elabora una gráfica de Concentración vs Actividad, con el fin de obtener los limites superior e inferior, para poder calcular la cantidad optima de PEG con la que se obtiene la máxima cantidad de la proteína de interés (58-62).

Tabla 3
COMPARACION ENTRE DIFERENTES METODOS DE PRECIPITACION

Método	Costo	Grado Denaturación	Tiempo Hr.	% Pureza De IgG
$(NH_4)_2SO_4$	Económico	Intermedio	50.5 *	40 +/- 5
Na_2SO_4	Económico	Alto	50.5 *	30 +/- 4
Etanol	Costoso	Alto	6.5	60 +/- 4
PEG	Costoso	Intermedio	52.0 *	45 +/- 5

* Incluye tiempo de diálisis. Journal of Immunological Methods (1984).

1.8.7. Cromatografía

La cromatografía ha sido el método más ampliamente utilizado para la purificación de proteínas en general y por consiguiente de anticuerpos. Sin embargo, mientras no se tenga esta técnica bien estandarizada, no es un buen método para purificación de anticuerpos, ya que no permite garantizar todos los parámetros de pureza.

En general, los métodos de fraccionamiento y purificación de anticuerpos están especificados para reducir y eliminar la contaminación por patógenos indeseables y nocivos para el individuo sometido a tratamiento con este tipo de productos (57, 63).

1.9. Inactivación viral

En todo proceso de fraccionamiento de proteínas séricas, el material de partida debe ser sometido a un proceso que garantice la eliminación o inactivación de agentes infecciosos preferencialmente virus. Para esto, el material de partida debe ser sometido a: (i) calentamiento en baño maría a 60ºC durante 10-12 horas, (ii) utilización de solventes como el tri n-butil fosfato

(TNBP) (iii) detergentes no iónicos detergentes Triton X100, Tween 80y (iv) reducción del pH a un valor cercano a 4.

Las Tablas 4 y 5, describen los patógenos asociados comúnmente a los animales utilizados en la obtención de sueros hiper-inmunes y la fracción de plasma en la que pueden ser detectados (64, 66)

Tabla 4. Bacterias a asociadas a productos derivados de sangre

Agente infeccioso	Componente celular de la sangre	Plasma	Producto del plasma
BACTERIA			
Spiroqueta	+	–	–
Parasito		–	–
Babesia microri	+	–	–
Plasmodium	+	–	–
Leishmania	+	–	–
Tripanosoma	+	–	–
Rickettsiae	+	–	–
Brucella	+	–	–
Chamydiae	+	–	–
CJD	–	–	–
CJD - Creutzfeldt–Jakob disease			

Tabla 5. Virus asociados a contaminación de productos derivados de sangre

Agente infeccioso	Componente celular de la sangre	Plasma	Producto del plasma
VIRUS			
HIV I/II	+	+	+
HBV	+	+	+
HCV	+	+	+
HDV	+	+	+
HAV	+	+	+
HEV	+	+	+
HGV	+	+	+
Parvovirus B19	+	+	+
HTLV I/II	+	–	–
Citomegalovirus	+	–	–
WNV	+	+/–	–
EBV	+	–	–
HHV-8	+/–	–	–
HIV- Human immunodeficiency virus; **HBV** – Hepatitis B virus; **HCV** – Hepatitis C virus; **HDV** – Hepatitis D virus; **HAV**- Hepatitis A virus; **HEV** – Hepatitis E virus; **HGV** – Hepatitis G virus; **HTLV** – Human Limphocyte T virus; **WNV** - West Nile virus; **EBV** – Epstein barr virus**; HHV-8** – Human herpes virus 8			

Los requisitos mínimos para realizar un proceso de obtención de un preparado de gammaglobulinas enriquecidas en anticuerpos específicos (suero hiperinmune), se listan a continuación (66,67).

(i) Selección del antígeno de interés.
(ii) Determinación de la pureza del antígeno por métodos inmuno-electroforéticos.
(iii) Selección de la concentración del antígeno.
(iv) Selección del adyuvante.
(v) Selección de la ruta y número de inmunizaciones.
(vi) Selección de los métodos de valoración de la respuesta inmune humoral.
(vii) Selección del animal.

2. Planteamiento del Problema

Los accidentes ofídicos ocurren con frecuencia en los países ubicados en la región tropical selvática y en algunas regiones de países desarrollados con zonas desérticas como Estados Unidos. En zonas tropicales y subtropicales, afecta a más de 5.400.000 personas al año y causa envenenamiento en un número aproximado 2.682.500 casos. En Latinoamérica se reportan anualmente 150.000 casos y 5000 muertes a causa de este tipo de accidentes. Colombia es un país que por su ubicación geográfica y su gran diversidad de climas, posee al menos 272 tipos de especies de las 3000 existentes en el mundo y 49 de estas son venenosas; las especies reconocidas en nuestro país corresponden a las familias *Viperidae* siendo sus géneros *Bothrops*, *Crotalus y Lachesis,* de la familia *Elapidae* el género *Micrurus (coral o coralillos), la familia Pelamis,* serpiente acuática del pacífico y familia *Colubridae* con géneros como *Pylodryas* (lora), *Clelia* (cazadora negra) y *Erythrolamprus* (falsa coral) (1).

Los accidentes por mordeduras de serpientes no eran un evento de notificación obligatoria hasta el año 2004 en nuestro país y a partir de esta fecha se han dado reportes por el SIVIGILA donde las cifras se acercan a los 2.782 casos confirmados en el 2006 y 3424 casos para el 2009; los departamentos del Meta, Santander, Norte de Santander, Amazonía, Antioquia, Cesar, Casanare, Arauca, Huila, y Bolívar son los más afectados (19).

A pesar de la lucha por producir los antisueros por las entidades públicas y privadas la demanda es muy alta; se da la necesidad de importar los antisueros del Brasil, Costa Rica y el alcance de estos antisueros para las poblaciones ubicadas en zonas rurales es reducido, todo esto sumado a que los esquemas de producción difieren en todo el mundo, ya que existen variaciones fisiológicas en las serpientes y la composición del veneno dependiendo del ecosistema; por lo anterior es de vital importancia la producción del antisuero con especies de serpientes autóctonas de nuestro país.

Otra de las dificultades en el proceso de producción de los antisueros hiper-inmunes antiofídicos son los tiempos de obtención, las dosis múltiples que son requeridas para inmunizar los animales, el mantenimiento de la serpiente en cautiverio y la obtención de los títulos de anticuerpos que son establecidos por la normativa legal vigente en Colombia.

3. HIPOTESIS

Es posible desarrollar sueros hiper-inmunes de mejor calidad y potencia contra veneno de ofidio, mediante el protocolo de mezcla equi-molecular de antígeno y anticuerpo.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Establecer las condiciones de inmunización de caballos con veneno de serpiente, basado en la capacidad neutralizante de anticuerpos presentes en suero antiofídico, que disminuya la lesión local y garantice una mejor estimulación del sistema inmune observable en el incremento en la potencia de antisueros obtenido comparado con las metodologías clásicas de inmunización reportadas por la literatura.

4.1.1. ESPECIFICOS

1. Establecer la potencia de un antisuero anti-coral de referencia frente a un veneno de coral, calculando la DL50 en ratón.

2. Preparar la mezcla de antígeno-anticuerpo en concentraciones equi-moleculares e inmunizar ratones para verificar la inocuidad de la mezcla y la inducción de la respuesta inmune.

3. Inmunizar con sus respectivos refuerzos equinos con la mezcla antigénica en la proporción calculada en el objetivo 2 y recuperar los sueros.

4. Determinar la potencia de los antisueros obtenidos a partir de inmunización con la mezcla equimolecular antígeno-anticuerpo y un antisuero obtenido por métodos de inmunización convencional

5. Establecer las condiciones de fraccionamiento de proteína que permitan la obtención de anticuerpos con alto grado de pureza conservando la potencia del antisuero.

6. Determinar la potencia del suero hiper-inmune obtenido y purificado frente a su antígeno inductor.

7. Caracterizar la reactividad del suero hiper-inmune obtenido mediante la utilización de técnicas inmunoquímica (Ouchterlony y Westernblot).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los reactivos utilizados para el desarrollo del presente trabajo, fueron obtenidos por donación de laboratorios Merck: Sulfato de sodio, Sulfato de amonio, Fosfato monobásico de potasio y Fosfato dibásico de sodio (Merck), Archilamida (Merck), Tris base (Merck), polietileno glicol 6000 (Merck), SDS (Sodio dodecilsulfato) marca sigma, 4 cloro 1-naftol (Merck), ABTS (Hamersham), agarosa y TEMED N,N,N´,N´-tetrametilentilendiamina (Biorad), marcadores de peso molecular intermedio (sigma). Tanto el veneno de coral que corresponde a una mezcla de tres especies de coral y los antisueros de referencia fueron suministrados por Laboratorios Probiol.

5.2. Venenos

Los venenos suministrados por Laboratorios Probiol fueron obtenidos a través del serpentario de la Universidad de la Amazonía, quienes implementan métodos de ordeño manual para su adquisición a partir de especímenes adultos sanos de especies debidamente identificadas de *Micrurus surinamensis, Micrurus isozonus*, *Micrurus medemii*. El veneno fue pesado en balanza analítica y fue conservado a 4°C para garantizar su idoneidad. La mezcla de veneno fue preparada a partir de una proporción 1:1:1 de los tres. La especie de serpiente coral y proporción de mezcla de cada uno de los venenos se describe en la tabla 6.

Tabla 6. Identificación de los venenos de coral.

VENENOS			
Numero	Familia	Genero y Especie	Mezcla
1	Familia *Elapidae*	*Micrurus surinamensis*	Liquido de composición 1:1:1
2		*Micrurus medemi*	
3		*Micrurus isozonus*	

5.3. Antisueros

El antisuero de referencia utilizado para la prueba de potencia en ratones y para preparación de la mezcla equi-molecular fue donado por Laboratorios Probiol. Este antisuero liofilizado identificado como SAAC-006 contiene inmunoglobulinas específicas contra las especies de coral mencionadas en el aparte **5.2**. Los viales de cada antisuero fueron reconstituidos siguiendo las instrucciones del fabricante adicionando agua destilada estéril para inyección obtenida de laboratorios Quibi.

5.4. Animales

Ratones blancos, machos, de la cepa Swiss – Webster de 18 a 22 gramos, adquiridos al bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UN, fueron utilizados para determinación de la dosis letal 50 (DL_{50}) en concordancia con la norma OECD420 y determinación de potencia del antisuero equino de referencia (SAAC-006).

