

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE ALBÚMINA  
EQUINA SOBRE EL TIEMPO DE RECUPERACIÓN DEL VOLUMEN  
PLASMÁTICO, LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y LA  
QUÍMICA SÉRICA DE CABALLOS PRODUCTORES DE PLASMA  
HIPERINMUNE

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado  
en Microbiología, Parasitología, Análisis Clínicos e Inmunología para optar por el grado y  
título de Maestría Académica en Microbiología

ROSE MARY HUERTAS SEGURA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica  
2019

## **Dedicatoria**

A mi familia, el pilar que me sostiene y me acompaña en este desafío diario que llamamos vida; mis metas, logros y fracasos siempre han sido apoyados por ellos. Mami, no me alcanzaré la vida para retribuir todo lo que nos das a diario, gracias por estar siempre atenta, por acercar otra luz a mi escritorio, por alimentarme en mis periodos de inspiración, por darme aliento en momentos de angustia, por aplaudir el solo intento de no desistir, gracias por siempre creer en mí.

Este logro es para ti...mí heroína, mi Mamá.

## **Agradecimientos**

Con la bendición de Dios, mi vida siempre ha estado acompañada de grandes seres humanos, quienes de una u otra forma han contribuido al logro de muchas de las metas impuestas. Desde el inicio hasta el final de este trabajo, conté con la colaboración, el empuje y la confianza por parte de mi Tutor y Asesoras, Memo, Mariángela y Laura, gracias por no dejarme desistir, por confiar en mí, gracias por todo.

A mis compañeros y amigos, Laura, Andrés y Grettel, por ustedes es que esto fue posible, su apoyo fue muchas veces, mi único motor.

A Vicky (Virginia Carmona) por ser mi ángel salvador, siempre con disposición para ayudarme, mil gracias.

Agradezco el financiamiento por parte de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica mediante el proyecto 741-B5-105, titulado “Desarrollo y Evaluación de la Calidad de una Formulación Terapéutica de Albúmina Equina y Estudio de su Eficacia en un Modelo Equino”, así como el apoyo financiero y técnico del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Análisis clínicos e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.”



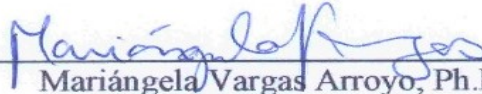
---

Ph.D. Steve Quirós Barrantes  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**



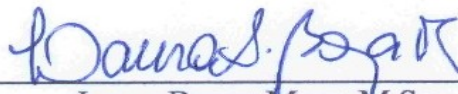
---

Guillermo León Montero, Ph.D.  
**Director de Tesis**




---

Mariángela Vargas Arroyo, Ph.D.  
**Asesora**



---

Laura Bouza Mora, M.Sc.  
**Asesora**



---

M.Sc. Marianela Vargas Umaña  
**Representante del Director Programa de Posgrado en Microbiología,  
Parasitología, Análisis Clínicos e Inmunología**



---

Rose Mary Huertas Segura  
**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDOS

	pág.
Portada.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hojas de aprobación.....	iv
Tabla de contenidos.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Cuadros.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. ANTECEDENTES.....	01
1.1. Inmunización y sus efectos en animales productores de plasma hiperinmune.....	01
1.2. Sangría y sus efectos en los animales productores de plasma hiperinmune.....	04
1.3. Generalidades de la albúmina.....	07
1.3.1. Soluciones inyectables de albúmina humana (SIAH).....	08
1.3.2. Soluciones inyectables de albúmina equina (SIAE).....	10
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVO GENERAL.....	14
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1. Consideraciones éticas.....	15
5.2. Animales de experimentación.....	15
5.3. Albúmina inyectable (SIAE).....	16
5.4. Sangría, autotransfusión y administración de albúmina.....	16
5.5. Electrofisiología cardiaca.....	17
5.6. Determinación del volumen plasmático.....	17
5.7. Hematología.....	18
5.8. Bioquímica sérica.....	19

5.9. Estadística.....	19
6. RESULTADOS.....	21
6.1. Estimación del volumen plasmático por el método del Azul de Evans.....	21
6.2. Efecto de la sangría sobre la electrofisiología, hematología y química sérica.....	22
6.3. Efecto del tratamiento con albúmina en la recuperación de los caballos.....	27
6.3.1. Recuperación de caballos del grupo control.....	27
6.3.2. Recuperación de caballos del grupo de prueba.....	42
7. DISCUSIÓN.....	47
7.1. Estimación del volumen plasmático por el método del Azul de Evans.....	47
7.2. Efecto de la sangría sobre la electrofisiología, hematología y química sérica.....	48
7.3. Efecto del tratamiento con albúmina en la recuperación de los caballos.....	50
8. CONCLUSIONES.....	55
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	56
10. REFERENCIAS.....	57