Los equinos utilizados para producción de sueros híper inmunes anti-coral, fueron cedidos por Laboratorio Probiol. Cuatro equinos entre cuatro y cinco años de edad, fueron sometidos a cuarentena y sometidos a ensayos de evaluación serológica y seguimiento clínico por un periodo de tres meses. Los animales fueron sometidos a tratamiento de desparasitación y vacunados de acuerdo la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (34). Los análisis de laboratorio fueron realizados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

5.5. Determinación de la DL_{50}

Diluciones seriadas de veneno de coral de acuerdo con intervalo reportado fueron preparadas siguiendo los delineamientos de trabajo previos (24). Los ratones se encontraban en un peso comprendido entre 18 - 22 gramos y se dividieron inicialmente en 5 grupos de 5 ratones para el desarrollo de la prueba. Los ratones colocados en sus respectivas cajas fueron después de aclimatados por 96 horas e inoculados vía intraperitoneal (IP) utilizando jeringas para insulina. 0.1 mL con cada dilución del veneno de coral y un grupo control inoculado con solución salina esteril; los ratones fueron observados a las 24, 48 y 72 horas con el objeto de determinar el intervalo de mortalidad minima generado por la mezcla de veneno de coral.

La determinación de la DL_{50} se implementó por análisis estadístico de regresión lineal donde la dosis estuvo en función del porcentaje de muerte de los ratones (dosis/mortalidad). El programa empleado fue el software estadístico GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, USA).

5.6. Ensayo de potencia o neutralización.

El ensayo de neutralización del veneno de *Micrurus surinamensis, Micrurus isozonus*, *Micrurus medemii* empleó el antisuero específico del lote SAAC 006. Siete grupos de 5 ratones con peso promedio de 18 - 22 gramos fueron alojados en jaulas con agua y alimento; estos fueron inoculados con dosis constante de veneno equivalente a la DL_{50} mezclados con cantidades variables del antiveneno, utilizando mezclas 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5, pre-incubadas por 1 hora a 37°C antes de ser inoculadas (20). El grupo control positivo fue inoculado con 100 µL de la solución de veneno y el grupo control negativo fue inoculado con solución salina estéril y alojados bajo las mismas condiciones.

La Dosis efectiva 90 (DE_{90}) se clasificó como la cantidad de antisuero que redujo el 90% del efecto letal del veneno en los animales inoculados o la cantidad de antisuero que protegió el 90% de los animales; este dato se utilizó para ejecutar el ensayo de neutralización del veneno con la mezcla equi-molecular Ag-Ac en relación 1:1 con el adyuvante diseñado.

5.7. Preparación de inoculo para inmunización

Las dosis empleadas para el desarrollo del inóculo en el protocolo propuesto de inmunización de los equinos, se obtuvo a partir de los datos obtenidos en los ensayos de dosis letal del veneno y ensayos potencia o neutralización del veneno de *Micrurus surinamensis, Micrurus isozonus*, *Micrurus medemii*. Para esto, la cantidad de veneno en miligramos fue neutralizada con la cantidad de antisuero correspondiente y mezclada en proporción 1:1 con el adyuvante diseñado para el protocolo en estudio, que consistió en una emulsión que contenía principalmente vitamina E.

5.8. Protocolo de inmunización de equinos

Se emplearon cuatro equinos para el desarrollo del presente trabajo, los cuales fueron divididos en dos grupos. Dos equinos fueron inoculados utilizado el protocolo establecido por laboratorios Probiol con su respectivo adyuvante a intervalos de tiempo de 7 días; los dos animales restantes, fueron inoculados con el protocolo propuesto utilizando la mezcla equi-molecular (antígeno-anticuerpo) y el adyuvante diseñado para tal fin. El esquema empleado para la inmunización de los equinos utilizando la metodología alternativa se describe en la tabla 7.

Tabla 7. Esquema de inmunización de equinos (protocolo propuesto).

Protocolo de inmunización propuesto	
DIA 0	Primera dosis
DIA 15	Segunda dosis
DIA 30	Tercera dosis
DIA 45	Cuarta dosis
DIA 52	Quinta dosis (Refuerzo)
DIA 60	SANGRÍA

5.9. Sangría de los equinos.

La sangría de los dos grupos de animales fue efectuada entre el día 7 y 10 posterior a la última inoculación, utilizando un equipo de venoclisis estéril y bolsas con anticoagulante (CDPA-1) estériles. Este proceso tuvo el apoyo de un equipo de tres veterinarios, dos auxiliares de amplia experiencia en el procedimiento, en instalaciones debidamente adecuadas para tal fin y utilizado las condiciones de asepsia apropiadas.

5.10. Separación del plasma

Las bolsas de sangre obtenidas de las sangrías y transportadas a 4ºC fueron centrifugadas a 4500 rpm por 30 minutos en centrífuga refrigerada. Una vez finalizada la centrifugación el plasma fue separado de los glóbulos rojos y polimorfonucleares por método manual, procedimiento convencional empleado en bancos de sangre para separación de dichas fracciones plasmáticas.

5.11. Fraccionamiento del plasma

Para tal efecto, se utilizaron 30 ml de plasma y se procedió a determinar la concentración de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ que permitió enriquecer en IgG. Para tal fin, se tomaron volúmenes iguales de plasma equino y acondicionadas a 4°C, se adicionó el agente precipitante a intervalos de concentración definidos 20, 25, 30, 35, 40 % de saturación y dejados durante 30 minutos hasta alcanzar el equilibrio de precipitación. Las fracciones obtenidas fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos y el pellet resultante fue pesado en balanza analítica para determinar la cantidad de proteína húmeda recuperada en cada una de las concentraciones de sal adicionadas; una vez se obtuvieron las fracciones se suspendieron en 1.5 mL de buffer fosfato pH 7.2. Posterior a esto se analizaron los precipitados por SDS-PAGE en gel de 12% y se evaluó la intensidad de las bandas de proteína de 57 KDa cadena pesada y 24 KDa correspondiente a cadena liviana para anticuerpos y 60 KDa albúmina (32,33).

5.12. Cuantificación de proteína total y evaluación de la pureza de IgG por SDS-PAGE (Electroforesis)

Para las fracciones de proteína obtenidas por precipitación con sales inorgánicas (Sulfato de amonio), la concentración de proteína total recuperada fue calculada utilizando lectura espectrofotométrica a 280 nm; el cálculo de proteína dada en miligramo por mililitro (mg/ml) se realizó con los datos de la lectura a 280 nm, aplicando los principios de la ley de Lamber y Beer. Para el estudio electroforético se adicionó 50 ug de proteína total de cada una de las muestras de anticuerpos obtenidas por fraccionamiento del plasma por la técnica de sulfato de amonio, PEG, Na_2SO_4 en geles de poliacrilamida al 12 % manejando un sistema de buffer de corrido de pH 9.2. Para realizar el corrido electroforético se aplico un voltaje de 80 y 130, al terminar el corrido los geles se marcaron y procedió a coloración con azul brillante de Coomasie, evidenciándose las bandas de anticuerpos esperadas correspondientes a la cadena pesada y liviana de anticuerpos en las diferentes muestras, también se observó el comportamiento del perfil electroforético de un suero equino completo y el perfil de los patrones de peso molecular de 14 – 97 kDa. (24).

5.13. Evaluación de la presencia de anticuerpos específicos (ouchterlony)

Las fracciones recuperadas y suspendidas en búfer fosfato, fueron utilizadas para determinar la presencia de anticuerpos específicos inducidos por la inmunización de animales, utilizando la técnica de doble difusión de Ouchterlony. Para tal fin se preparó una mezcla de agar/PBS a una concentración de 1% P/V y 20 ml de esta mezcla fue adicionada a placas de petri de 9 cm de diámetro. Una vez gelificado el agar, se realizaron perforaciones de 5mm de diámetro equidistantes en forma de hexágono y fue adicionado un volumen de muestra de 100µl de cada una de las preparaciones de anticuerpos; el antígeno de referencia (veneno de coral) fue adicionado a una concentración de 100µg en el centro del hexágono. Los antisueros en evaluación fueron colocados en diluciones seriadas de ½ hasta 1/64. Finalmente, las placas fueron incubadas a 30ºC por 16 – 24 horas y las bandas de precipitación desarrolladas por la interacción antígeno anticuerpo fueron visualizadas como líneas de color blanco y marcadas por coloración con rojo de ponceau.

5.14. Titulación de anticuerpos por ELISA

Se procesaron 5 réplicas del inmunoensayo en las cuales se acoplaron 4 ug de veneno en PBS a cada pozo de la placa y el bloqueo de sitios inespecíficos de reacción con BSA al 2% en PBS-

tween. Diluciones tanto de los sueros paréntales como de las fracciones obtenidas por precipitación de cada uno de ellos, fueron colocadas en dilución seriada y se manejaron los sueros equinos originales con sus respectivas fracciones recuperadas con la metodología de fraccionamiento sulfato de amonio; las diluciones seriadas 1/200 a 1/25.600. La reacción antígeno – anticuerpo fue puesta de manifiesto con la adición de un conjugado anti-IgG total de caballo marcado con peroxidasa en dilución 1/800. Los lavados entre cada paso fueron realizados con PBS-tween 0.5% (25).

5.15. Ensayo de potencia en placa

El proceso de acople de veneno y bloqueo de sitios inespecificos fue realizado bajo condiciones similares descritas en el numeral **5.14**. El anticuerpo primario correponde a una mezcla de antígeno-anticuerpo (suero en dilución 1/200 mezclado con diluciones en exceso de veneno de 16 ug hasta 0,125 ug), preincubada durante 60 min., esta mezcla fue adicionada por pozo en 100µl e incubada durante una hora adicional. El proceso de detección de la actividad residual de anticuerpos fue determinada siguiendo los pasos descritos en el numeral **5.14** para detección del complejo antígeno-anticuerpo y para determinación de la potencia del antisuero de referencia SAAC 006.

6. RESULTADOS

6.1. ENSAYOS BIOLOGICOS.

6.1.1. Determinación preliminar de parámetros para cálculo de DL_{50}

El resultado preliminar para calculo de la DL_{50} de la mezcla de venenos (*Micrurus surinamensis, Micrurus medemi* y *Micrurus isozonus*), con las dosis seleccionadas de 150 µg, 100 µg, 75 µg y 50 µg, indujo mortalidad del total de los animales. Los resultados de este ensayo de aproximación al cálculo de la DL_{50} para la mezcla de veneno de coral se ilustran en la tabla 8

Tabla 8. Determinación de dosis letal 50 (DL_{50}) en ratones, para mezcla de veneno de *Micrurus*

Ensayo	Dosis	Volumen de inoculación	Numero de animales	No de animales Muertos	Mortalidad
1	150 µg	100 µL	10	10/10	100%
2	100 µg	100 µL	10	10/10	100%
3	75 µg	100 µL	10	10/10	100%
4	50 µg	100 µL	10	8/10	80%
5	S.S	100 µL	5	0/5	0%

Como puede observarse, para la mezcla de veneno la **DL_{50}** es inferior a 50µg. En concordancia con este resultado, fueron ensayadas concentraciones de la mezcla de veneno en el rango entre 35 µg y 10 µg. La inoculación de ratones vía intra-peritoneal con diluciones dentro de este rango y monitoreados por 72, horas mostró que la **DL_{50}** se encontraba en el rango de 35 µg a 30 µg. Los resultados de este ensayo son resumidos en la tabla 9.

Tabla 9. Calculo de la DL_{50}

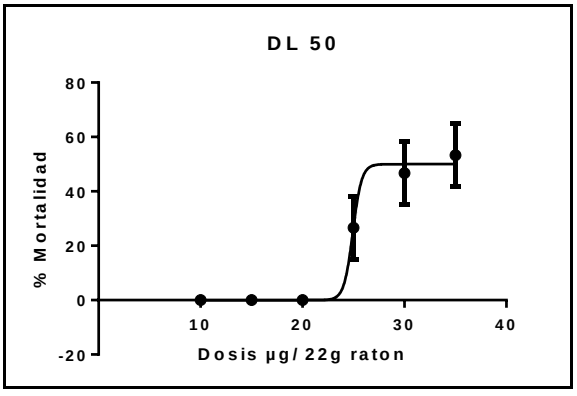
Dosis (µg)	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Media	S.D
	No. Animales muertos	% Mortalidad	No. Animales muertos	% Mortalidad	No. Animales muertos	% Mortalidad		
35	2/5	40	3/5	60	3/5	60	53.33	0.1155
30	2/5	40	2/5	40	3/5	60	46.66	01155
25	1/5	20	2/5	40	1/5	20	26.66	0.1155
20	0/5	-	0/5	-	-	-	-	-
15	0/5	-	0/5	-	-	-	-	-
10	0/5	-	0/5	-	-	-	-	-
s.s	0/5	-	0/5	-	0/5	-	-	-

A partir de estos resultados fue realizado un análisis estadístico de regresión no lineal para el cálculo de la DL_{50}. Para esto fue graficado la dosis en el eje (X) en función del porcentaje de mortalidad de los ratones en el eje (Y), datos analizados empleado el software estadístico GraphPad Prism versión 5.00. El resultado de este análisis es mostrado en la tabla 10 y la grafica 1

Tabla N° 10. Dosis letal 50

Dosis letal 50 (DL_{50})	
DL 50	33.02
Intervalos de confianza del 95%	**30.82 a 35.37**
R^2	0.9217

La grafica 1, muestra el calculo de la DL_{50} del veneno de *Micrurus surinamensis, Micrurus isozonus*, *Micrurus medemii.*



6.1.2. Ensayo de neutralización e inmunización de Equinos.

Diluciones seriadas del antisuero específico contra coral, lote SAAC 006 (Probiol), mezcladas con DL_{50} de veneno calculada en el numeral anterior, mostró que hasta la dilución 1:3, el antisuero presentó protección total de grupo de animales. Esta dilución protegió hasta el 90% de los ratones en la prueba de reto.

Los dos grupos de equinos (dos caballos por grupo), fueron inmunizados el mismo día vía intramuscular siguiendo tanto el protocolo estándar del Laboratrorio Probiol (grupo 1) y el protocolo alternativo con la mezcla equi-molecular (grupo 2). La inmunización de los animales realizada en el cuarto tercero izquierdo, mostró una respuesta inmune adecuada al cabo de 60 días contra la mezcla del veneno de coral en tres de los cuatro animales. Ninguno de los animales presentó formación de absceso, ni otro tipo de lesión en el sitio de inoculación. Uno de los equinos utilizados (Castaño), presento inflamación y dolor, que se evidenció por aparición de renquera del cuarto posterior izquierdo del animal, cuadrante donde fue realizada la inoculación del antígeno. La nomenclatura utilizada para nombrar a los cuatro equinos utilizados en este trabajo y que será utilizada en adelante será: C1 - Castaño; C2 – Oscuro, grupo 1; C3 - Tostado; C4 – Tiburón, grupo 2.

Los animales inmunizados siguiendo el protocolo estándar aplicado por laboratorios Probiol, recibieron 8 inmunizaciones más un refuerzo y presentaron mejor título de anticuerpos, que aquellos inmunizados siguiendo el protocolo alternativo y quienes recibieron 4 inmunizaciones más un refuerzo a partir de la variación a la preparación de antígeno propuesto como protocolo alternativo.

6.2. Fraccionamiento de plasma

La cinética de fraccionamiento de plasma equino utilizando Sulfato de Amonio permitió recuperar tanto proteína plasmática como anticuerpos, como lo demuestra el análisis electroforético de las diferentes fracciones obtenidas, observándose un enriquecimiento de la banda de proteína entre 66.2 y 55 kDa correspondiente a la cadena pesada de gammaglobulinas y la cadena liviana observada en la banda entre 31 y 21.5 kDa respectivamente (figura 5). La presencia y concentración de anticuerpos específicos contra los

antígenos presentes en la mezcla de veneno de coral, fue evidenciada en cada una de las fracciones de anticuerpo recuperadas mediante su valoración por el método de Ouchterlony y ELISA.

Adicionalmente dos de los sueros obtenidos (animal C2 y C3) fueron fraccionados utilizando PEG-6000 y Sulfato de Sodio al 14% con el fin de comparar la eficiencia en el aislamiento de gamaglobulinas. Los resultados de la calidad de gamma globulinas recuperadas por los diferentes agentes precipitantes y analizados por SDS-PAGE, se describe en la figura 5.

La técnica de coloración de las proteínas separadas en SDS-PAGE, utilizando azul de Coomassie presenta una sensibilidad ≥ 5µg por banda de proteína. Además, dependiendo del efecto o mecanismo de precipitación no todos los agentes precipitantes muestran el mismo rendimiento y capacidad para separar eficientemente todos los componentes del plasma (figura 5 carriles 3-4, 6-7, 8 y 14-15).

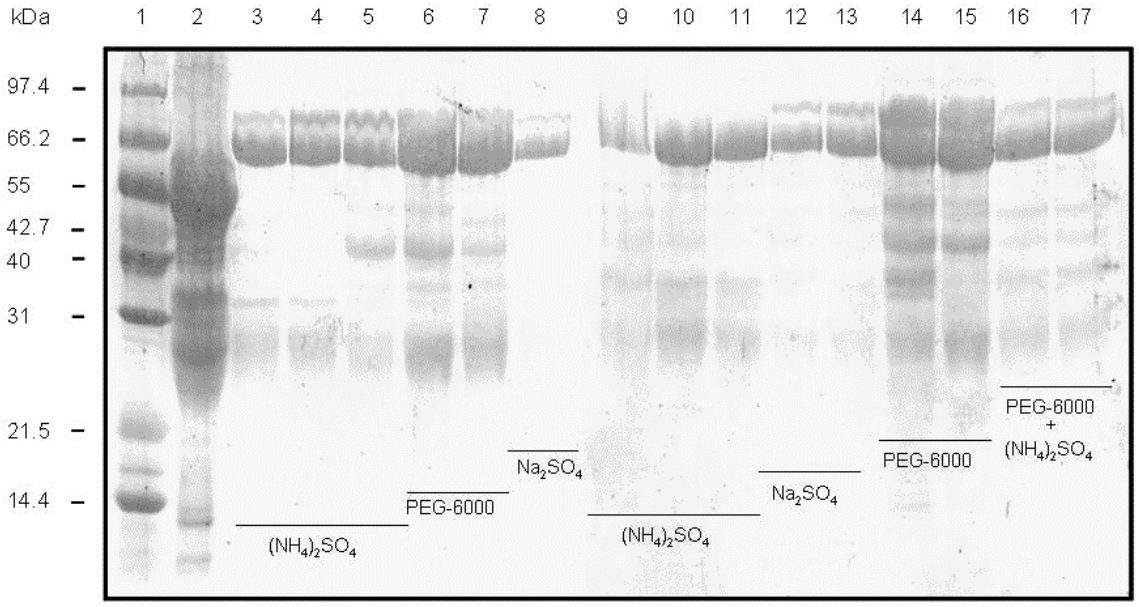


Figura 5. Análisis del perfil de proteínas por SDS-PAGE de plasma de equino para animal **C3**: (**carril 1**) patrones de peso molecular rango intermedio (Promega), (**carril 2**) suero completo (**carril 3-5**) Sulfato de Amonio a saturación de 20, 25, 30%, (**carril 6-7**) precipitación con PEG-6000 12 y 8%, (carril 8) sulfato de sodio14%. Fracciones obtenidas para el antisuero **C2**: (**carril 9-11**) Sulfato de Amonio a saturación de 20, 25, 30%, (**carril 12 y 13**) Sulfato de Sodio 14 y 19%, (**carril 14 y 15**) PEG-6000 12 y 8%, (**carril 16 y 17**) doble precipitación Sulfato de amonio/PEG-6000. En orden descendente las flechas indican la posición relativa de la albúmina 60 kDa, cadenas pesada 57 kDa y cadena liviana 24 kDa.

6.3. Cuantificación de proteína total

Para equinos la concentración plasmática de albúmina reportada se encuentra alrededor de 37.28 g/L y gammaglobulinas de 14.78 g/L, con una relación gammaglobulina/albúmina de 0.397 (70, 71). Para nuestro trabajo la proteína sérica total calculada mediante la metodología de polvo de acetona por mililitro de suero híper-inmune fue 79.02 mg/mL utilizando una balanza analítica con sensibilidad al miligramo.

Para las fracciones de proteína obtenidas por precipitación con sales inorgánicas (Sulfato de amonio), la concentración de proteína total recuperada fue calculada utilizando lectura espectrofotométrica a 280 nm. La D.O mostró un incremento en la solución en proporción al incremento de la concentración del agente precipitante. Si bien se espera que a medida que incrementa la concentración del agente precipitante incremente la concentración de proteína total, la solución de anticuerpos obtenida por fraccionamiento utilizando 40% de sulfato de amonio mostró un descenso en la DO esperada. Los resultados de la cuantificación de proteína total recuperada de plasma de los equinos procesados se resumen en la tabla 11.