## **Resumen**

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración intravenosa de una solución de albúmina, sobre el tiempo de recuperación de caballos productores de plasma hiperinmune luego de ser sometidos a una sangría de escala industrial. Se encontró que, a pesar de los grandes volúmenes de sangre extraídos, la sangría produjo alteraciones mínimas en la electrofisiología cardíaca, la hematología y la bioquímica sérica de los caballos. Aunque las diferencias de algunos parámetros hematológicos y bioquímicos, antes y después de la sangría, resultaron ser estadísticamente significativos, la mayoría fueron clínicamente irrelevantes. Esta población de animales presentó valores basales altos de GGT, probablemente como consecuencia de la inmunización con venenos de serpiente; y valores altos de CK, posiblemente por su manejo en pastoreo a campo abierto. Consecuentemente, la recuperación luego de la sangría no requirió de un periodo de reposo prolongado. La administración intravenosa de albúmina no aceleró la recuperación de los caballos. Por el contrario, su administración provocó reacciones adversas tempranas y algún grado de afectación a nivel hepático. Se concluyó que la administración de albúmina intravenosa no es útil para acelerar la recuperación de los caballos sometidos a sangría industrial para la producción de plasma hiperinmune, pero no se descarta su empleo para la atención de otras patologías equinas.

## **Abstract**

This work evaluated the effect of the intravenous administration of an albumin solution on the recovery time of hyperimmune plasma producing horses after being under industrial scale bleeding. It was found that, in spite of the large volumes of blood extracted, the bleeding produced minimal alterations in cardiac electrophysiology, hematology and serum biochemistry of horses. There were statistically significant differences of some hematological and biochemical parameters, before and after bleeding, but none of them were clinically relevant. This population of animals presented high baseline gamma-glutamyltransferase values, probably because of previous immunizations with snake venoms; and high values of creatine kinase, possibly due to its management in open field grazing. Subsequently, recovery after bleeding did not require a prolonged period of rest. The intravenous administration of albumin did not accelerate the recovery of the horses. In contrast, this administration caused early adverse reactions and some degree of liver damage. It was concluded that the administration of intravenous albumin is not useful to accelerate the recovery of horses exposed to industrial bleeding for the production of hyperimmune plasma. It is recommendable to carry out specific studies for the use of albumin for treatment of other equine pathologies.



## **Lista de cuadros**

	pág.
<b>Cuadro 1:</b> Relación entre el volumen de plasma total y plasma extraído de los caballos.....	21
<b>Cuadro 2:</b> Estimación del volumen de plasma extraído mediante el Azul de Evans.....	22
<b>Cuadro 3:</b> Signos vitales durante el primer y segundo día de sangría industrial.....	23
<b>Cuadro 4:</b> Hematología y bioquímica sérica antes y después de la sangría.....	26

## Lista de figuras

	pág.
<b>Figura 1:</b> Lesión local de un caballo inmunizado con una mezcla de venenos de <i>B. asper</i> , <i>C. simus</i> y <i>L. stenophrys</i> para la producción de un antiveneno poliespecífico.....	02
<b>Figura 2:</b> Electrocardiograma de un caballo durante el primer día de sangría.....	23
<b>Figura 3:</b> Volumen plasmático durante el periodo de recuperación de los caballos.....	28
<b>Figura 4:</b> Hematocrito durante el periodo de recuperación de los caballos.....	29
<b>Figura 5:</b> Concentración de hemoglobina durante el periodo de recuperación de los caballos.....	29
<b>Figura 6:</b> Concentración de leucocitos durante el periodo de recuperación de los caballos.....	30
<b>Figura 7:</b> Concentración de albúmina durante el periodo de recuperación de los caballos.....	31
<b>Figura 8:</b> Concentración de proteína total durante el periodo de recuperación de los caballos.....	32
<b>Figura 9:</b> Concentración de sodio durante el periodo de recuperación de los caballos.....	34
<b>Figura 10:</b> Concentración de potasio durante el periodo de recuperación de los caballos.....	34
<b>Figura 11:</b> Concentración de cloruro durante el periodo de recuperación de los Caballos.....	35
<b>Figura 12:</b> Concentración de creatinina durante el periodo de recuperación de los Caballos.....	37
<b>Figura 13:</b> Concentración de nitrógeno ureico durante el periodo de recuperación de los caballos.....	37
<b>Figura 14:</b> Concentración de AST durante el periodo de recuperación de los caballos.....	38