Tabla 11.
Determinación de proteína total en fracciones de plasma precipitadas con sulfato de amonio a diferente concentración por lectura a 280 nm

$(NH_4)_2 SO_4$ (%)	C1		C2		C3		C4	
	$DO_{280\ nm}$	mg/mL	$DO_{280\ nm}$	mg/mL	$DO_{280\ nm}$	mg/mL	$DO_{280\ nm}$	mg/mL
20	0,230	0,164	0,234	0,167	0,220	0,157	0,152	0,109
25	0,206	0,147	0,209	0,149	0,162	0,116	0,186	0,133
30	0,364	0,260	0,338	0,241	0,305	0.218	0,312	0,223
35	0,458	0,327	0,416	0,297	0,285	0.204	0,380	0,272
40	0,264	0,189	0,319	0,228	0,415	0,296	0.384	0,274
C1 - Castaño; C2 – Oscuro; C3 - Tostao; C4 – Tiburón								
Solución de anticuerpo puro a concentración de 1mg/mL proporciona una D.O de 1.4 a 280 nm Solución de albúmina a concentración de 1mg/mL proporciona una D.O de 0.6303 a 280 nm Solución de suero hiper-inmune Laboratorio Probiol a 1mg/mL en peso - D.O 1.074 a 280 nm								

Siendo la concentración promedio de albúmina sérica como proteína mayoritaria del plasma animal de 37.28 mg/mL y para inmunoglobulinas de 14.78 mg/mL para un total de 52.06 mg/mL, se puede observar que la concentración de proteína calculada por lectura en espectrofotómetro a 280 nm, es relativamente baja y muy inferior a la esperada desde el punto de vista teórico, lo cual indica un bajo rendimiento de recuperación de proteína. Para el antisuero de referencia SAAC 006, cuya densidad óptica para un peso de 1 mg de polvo

liofilizado, arrojó un valor de D.O. igual a 1.074, el contenido de proteína con relación a la absorción para gammaglobulinas es de 0.767 mg/mL.

6.4. Evaluación del titulo de anticuerpos específicos anti-veneno de coral por la técnica de doble inmunodifusión (Ouchterlony).

La doble inmunodifusión de Ouchterlony permitió verificar la presencia de anticuerpos específicos contra la mezcla de veneno de coral (figura 6). Los sueros crudos ensayados en dilución de ½ a 1/64, mostraron bandas de precipitación correspondiente al complejo antígeno-anticuerpo para los tres antisueros ensayados. Para el suero **C2** (0.297 mg/mL), inmunizado siguiendo el protocolo estándar utilizado por Laboratorio Probiol se presentan bandas de precipitación hasta la dilución 1/64 (figura 6A); para el suero de **C3 (**0.204 mg/mL), inmunizado siguiendo el protocolo alternativo, presento bandas de precipitación hasta la dilución 1/16 (figura 6B); para el suero **C1** (0.327), fraccionado con Sulfato de sodio la banda de precipitación se observa hasta la dilución 1/32. Para las gammaglobulinas recuperadas por fraccionamiento salino, posición **B** de las tres placas, se observan bandas de precipitación para C2, C3 hasta la dilución 1/32 y 1/8 respectivamente. Para el antisuero de coral de referencia suministrado por Laboratorios Probiol (Lote SAAC 006) bajo las mismas diluciones experimentales, se observan bandas de precipitación claras hasta la dilución 1/4 (0.767 mg/mL). La figura 6 describe gráficamente el resultado de titulación de anticuerpos por doble inmunodifusión.

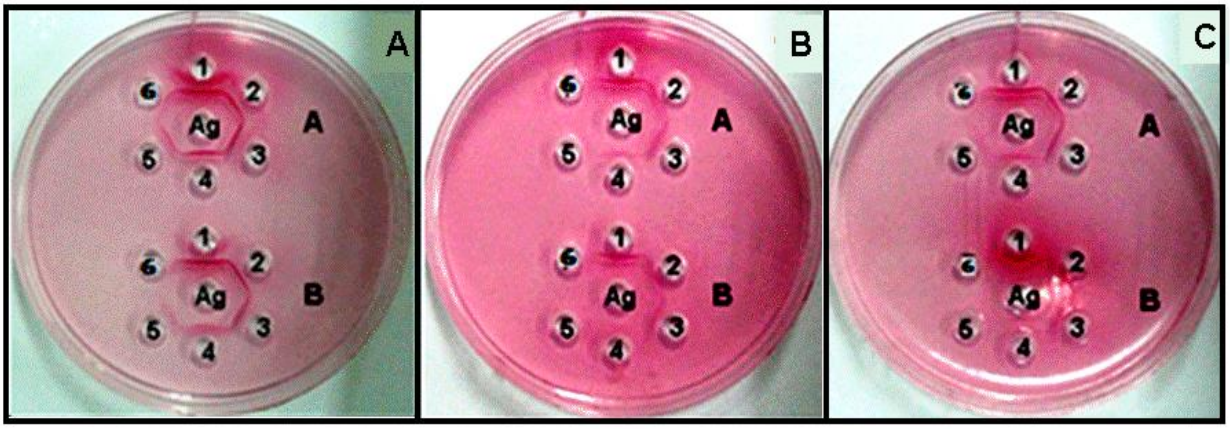


Figura 6. Doble Inmunodifusión de Ouchterlony. Las posiciones A y B sobre la placa muestran la dilución del antisuero entre 1 y 1/64 (posiciones 1 a 6) tanto del suero parental como de anticuerpos recuperado por fraccionamiento salino. La caja **A** para el antisuero C2, caja **B** para el antisuero C3 y caja **C** para el antisuero C1 para suero fraccionado con sulfato de sodio posición A y antisuero Probiol lote SAAC 006 en B.

Si bien el suero de animal **C4** presentó un título de anticuerpo próximo al obtenido para **C3**, los anticuerpos presentes en este preparado no indujeron la formación de bandas de precipitación utilizando la metodología de doble inmunodifusión de Ouchterlony, razón por la cual los resultados de este ensayo no fueron incluidos en este análisis.

La determinación del título de anticuerpos para las fracciones proteicas obtenidas de los antisueros crudos utilizando la técnica de ELISA, es resumida en la tabla 12. En esta tabla se puede observar la reactividad de todos los antisueros incluyendo la reactividad del antisuero C4, frente al antígeno de reto preparado que no presentó reacción frente a veneno de coral en la metodología de doble inmuno difusión (numeral **6.4**)

Tabla 12
Titulo por ELISA de suero hiper-inmune equino anticoral. Densidad Óptica vs Dilución de antisuero

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
1/200	1,422	1,618	1,029	0,964	1,002	0,941	0,857	0,979
1/400	1,165	1,619	0,768	0,761	0,939	0,719	0,613	0,792
1/800	0,805	1,373	0,564	0,606	0,637	0,524	0,505	0,646
1/1600	0,610	0,953	0,359	0,412	0,377	0,333	0,276	0,506
1/3200	0,465	0,885	0,217	0,226	0,258	0,226	0,184	0,101
1/6400	0,312	0,634	0,17	0,201	0,207	0,155	0,161	1,622
1/12800	0,239	0,515	0,149	0,168	0,166	0,157	0,154	0,082
1/25600	0,189	0,342	0,139	0,137	0,135	0,133	0,144	0,096

C1 - Castaño; C2 – Oscuro; C3 - Tostao; C4 – Tiburón

Posiciones 1 a 4 Diluciones seriadas Suero C1, C2, C3, C4 **Posición 5 a 7** Fracción suero C1 con Na_2SO_4 Fracción suero C2 con PEG Fracción suero C3 con PEG **Posición 8** Suero SAAC 006	E8 – Control reactividad conjugado F8 – Control dil. Conjugado G8 – Control agente de bloqueo H9 – Control estabilidad de sustrato Diluciones de antisuero de 1:200 hasta 1:25.600, posiciones A – H Dilución del conjugado 1:800

6.5. Titulo de anticuerpos por ELISA

Las replicas de los ensayos de titulación de anticuerpos específicos contra veneno de coral por ELISA empleado diluciones tanto de antisueros como de fracciones de los mismos en diluciones entre 1:200 a 1: 25.600, fue realizada a los cuatro equinos.

Se realizaron 5 replicas del ensayo empleando 4ug de antígeno por pozo (mezcla de veneno de coral *Micrurus surinamensis, Micrurus medemi, Micrurus isozonus)* y diluciones seriadas de sueros y fracciones desde 1/200 a 1/25.600. Con el uso de un conjugado (anticuerpo específico para caballo marcado con peroxidasa) se observan diferencias en las densidades ópticas a $DO_{620\ nm}$ de con respecto a la dilución del preparado de anticuerpos, para cada una de las muestras estudiadas. Los resultados de la evaluación del titulo de anticuerpos fue realizada a 70 días de iniciado el protocolo de inmunización; los resultados se encuentran resumidos en la tabla 12, 12a y graficas 2. La tabla 12 y 12a describen los resultados de la determinación del título por ELISA de los sueros y las fracciones de cada suero obtenidas por precipitación salina con Sulfato de amonio a concentración de 20, 25, 30,35% respectivamente.

6.6. Ensayo de neutralizacion en placa

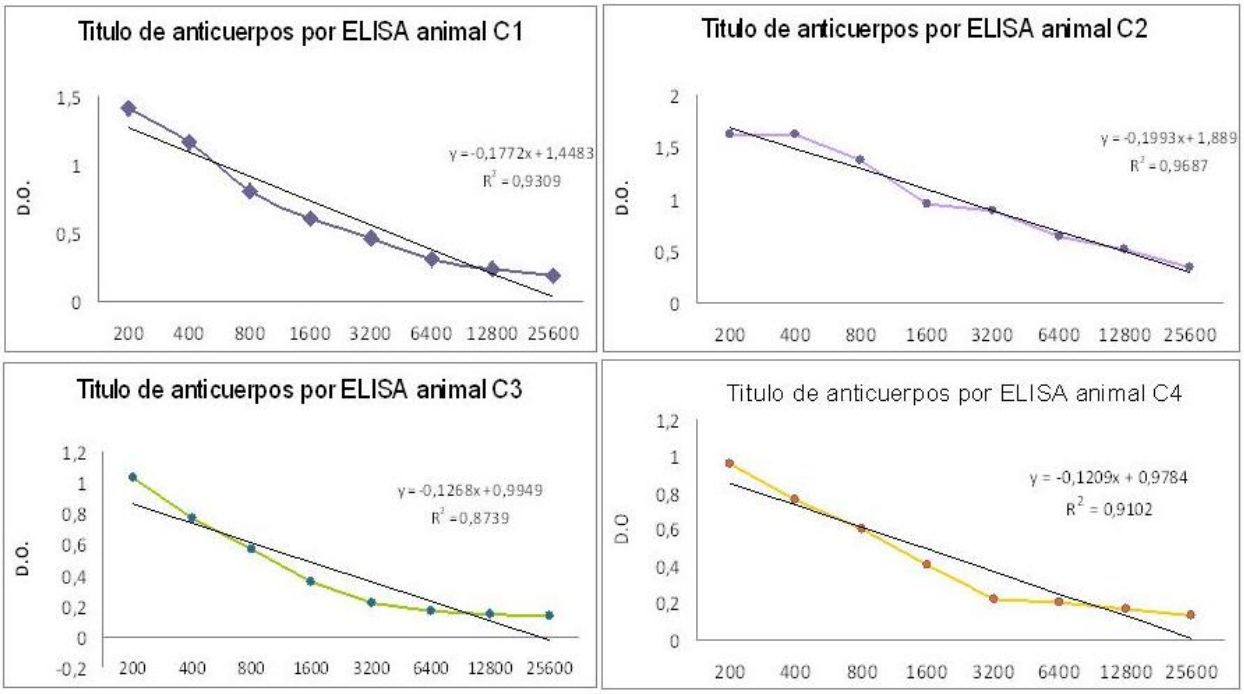
Se emplearon 4 ug por pozo del antigeno (veneno de coral *Micrurus surinamensis, Micrurus medemi, Micrurus isozonus)* y una mezcla de antígeno- anticuerpo (diluciones de veneno de 16 ug a 0,125 ug y una concentración constante de suero en dilución 1/200); la adición de un anticuerpo específico para caballo marcado con peroxidasa (conjugado), permitió encontrar el punto de neutralización del veneno en solución y evidenciar el punto de protección de los antisueros recuperados por las técnicas de fraccionamiento utilizadas en el estudio ver tabla 13 y grafica 3 y 4 respectivamente.