<b>Figura 15:</b> Concentración de fosfatasa alcalina durante el periodo de recuperación de los caballos.....	38
<b>Figura 16:</b> Concentración de GGT durante el periodo de recuperación de los caballos.....	39
<b>Figura 17:</b> Concentración de haptoglobina durante el periodo de recuperación de caballos.....	39
<b>Figura 18:</b> Concentración de CK durante el periodo de recuperación de los caballos.....	40
<b>Figura 19:</b> Concentración de glucosa durante el periodo de recuperación de los caballos.....	40
<b>Figura 20:</b> Concentración de colesterol durante el periodo de recuperación de los caballos.....	41
<b>Figura 21:</b> Concentración de triglicéridos durante el periodo de recuperación de los Caballos.....	41
<b>Figura 22:</b> Salpullido generalizado presentado en los caballos del grupo de prueba (B y C), en comparación con el estado mostrado por los caballos del grupo control (A y C).....	42

## **Lista de abreviaturas**

°C: grados centígrados

ACD: anticoagulante ácido cítrico/citrato/dextrosa

AE: azul de Evans (colorante)

AEI: albúmina equina intravenosa

ALP: fosfatasa alcalina (siglas en inglés)

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa

BUN: nitrógeno ureico (siglas en inglés)

CK: creatin-quinasa

Cl<sup>-</sup>: ion cloruro

CREA: creatinina

DEA: dietanolamina

ECG: Electrocardiograma

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

g/dL: gramos por decilitro

GGT: gama-glutamyl-transferasa

i.e.: del latín, es decir

K<sup>+</sup>: ion potasio

kDa: kilodalton

Kg: kilogramos

L: litro

Lpm: latidos por minuto

mEq/L: miliequivalente por litro

mg: miligramos

mmHg: milímetros de Mercurio

mol/L: moles en un litro de solución

Na<sup>+</sup>: ion sodio

NAC: N-acetilcisteína

PEG: polietilenglicol

RFU: Unidades Relativas de Fluorescencia

r.p.m.: revoluciones por minuto

S DFA fraccionamiento de plasma en sistemas de dos fases acuosas

SIAE: Soluciones inyectables de albúmina equina

SIAH: Soluciones inyectables de albúmina humana

SpO<sub>2</sub>: saturación porcentual de oxígeno

## 1. ANTECEDENTES

Los antivenenos empleados para el tratamiento de los accidentes ofídicos son formulaciones de inmunoglobulinas purificadas a partir del plasma de animales (e.g. caballos u ovejas) que han sido inmunizados con veneno de serpiente (Gutiérrez et al., 2011). Tanto el proceso de inmunización como el de sangría para la obtención de plasma afectan el estado físico de los animales productores de plasma hiperinmune (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a, 1997b; León et al., 1999). Por eso, ambos procesos deben ser diseñados y ejecutados priorizando la salud del animal sobre su productividad.

### 1.1. Inmunización y sus efectos en animales productores de plasma hiperinmune.

Normalmente, la inmunización de animales con veneno de serpiente se realiza mediante la inyección de pequeñas cantidades de veneno mezclado con adyuvantes (i.e. emulsiones o sales minerales), en dosis repetidas a lo largo del tiempo (León et al., 2011). Sin embargo, al mismo tiempo que se estimula al sistema inmune para que produzca anticuerpos contra las toxinas ofídicas, se expone a los tejidos del animal a sufrir daño local y sistémico ocasionado por los componentes del veneno (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a; León et al., 1999; Waghmare et al., 2014).

La especie de animal mayormente seleccionada para la inmunización es el caballo, debido a la facilidad de manejo y de los grandes volúmenes de sangría que permite (León et al., 2011). Se ha observado que durante la primo-inmunización, caballos inyectados por la vía subcutánea con cantidades crecientes (i.e. desde 1,5 hasta 50 mg) de una

mezcla de los venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenophrys* desarrollaron lesiones de severidad moderada en el sitio donde el veneno fue inyectado (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a; León et al., 1999; Figura 1).