Tabla 12ª
Titulo por ELISA de anticuerpos sueros hiperinmunes anti-coral obtenidos por precipitación salina

Dilución	Densidad Óptica (D.O) a 620 nm. sistema inmunoperoxidasa /substrato ABTS															
	C1				**C2**				**C3**				**C4**			
1:200	0,573	0,521	0,699	**0,798**	0,706	0,789	0,770	**0,788**	0,598	0,652	0,702	**0,781**	0,298	0,395	0,457	**0,524**
1:400	0,490	0,425	0,660	0,705	0,684	0,724	0,758	0,772	0,510	0,561	0,673	0,699	0,203	0,335	0,433	0,492
1:800	0,374	0,331	0,569	0,701	0,636	0,698	0,753	0,727	0,430	0,472	0,604	0,658	0,184	0,221	0,374	0,483
1:1.600	0,271	0,236	0,442	**0,610**	0,587	0,663	0,744	**0,741**	0,318	0,362	0,522	**0,637**	0,115	0,158	0,312	**0,397**
1:3.200	0,192	0,161	0,319	0,510	0,473	0,582	0,733	0,682	0,235	0,268	0,404	0,621	0,101	0,126	0,195	0,319
1:6.400	0,135	0,140	0,245	0,380	0,352	0,470	0,671	0,670	0,212	0,209	0,319	0,511	0,086	0,11	0,151	0,217
1:12.800	0,120	0,116	0,162	0,254	0,247	0,358	0,623	0,490	0,129	0,126	0,247	0,382	0,08	0,101	0,122	0,158
1:25.600	0,096	0,095	0,134	**0,181**	0,163	0,247	0,516	**0,065**	0,111	0,115	0,165	**0,282**	0,083	0,086	0,108	**0,119**

C1 - Castaño; C2 – Oscuro; C3 - Tostado; C4 – Tiburón

C1 columnas 1-4; C2 columnas 5-8; C3 columnas 9-12 / diluciones entre 1/200 a 1/25.600
H8 – Control negativo reacción sustrato
De izquierda a derecha para c/u de los animales fracciones 20, 25, 30, 35% de saturación con $(NH_4)_2 SO_4$



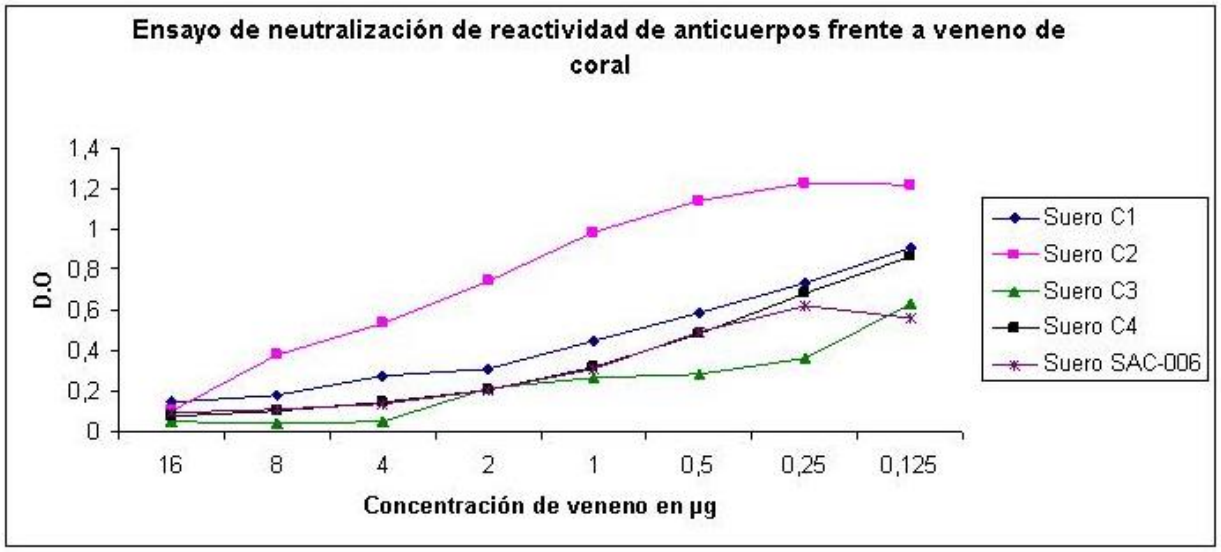
Grafica 2. Titulo de anticuerpos antiveneno de coral por ELISA suero de equino. Densidad Óptica (OD a 620 nm) vs. Reciproco de la dilución de suero (datos tabla 12)

Tabla 13
Ensayo de neutralización de toxina de veneno de coral frente a anticuerpos por ELISA

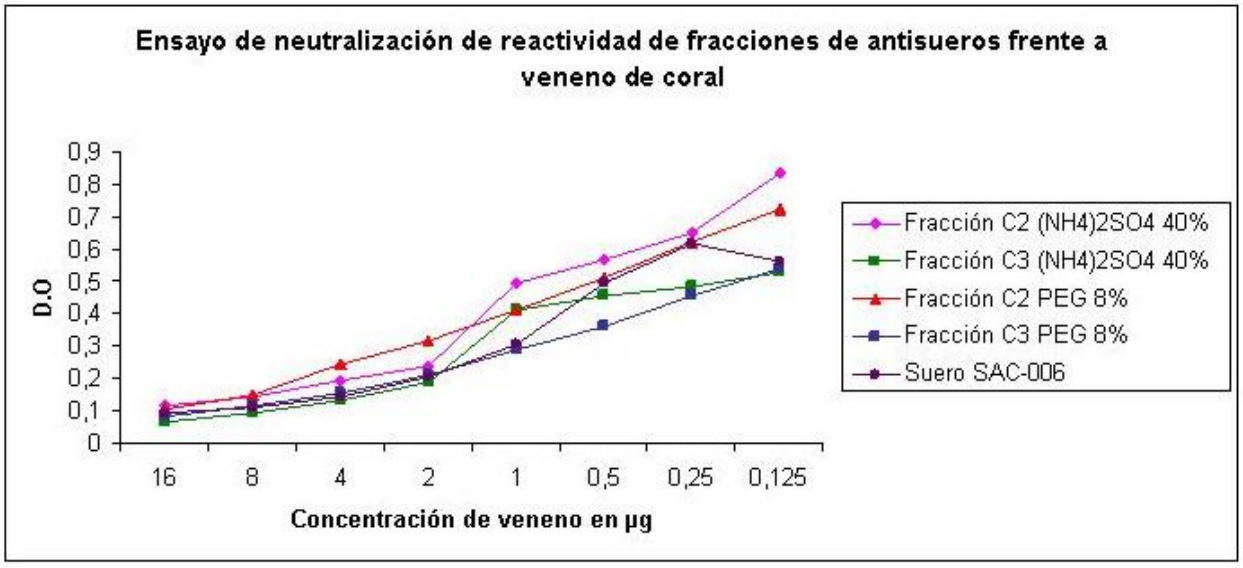
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.125	0.910	1.218	0.635	0.863	0.832	0.527	0.722	0.541	0.561	0.051
0.25	0.735	1.228	0.361	0.685	0.652	0.485	0.623	0.456	0.618	0.061
0.5	0.587	1.144	0.285	0.481	0.565	0.454	0.513	0.361	0.495	0.051
1	0.448	0.986	0.272	0.320	0.496	0.411	0.413	0.289	0.308	
2	0.314	0.745	0.216	0.211	0.241	0.187	0.318	0.212	0.204	
4	0.277	0.532	0.054	0.146	0.196	0.133	0.243	0.157	0.142	
8	0.182	0.380	0.046	0.102	0.147	0.094	0.150	0.114	0.112	
16	0.151	0.102	0.048	0.081	0.114	0.065	0.103	0.084	0.092	

C1 – Castaño; C2 - Oscuro ; C3 - Tostao ; C4 – Tiburón

Posiciones 1-4: Dilución de c/u de sueros a 1/200
Posiciones 5 y 6: Dilución fracciones C2 y C3 con $(NH_4)_2SO_4$ 40% a 1/200
Posiciones 7 y 8: Dilución fracciones C2 y C3 con PEG 8% a 1/200
Posición 9 antisuero SAAC-006
Posición 10 controles negativos
Concentración decreciente de veneno de 16µg hasta 0.125µg



Grafica 3. Ensayo de neutralización de la reactividad de antisueros frente a veneno de coral en dilución seriada por ELISA, mediante neutralización en solución.



Grafica 4. Ensayo de neutralización de la reactividad de fracciones de antisueros obtenidos por precipitación frente a veneno de coral en dilución seriada por ELISA, mediante neutralización en solución.

7. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL_{50})

El rango de concentraciones de veneno de coral seleccionados para determinación de la DL_{50}, fue tomada de datos preliminares publicados, en los cuales el valor más alto de DL_{50} se encontraba alrededor de 0,736 mg/kg de animal (72). Para el cálculo de la DL_{50} fueron aplicados los parámetros descritos en la norma OECD420 para diseño y validación del experimento. El resultado de este ensayo mostró una mortalidad del 100% de los animales, indicando que la potencia del veneno expresada en el parámetro DL_{50}, se encontraba por debajo de los valores reportados por la literatura. Esta diferencia con la literatura, puede ser atribuida a la diferencia en la procedencia de los venenos, pero parece ser mas factible que el veneno utilizado en la realización de este trabajo, corresponde a una mezcla de tres venenos de coral (*Micrurus surinamensis, Micrurus medemi y Micrurus isozonus*), razón por la cual se encontró la discrepancia observada en el calculo de la DL_{50}. El ensayo de corrección para cálculo de la DL_{50} utilizando concentraciones de la mezcla de veneno entre 35 -10 µg permitió encontrar la dosis DL_{50} en 33 µg aproximadamente, resultado concordante con las metodologías descritas para tal fin (49, 74 -76, 82).

7.2. Producción de suero hiperinmune equino anti-veneno de coral

Uno de los problemas inherentes en la producción de sueros antiofídicos, es la toxicidad relativa del veneno para el animal, tanto a nivel sistémico como localmente. La composición química de los diferentes venenos de serpiente incluye enzimas líticas encargadas de ayudar a la difusión y penetración de las toxinas del veneno por digestión del tejido y los vasos sanguíneos (77- 80). Para la producción de sueros hiperinmunes han sido propuestos dos métodos para la preparación del antígeno, el primero inactivando el antígeno por tratamiento fisicoquímico (temperatura o formaldehído) y dos, inoculando el veneno activo con ayuda de un adyuvante en tejido animal a bajas concentraciones para inducir el menor daño posible en la estructura

muscular. Así mismo, la capacidad para producir anticuerpos contra un veneno depende del tipo de veneno y su composición química. Estos factores llevan a inmunizar animales con dosis muy bajas de veneno lo que va en detrimento de la calidad del antisuero en términos de potencia (43-46). Además, ha sido reportado el efecto local deletéreo de toxinas activas de veneno (actividad enzimática), sobre la respuesta inmune, principalmente alteración en la calidad de la respuesta y presentación de antígenos al inducir actividad anormal de macrófagos y linfocitos (81-84).

El efecto citotóxico de algunos de los componentes presentes en veneno de coral, puede inducir baja respuesta a los antígenos que conforman el veneno, reduciendo de esta forma el procesamiento del antígeno y por consiguiente el titulo de anticuerpos específicos (43). Con el objeto de subsanar estos inconvenientes, numerosas modificaciones a la preparación de los antígenos, adyuvantes y protocolos de inmunización han sido implementados (83,84). En este contexto, se postuló la utilización de un adyuvante alternativo al hidróxido de aluminio, utilizado rutinariamente para este tipo de procesos y el cual fue ensayado en la producción de sueros hiperinmunes en el presente trabajo.

Con base en la función mecánica de adyuvantes como los sistemas ISCOM, adyuvante incompleto de Freud, se diseño un adyuvante con base vitamina E, un agente emulsificante, un estabilizante, que fue mezclado en proporción definida para incorporar el veneno de coral neutralizado. La utilización de esta mezcla adyuvante antígeno redujo el volumen de inoculación a 1/3 con respecto al protocolo utilizado por laboratorios Probiol. Este adyuvante no indujo reacciones adversas el sitio de inyección, ventaja presentada sobre el adyuvante tradicional e indujo una respuesta inmune intermedia con un menor número de inmunizaciones a intervalos de 15 días.

Al observar los resultados obtenidos por ELISA para determinación del titulo de anticuerpos de sueros hiperinmunes obtenidos de los cuatro equinos utilizados, se puede observar que la respuesta obtenida por variación en protocolo de inmunización tradicional y adyuvante, no presenta una ventaja significativa sobre el incremento en el titulo de anticuerpos en los sueros crudos (Tabla 12), correspondiendo estos aproximadamente a 2/3 de la respuesta obtenida utilizando el protocolo convencional. Sin embargo, al comparar la reactividad de los antisueros recuperados por fraccionamiento, estas diferencias no son significativas (columnas 5-7 tabla 12a). Este resultado queda corroborado al comparar la reactividad de las fracciones de

antisuero obtenidas por precipitación con sulfato de amonio, resultado que no evidencia diferencias significativas para la fracción obtenida al 40% de saturación (tabla 12 -12a).

Sin embargo, si se analizan los resultados individualmente, los caballos **C1** y **C2** presentan titulo de anticuerpos más alto que los animales **C3** y **C4** (Tabla 12), siendo el animal **C2** quien presenta la mayor respuesta de anticuerpos bajo las condiciones de inmunización y el ensayo ELISA. Así mismo, **C1** y **C2**, son animales que recibieron 9 dosis de antígeno a intervalos de 7 días, en concentración creciente de acuerdo al protocolo convencional, comparados con la respuesta inmune de **C3** y **C4**, animales que recibieron tan solo 5 inmunizaciones en concordancia con el protocolo alternativo propuesto. Este resultado confirma evidencias precedentes, que indican que el titulo de anticuerpos en inmunización de animales con veneno de serpientes esta en relación directa con el numero de inmunizaciones y la dosis empleada, resultado que esta relacionado con el protocolo de inmunización y que la variación en la respuesta individual es de carácter idiosincrásico.

Por otro lado, la modificación incluida en la formulación del adyuvante utilizado para inmunizar a los animales C3 y C4, no mostró ser más eficaz en la estimulación de la respuesta inmune de los animales. En este contexto, el Adyuvante completo de Freund, o su versión incompleta, han sido descritos como los mejores adyuvantes para estimulación de la respuesta inmune. Debido a su composición con base de aceite mineral, el cual no es biodegradable, este adyuvante no fue utilizado, debido a las lesiones que causa en el sitio de inoculación (54, 55, 85). Además, en este modelo de producción de antisueros, se utilizan múltiples inyecciones de antígeno en la misma región, limitando el numero de regiones disponibles para inmunización debido a la formación de lesiones granulomatosas (85). Por tal razón, los componentes del adyuvante diseñado fueron biodegradables y la base oleosa para dosificar la liberación del antígeno progresivamente fue vitamina E. Los resultados obtenidos en la determinación del titulo de anticuerpos muestran una diferencia en la estimulación de la respuesta inmune entre los dos grupos de animales inmunizados, siendo esta mayor en los animales C1 y C2, inmunizados utilizando el adyuvante corrientemente utilizado por Laboratorios Probiol. Esto puede ser explicado posiblemente a una menor capacidad inmuno estimulante del adyuvante diseñado, (55, 84, 85) y al menor número de inmunizaciones recibidas por los animales C3 y C4 (tabla 12/ grafica 2). Sin embargo, las diferencias en los títulos de anticuerpos de los sueros crudos por ELISA, comparados con las fracciones obtenidas por precipitación salina de cada uno de los animales queda un poco desvirtuada (tabla 12a) ya que estas fracciones presentan títulos de

anticuerpos máximos muy próximos, resultado que indicaría la presencia de una posible reactividad inespecífica de los sueros crudos frente al antígeno a bajas diluciones.

7.3. Fraccionamiento de suero hiperinmune anti veneno de coral

Los métodos para fraccionamiento fueron seleccionados con base en los principios fisicoquímicos que modifican las propiedades de las soluciones como el PEG y sales inorgánicas con diferente gradiente de saturación como el sulfato de amonio y sulfato de sodio. La precipitación de una proteína esta relacionada con el peso molecular y la concentración en la muestra. La concentración efectiva del agente precipitante esta relacionada con su solubilidad en agua y el tamaño para el caso de PEG 6.000. Bajo este contexto el mejor de los agentes precipitantes ensayados bajo las condiciones de laboratorio fue el Sulfato de Sodio, quien a una concentración de 14%, permite recuperar un anticuerpo de mayor calidad, con baja contaminación, teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica de coloración (5µg por banda), comparado con el Sulfato de amonio y el PEG 6.000 quienes precipita mayor numero de proteínas del suero. Para el Sulfato de amonio, a medida que se incrementa la concentración se observa mayor precipitación de proteínas séricas (figura 5), que correlaciona con el incremento en el titulo de anticuerpos específicos recuperados (Tabla 12a).

Si bien el fraccionamiento de anticuerpos séricos por métodos de salting-out no permite una purificación exhaustiva de anticuerpos, este método permite enriquecer el preparado en anticuerpos. Con el fin de mejorar la calidad de la preparación de antiveneno, ha sido reportado que la precipitación doble utilizando dos principios fisicoquímicos diferentes proporciona mejor resultado (52, 53). En nuestro caso, al aplicar doble precipitación utilizando sulfato de amonio-PEG-6000 no ofreció una ventaja apreciable que al utilizar precipitación simple (figura 5 carril 16 y 17). Este puede ser debido al alto peso molecular de PEG, la concentración total de proteína presente en el suero y el porcentaje de PEG-6000 utilizado para este protocolo. Este resultado puede tener explicación al observar los resultados para el fraccionamiento de los sueros C2 y C3 carriles 6 – 7 y 14 – 15 respectivamente en la figura 5. Esto indica claramente que la diferencia en composición química de cada suero afecta la eficiencia de la metodología salting-out y debe ser normalizada para cada suero.

7.4. Determinación del título de anticuerpos específicos anti-veneno de coral

La técnica de ELISA ha sido descrita ampliamente en la determinación del título de anticuerpos (47 - 51). Para la aplicación de esta técnica, fue validado el límite de confianza superior e inferior para reactividad del anticuerpo frente al antígeno tanto para la pre-zona como la post-zona, con el objeto de determinar la zona de linealidad del ensayo. El resultado de los ensayos de validación, mostró que la concentración óptima de antígeno acoplado al plato de ELISA es de 4 µg para obtener linealidad en la respuesta. Esta concentración, disminuye al máximo la señal de interferencia tanto para sueros crudos, como fracciones semi-purificadas de los mismos.

Para este ensayo, si bien la información suministrada por el fabricante del conjugado anti-IgG total de equino indicaba la utilización de este en dilución 1:3.000, esta dilución no permitió obtener una señal adecuada utilizando como sustrato ABTS; las densidades ópticas (D.O) obtenidas a esta dilución no fueron superiores a 0.4 para el control positivo (antisuero SAAC-006), en ninguna de las diluciones utilizadas. Además, la titulación del conjugado en el formato ELISA, utilizando concentraciones variables de antígeno y anticuerpo primario, permitió establecer la dilución optima del conjugado bajo las condiciones diseñadas para este ensayo y obtener D.O superiores a 1.0 dentro de un rango lineal, sin incremento de la señal de interferencia en los controles negativos del formato ELISA, era 1:800, dilución a la cual se mantuvieron en nuestros ensayos en valores de DO inferiores a 0.150 unidades.