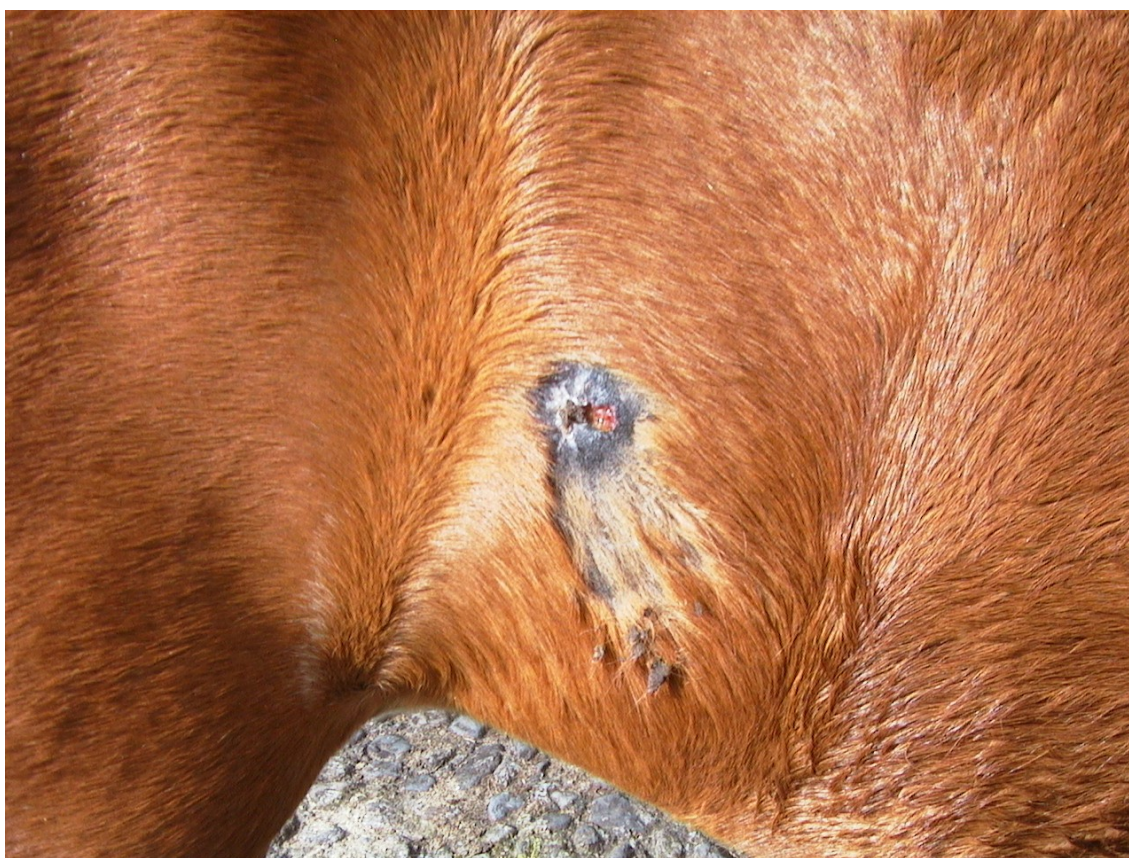


Figura 1: Lesión local de un caballo inmunizado con una mezcla de venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys* para la producción de un antiveneno poliespecífico.

Estas lesiones son caracterizadas por un edema que luego da lugar a la formación de abscesos. Más adelante, estos abscesos titulizan, exponiendo el tejido dañado a infecciones secundarias que pueden complicar la cicatrización final (Estrada et al., 1992; León et al., 1999). La mezcla de los venenos con quelantes de iones divalentes es una estrategia que ha sido usada para reducir el daño local durante la inmunización (León et al., 1999), ya que estos quelantes son capaces de inactivar a las metaloproteinasas

responsables de producir la mayor parte del daño local (Rucavado et al., 2000), sin afectar sus propiedades antigénicas (León et al., 1999). Independientemente de si el veneno fue inactivado o no, los caballos no desarrollaron efectos sistémicos de envenenamiento (i.e. coagulopatía o hemorragia; Estrada et al., 1992; León et al., 1999).

En sangre, los caballos inmunizados con esta mezcla de veneno experimentan a nivel sanguíneo un incremento moderado de la cantidad de neutrófilos y linfocitos, manteniendo invariable el tiempo de protrombina y la concentración de plaquetas (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a; Waghmare et al., 2014). Además, estos caballos sufren de un descenso del hematocrito y la hemoglobina, que, al no estar acompañado de signos de hemólisis intravascular o sangrados sistémicos, ha sido asociado con algún tipo de efecto inhibitor de la hematopoyesis (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a); sin embargo, la comprobación experimental de esta hipótesis aún está pendiente.