Los resultados de la determinación del título de anticuerpos tanto por la técnica semi-cuantitativa de Ouchterlony, como por la técnica cuantitativa de ELISA muestran concordancia en las diferencias de los títulos de anticuerpos entre cada uno de los sueros para los dos grupos de animales evaluados (figura 6 y tabla12). La diferencia en el título de anticuerpos entre la técnica de imuno-precipitación y análisis inmuno-enzimático (ELISA), radica en la concentración límite de antígeno y anticuerpo que pueden ser detectados, siendo del rango de microgramos y nanogramos respectivamente.

7.5. Determinación de la potencia relativa de antisuero obtenido

La concentración de proteína total del antisuero de referencia SAAC-006, es equivalente a 767 µg/mL y corresponde a una D.O de 1.074 a 280 nm (Tabla 11). Este antisuero una dilución 1:3 fue capaz de neutralizar 33µg de la mezcla de veneno de coral (DL_{50} Tabla 9). Para hacer una correlación entre estos dos datos y los antisueros obtenidos en este estudio, se debe establecer la cantidad de proteína total de anticuerpo presente por cada 0.1mL de antisuero SAAC, la cual corresponde a 76.7 µg, siendo requerido 0.3 mL para la neutralización de una dosis letal 50 de la mezcla de veneno de coral (33 µg) una cantidad de proteína total de antisuero de referencia SAAC-006 de 230.1 µg.

Si bien obtener una antisuero de una pureza cercana al 90% se requiere la utilización de técnicas de fraccionamiento y cromatografía combinadas, las técnicas de fraccionamiento salino y/o con utilización de polímeros han mostrado resultados aceptables, tanto en la concentración de proteína total como la reducción en concentración de cierto tipo de proteínas indeseables o contaminantes mejorando de esta forma tanto el título de anticuerpos como la potencia relativa del mismo (figura 5 y 6). Una vez utilizada una técnica de fraccionamiento salino de sueros hiperinmunes, se recomienda re suspender el precipitado de proteína en un 1:5 o 1:10 del volumen original. Para nuestro caso, se decidió mantener la relación de volumen de la proteína precipitada con respecto al volumen de suero utilizado (30 mL). Esta relación de volúmenes muestra que en nuestro estudio existe perdida de anticuerpos a la concentración de agente precipitante utilizada (saturación de 40%)

Por ser el fraccionamiento salino el método de elección tanto para el procesamiento del suero de referencia, como de los antisueros preparados, estos antisueros pueden ser considerados como similares con respecto a su composición química, efecto biológico y además, la presencia de proteína contaminante. En este contexto, tanto la proteína contaminante como la proporción de anticuerpo en las fracciones de antisueros procesados al 40% de saturación corresponden a 0,189, 0,228, 0,296, 0,274 mg/mL para C1, C2, C3 y C4 respectivamente. (Tabla 11). Los resultados de inmunodifusión de Ouchterlony muestran claramente que la fracción obtenida por precipitación del suero C2 con Sulfato de Sodio, precipita antígeno de veneno de coral hasta una dilución 1/16, comparado con el antisuero de referencia SAAC 006, quien reconoce antígenos y precipita antígenos de coral hasta la dilución 1/4, mostrando menor presencia de

anticuerpos específicos contra veneno de coral (figura 6). El anticuerpo de referencia presenta una concentración de proteína total de 767 µg / mL, siendo utilizados 0.1 mL de antisuero por pozo (figura 6)

Bajo este precepto, el ensayo de potencia del antisuero SAAC-006 en ratones, mostró que hasta la dilución 1/3 se obtenía protección de los animales, indicando que para neutralizar 33µg de toxina fueron requeridos 230.1 µg de proteína total de antisuero SAAC-006, es decir, 6.97 µg de proteína total por cada 1 µg de veneno. Si se observan los resultados de la técnica de Ouchterlony, hasta la dilución 1:4 se observan bandas de precipitación, es decir 19.18 µg del antisuero SAAC-006, comparado con 228.0 µg/mL del antisuero C2 y 296 µg/mL de C3, los cuales presentan bandas de precipitación hasta las diluciones 1:32 y 1:8 respectivamente, con equivalentes en proteína total de 0.709 µg y 3.7 µg, valores que indican una menor cantidad de proteína total y por consiguiente mejor potencia de los antisueros obtenidos con relación al título de anticuerpos específicos por mg de proteína total (figura 6 y tabla 11 -12).

Para el formato ELISA y comparando la relación de concentraciones con base en la D.O a 280 nm y los resultados de dilución de los antisueros antiveneno de coral utilizados en el formato de la técnica de ELISA, se puede asumir, que por cada 4µg de veneno acoplado al plato de ELISA debe haber 0.767 µg de proteína total de antisuero SAAC 006 para obtener la máxima respuesta, la cual corresponde a la dilución 1/200 con un valor de DO de 0.979, y de proteína total para el animal **C1,** 0.189 de proteína total con DO 1.42, para **C2,** 0.228 µg de proteína total con DO de 1.62, para **C3,** 0.296 µg de proteína total con DO de 1.03 y para **C4,** 0.274 µg de proteína total con DO de 0.96 (Tabla 12).

En concordancia con la concentración de proteína total calculada para cada una de las fracciones de los antisueros (0,189, 0,228, 0,296, 0,274 mg/mL) y el suero SAAC-006 (0.767 mg/mL), e igualando todos a la dilución 1/200, podemos afirmar que la proteína total presente en cada dilución se encontraba alrededor de 0.19, 0.23, 0.30 y 0.27 mg/ml para las fracciones de los antisueros C1, C2, C3 y C4 y para el suero SAAC-006 en 0.767 mg/ml. Así, la potencia relativa de los antisueros C1, C3 y C4 es aproximadamente igual y se encuentra relacionada con la concentración de anticuerpos específicos en cada una de las preparaciones y la concentración de veneno neutralizada por estos antisueros entre 4 y 2 µg, mientras para el suero C2 la cantidad de veneno neutralizado se encuentra entre 8 y 16 µg. Estos resultados indican que la concentración de anticuerpos específicos contra veneno de coral presente en los antisueros obtenidos (C1 a C4) es tres veces mayor que la presente en el antisuero SAAC-006.

8. CONCLUSIONES

8.1. Bajo las condiciones experimentales de inmunización adoptadas, la estimulación de la respuesta inmune de anticuerpos contra veneno de coral, es dependiente del número de dosis, el volumen de inyección y la forma de preparación del inoculo.

8.2. El Sulfato de Sodio y la precipitación con Sulfato de amonio fueron más eficientes en la eliminación de las proteínas contaminantes presentes en suero bajo las condiciones establecidas en este estudio.

8.3. Se implemento la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony como una técnica económica y alternativa para determinación semi-cuantitativa del titulo de anticuerpos en sueros híper inmune equino contra veneno de coral y fracciones semi-purificadas de los mismos.

8.4. Los animales inmunizados con el protocolo convencional (C1 y C2), mostraron mejor respuesta de anticuerpos contra veneno de coral en suero crudo que aquellos inmunizados con el protocolo alternativo (C3 y C4).

8.5. El titulo relativo de anticuerpos del suero antiofídico SAAC-006 calculado por ELISA es 1/3 frente a los suero hiper-inmune C1 y C2 y ½ frente a C3 y C4, resultado confirmado por la técnica Ouchterlony de menor sensibilidad.

8.6. La metodología de ELISA validada en este trabajo, permite calcular la dosis efectiva de antisuero o potencia, para neutralizar mas del 80% de las toxinas presentes en el veneno de coral, siendo una buena alternativa para la estimación de la misma, resultado que correlaciona con los datos obtenidos por la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony y el calculo de la DL_{50} determinada por la metodología *in-vivo*.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Stiehm E.R. Appropriate Therapeutic Use of Immunoglobulin. Transfusion Medicine Reviews, 1996; 10: 203-221.
2. Dwyer J,M. Manipulating the immune system with immune globulin. New England Journal of Medicine 1992; 326:107-116.
3. Casadevall A, Scharff M.D. Return to the past: The case for antibody-based therapies in infectious diseases. Clinical Infectious Diseases 1995; 21:150-161.
4. Hawgood BJ. Doctor Albert Calmette 1863–1933. Founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. Toxicon. 1999. 37:1241–58.
5. Chippaux J.P., Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon 1998; 36:823–46.
6. Fox J.W., Serrano SM.T. Snake toxins and hemostasis. Toxicon. 2005. 45: 951-1181.
7. Markland F.S. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon. 1998. 36: 1749-1800.
8. Serrano S.M.T., Shannon J.D, Wang D, Camargo A.C, Fox J.W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by twodimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. Proteomics. 2005. 5: 501-510.
9. Fry B.G, Uster W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. Molecular Biology and Evolution. 2004. 21: 870-883.
10. Fry B.G. From genome to ‘‘venome’’: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. Genome Research. 2005. 15: 403-420.
11. WHO. Rabies and envenomings. A neglected public health issue. Geneva: World Health Organization 2007.
12. Gold BS, Dart RC, Barish RA. Bites of venomous snakes. New England Journal of Medicine. 2002. 347: 347-356.
13. Gold BS, Barish RA, and Dart RC. North American snake envenomation: diagnosis, treatment, and management. Emergency Medical Clinics North America. 2004. 22: 423-443.

14. Phui Yee, J.S., et al., Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. Biochimie. 2004. 86: 137-149.
15. Calvete, J.J., et al., Venoms, venomics, antivenomics. FEBS Letters. 2009. 583:1736-1743.
16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=430902
17. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/Elapidae.html.
18. Dokmetjian, J.C., et al., Biochemical characterization of the Micrurus pyrrhocryptus venom. Toxicon. 2009. 53: 375-82.
19. Castrillón D.F, Acosta J.G, Hernández E.A., Alonso L.M. Palacio, Snake poisoning. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 2007. 23: 96-111.
20. Bogarin, G., et al., Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. Toxicon. 2000. 38: 1429-41.
21. Stephano, M.A., et al., The improvement of the therapeutic anti-Lachesis muta serum production in horses. Toxicon. 2005. 45: 467-73.
22. Pier cacciali, N.J.S.J., Rainer Guenther, Ricardo J. Sawaya, Francisco Brusquetti and Frederick Bauer., Taxonomic Status of the False Coral Snake Genus Simophis (Peters, 1860) (Serpentes: Colubridae: Colubrinae) from Paraguay and Brazil Journal of Herpetology. 2009. 43: 698-703.
23. Hack, J.B., et al., A Localizing Circumferential Compression Device Increases Survival after Coral Snake Envenomation to the Torso of an Animal Model. Journal of Emergency Medicine.
24. Salazar A.M, Vivas J, Sanchez E.E, Acosta A.R. et al. Hemostatic and toxinological diversities in venom of Micrurus tener tener, Micrurus fulvius fulvius and Micrurus isozonus coral snakes. Toxicon. 2011. 58: 35-45.
25. Chavez-Olortegui, C., et al., An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of Brazilian Bothrops species and Crotalus durissus. Toxicon. 1997. 35: 253-60.
26. Theakston, R.D., D.A. Warrell, and E. Griffiths, Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon. 2003. 41: 541-57.
27. Juan R. Montilla F., Elvira Diaz Z., Marcos Añez y José Villavicencio, Hiperinmunización de ovinos contra el veneno de Crotalus durissus cunanensis del estado de Zulia, Venezuela. Revista científica. 1999. 9: 388-394.
28. Kentucky Regional Poison Center, D.o.E.M., School of Medicine, University of Louisville, Louisville, Use of antivenom for snakebites reported to United States poison centers. American Journal of Emergency Medicine. 2010. 28 : 780-785.

29. MacLennan, S., Barbara, J.A Risks and side effects of therapy with plasma and plasma fraction. Best Practice & Research Clinical Haematology. 2006. 19:169–189.
30. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, The interface between innate and adaptive immunity. Nature Immunology. 2004. 5: 971-974.
31. Abbas, A.K., Basic Immunology: functions and disorders of the immune system. 2004. 2: 1-323.
32. Perosa, F. Carbone, R., Ferrone, S., Dammacco, F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and amonium sulfate. Journal of Immunological Methods. 1990. 128: 9-16.
33. Rojas, G., Jimenez, J.M., Gutierrez, J.M. Caprylic acid fraccionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. Toxicon. 32: 351-363
34. Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom inmunoglobulins. WHO, 2010.
35. Calvete, J.J., et al. Snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, Micrurus altirostris and M. corallines. Journal of proteomics. 2011.
36. Ronachai Pratanaphon, R., Akesowanf, S., Khowt, O., Sriprapatt, S. and Ratanabanangkoon, K. Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (Naja kaouthia). Vaccine. 1997. 15:1523-1526.
37. Hughes, A.L., and Yeager, M.. Molecular evolution of the vertebrate immune system. BioEssays 1997. 19, 777 - 786.
38. Spiegelberg, H.L.. Biological activities of Igs of different classes and subclasses. Advances in Immunology. 1974. 19, 259 - 264.
39. Ballieux, R.E., Bernier G.M, Tominaga K, Putnam F.W. γ-Globulin antigenic types defined by heavy chain determinants. Science 1964. 145: 168 - 70.
40. Lichter, E.A., and Dray, S. Immunoelectrophoretic characterization of human serum proteins with primate antisera. Journal of Immunology. 1964. 92: 91- 99.
41. De Lange, G.G. Polymorphisms of human Igs: Gm, Am, Em and Km allotypes. Experimental and Clinical Immunogenetics. 1989. 6: 7- 17.
42. Morell, A., Skvaril F, Steinberg AG, Van Loghem E, Terry WD. Correlation between concentrations of the four subclasses of IgG and Gm allotype in normal human sera. Journal of Immunology. 1972.108: 195 - 206.
43. Chippaux, J-P., And M. Goyffon, M. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. Toxicon. 1998. 36: 823 – 846.

44. Chinonavanig, L., Billings, P.B., Matangkasombut, P., Ratanabanangkoon, K.,. Antigenic relationships and relative immunogenicities of venom proteins from six poisonous snakes of Thailand. Toxicon. 1988. 26, 883.
45. Chaves, F., Gutie rrez, J.M., Brenes, F.,(1992). Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake Bothrops asper (terciopelo). Toxicon. 30: 1099 –1109.
46. Komori, Y.; Nikai, T.; Sugihara, H. Comparison of the lethal components in Vipera aspis aspis and Vipera aspis zinnikeri venom. Journal of Natural Toxins. 1998. 7, 101–108.
47. Audebert, F.; Sorkine, M.; Bon, C. Envenoming by viper bites in France: Clinical gradation and biological quantification by ELISA. Toxicon. 1992. 30, 599–609.
48. Theakston, R.D.G., Lloyd-Jones, M.J., Reid, H.A., Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom antibody. The Lancet journal ii. 1977. 639–641.
49. Theakston, R.D.G., Reid, H.A., 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterisation of snake venoms. Bull. WHO 1983. 61: 949–956.
50. Rial, A., Morais, V. ., Rossi, S. Massaldi, H. A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms. Toxicon. 2006. 48: 462–466.
51. Rungsiwongse, J., Ratanabanangkoon, K. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against Thai cobra venom. Journal of Immunological Methods. 1991. 136: 37– 43.
52. Simsiriwong,P., Eursakun, S., Ratanabanangkoon, K. A study on the use of caprylic acid and ammonium sulfate in combination for the fractionation of equine antivenom F(ab')2. Biologicals 2012. 40: 338 – 344.
53. Tipaporn Saetang, Nitaya Treamwattana, Porntip Suttijitpaisal, Kavi Ratanabanangkoon Quantitative comparison on the refinement of horse antivenom by salt fractionation and ion-exchange chromatography. Journal of Chromatography B, 1997. 700: 233-239.
54. Burgess, R.R. Methods in Enzymology. New York: Academic Press:Protein Precipitation Techniques. 2009. 463 : 331–342.
55. Arakawa, T., and Timasheff, S. N. Methods in Enzymology. New York: Academic Press: Theory of protein solubility 1985.114: 49−77.
56. Steward, M. W. and Petty, R. E. The use of ammonium sulphate globulin precipitation for determination of affinity of anti-protein antibodies in mouse serum. Immunology. 1972. 22: 747–756.
57. Deutscher, Murray P., Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification, New York: Academic Press, 1990. 182: 285-306.

58. Crosby, M-J. Evaluación del perfil electroforético e inmunoquímico de proteínas de membrana externa de Salmonella enterica frente a anticuerpos provenientes de aves inmunizadas con bacterinas comerciales. Tesis Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá 1997.
59. Polson, A.,. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. Journal Immunological Investigations. 1990.19: 253-258.
60. Iverius, P.H., Laurent, T.C.,. Precipitation of some plasma proteins by the addition of dextran or polyethylene glycol. Biochimica et Biophysica. Acta 1967.133, 371–373.
61. Akita, E. M., and S. Nakai. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. Journal of Immunological Methods 1993.160:207–214.
62. Kumar, V., Sharma, V.K. and Kalonia, D.S. Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: Impact on solubility, stability and conformation, International Journal of Pharmaceutics. 2009. 366: 38-43.
63. Carty P., O`Kennedy R. Use of high performance liquid chromatography for the purification of antibodies and antibody conjugates and the study of antibody-antigen interactions. Journal of Chromatography 1988. 442: 279-288.
64. Ballow, M. “Intravenous Immunoglobulins: Clinical Experience and Viral Safety”, Journal of American Pharmaceutical Association, May-June 2002, 449-459.
65. Feasby, T., Banwell, B., Benstead, T., Bril, V., Brouwers, M. et al. Guidelines on the Use of Intravenous Immune Globulin for Neurologic Conditions. Transfusion Medicine Reviews. 2007. 21. (Suppl. 1): S57-S107
66. Radosevich, M. and Burnouf, T. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance. Vox Sanguinis. 2010. 98: 12–28
67. WHO: Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation. http://www.who. int/bloodproducts, 2005
68. Hammarstrom, L. Smith, C. I. E The Use of Intravenous IgG as Prophylaxis and for Treatment of Infections. 1990. Infection 18: 314- 324
69. Sawyer, L. A. Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases. Antiviral Research.2000. 47: 57–77
70. Amory, H., Marie-France Perron, M-F., Sandersen, C., Delguste, C., Grulke, S. et al. Prognostic Value of Clinical Signs and Blood Parameters in Equids Suffering from Hepatic Diseases. Journal of Equine Veterinary Science. 2005. 35: 18- 25.

71. Basile, R.C., Ferraz G.C., Carvalho, M.P., Albernaz, R.M., Araújo, R.A. et al. Physiological Concentrations of Acute-Phase Proteins and Immunoglobulins in Equine Synovial Fluid. Journal of Equine Veterinary Science. 2013. 33: 201-204
72. Sánchez, E., Lopez-Johnstona, J.C., Rodríguez, -Acosta, A, Pérez, J.C. Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. Toxicon. 2008. 51: 297–303.
73. Anderson, C.L., and Looney, R.J. 1986. Human leukocyte IgG Fc receptors. Immunol. Today 7, 264.
74. Laing, G.D., Theakston, R.D.G., Leite, R.P., Dias da Silva, W., Warrell, D.A., BIASG (Butantan Institute Antivenom Study Group), 1992. Comparison of the potency of three Brazilian Bothrops antivenoms using in vivo rodent and in vitro assays. Toxicon. 30, 1219–1225.
75. Sells P.G. Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives. Toxicon 2003. 42: 115–133.
76. Tanaka GD, Furtado MdFD, Portaro FCV, Sant'Anna OA, Tambourgi DV. Diversity of Micrurus Snake Species Related to Their Venom Toxic Effects and the Prospective of Antivenom Neutralization. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2010. 4: e622.
77. Gutiérrez, J.M., Rojas, G., da Silva, N.J. Jr and Nuñez, J. 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American Micrurus (coral snakes). Toxicon. 1992. 30: 1299-1302.
78. Pickering R. J., Wolfson, M. R., Good, R. A. and Gewurz, H. Passive Hemolysis by Serum And Cobra Venom Factor: A New Mechanism Inducing Membrane Damage by Complement. (PNAS) Proceedings of the National Academy of Sciences.1969. 62: 521-527.
79. Alape, A, Stiles, B., Schmidt. J,, Giron, M, Thelestam, M., Jornvall, H., Bergman, T. 1996. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. FEBS Letters. 1996. 380: 29–32.
80. Sampaio, S.C., Sousa-e-Silva, S., Borelli, P., Curi, R. and Cury Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. Journal of Leukocyte Biology. 2001. 70: 551–558.
81. Cardoso, D. F., Mota, I. Effect of Crotalus durissus terrificus venom on the humoral and cellular immune response. Toxicon 1997. 35: 607–612.
82. Peterson, M.E. Snake Bite: Coral Snakes. Clin Tech Small Anim Pract. 2006. 21:183-186.

83. Salem, H.F., Fahmy, A and Ali, H.M. Extended Immunization of Rats using Microencapsulated Cobra Venom. British Journal of Pharmacology and Toxicology.2011. 2: 43-50.
84. Sriprapat, S., Aeksowan, S., Sapsutthipas, S., Chotwiwatthanakun, C., Suttijitpaisal, P., et al. The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. Toxicon. 2003. 41: 57–64.