Por otro lado, el estudio de la bioquímica sérica de caballos inmunizados con la mezcla de venenos descrita evidenció la inducción de pequeños incrementos en la actividad de la creatina quinasa (CK) y la alanina aminotransferasa (ALT), acompañados por una disminución de la aspartato aminotransferasa (AST). Estos hallazgos han sido identificados como consecuencias del daño tisular producido por el veneno en el sitio de inyección (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a).

También se encontró un incremento en la concentración de lactato, el cual fue relacionado con un aumento del metabolismo anaeróbico, producido como consecuencia de la hipoxia generada en algunos tejidos por una disminución de la perfusión que resulta



del edema y la hemorragia local. Así mismo, se demostró un incremento en la concentración de proteína total, posiblemente relacionada con el aumento en la producción de anticuerpos (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a) y de proteínas de fase aguda.

No se encontró alteraciones en la actividad de la deshidrogenasa láctica, ni de la gama-glutamil-transferasa (GGT) que sugirieran daño hepático u otras alteraciones que sugirieran daño renal (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997a).

#### 1.2. Sangría y sus efectos en los animales productores de plasma hiperinmune.

Los caballos empleados como productores de plasma hiperinmune son sometidos a procesos de extracción de grandes volúmenes de sangre para obtener el plasma que constituye el material de partida en el proceso de purificación de inmunoglobulinas y formulación de antivenenos (León et al., 2018). En un protocolo usual, caballos de 400-450 kg son sometidos a sangría durante tres días consecutivos, colectando en cada sesión un volumen de sangre igual al 2 % de su peso corporal, y alternando las extracciones de sangre con autotransfusiones de los glóbulos rojos separados del plasma colectado el día anterior (Angulo et al., 1997b). Se ha demostrado que los glóbulos rojos extraídos empleando anticoagulantes como el ACD (i.e. ácido cítrico 0.093 mol/L, citrato de sodio 0.197 mol/L y dextrosa 0.6 mol/L) conservan su viabilidad por hasta 35 días a 2 °C – 8 °C (Niinisto et al., 2008). Sin embargo, aspectos como la técnica aséptica durante la sangría y la separación del plasma deben ser realizados cuidadosamente, con el objeto de preservar la integridad de los glóbulos rojos, de modo que sea posible emplearlos en las

autotransfusiones (Feige et al., 2003). A pesar de eso, normalmente, los glóbulos rojos colectados durante el tercer día son descartados (Angulo et al., 1997b).

Como consecuencia de la sangría, se produce una disminución de las concentraciones séricas de sodio y potasio (Angulo et al., 1997b). Para contrarrestar este desbalance electrolítico, es frecuente que la dieta de los animales sea suplementada con sales y que luego de la autotransfusión del tercer día, los caballos sean hidratados por la administración intravenosa de 10 L de lactato de Ringer (i.e.  $\text{Na}^+$  130 mEq/L,  $\text{K}^+$  4 mEq/L,  $\text{Ca}^{2+}$  4 mEq/L,  $\text{Cl}^-$  111 mEq/L y lactato 27 mEq/L; Angulo et al., 1997b).

Algunos estudios indican que, en comparación con los métodos convencionales de sangría, la plasmaféresis automatizada permite la colecta de mayores cantidades de plasma, con mejor perfil microbiológico y menor contaminación con células sanguíneas (Gordon et al., 1986; Becht y Gordon, 1987; Morris, 1987; Feige et al., 2003). No obstante, mientras algunos reportes indican que de cuatro y 11 litros podrán ser producidos empleando plasmaféresis automatizada (Magdesian et al., 1992; Feige et al., 2003), los resultados no publicados del ICP demuestran que los métodos de sangría convencionales para un caballo, dependiendo de su tamaño, pueden producir entre ocho litros y diez litros de plasma por sangría. Además, dependiendo del título del animal y de la formulación del producto, cada litro de plasma equino puede traducirse en 30 a 40 viales de antiveneno.

Luego de la plasmaféresis automatizada, los caballos presentan un aumento moderado del hematocrito (Feige et al., 2005). Debido a que en el proceso los animales reciben una cantidad de lactato de Ringer igual a la del plasma cosechado, es poco

probable que este fenómeno se deba a deshidratación. Los autores indican que el aumento del hematocrito podría deberse a una liberación esplénica de eritrocitos por estrés. Sin embargo, también consideran que podría deberse a la salida de líquidos del espacio intravascular causada por la pérdida de presión oncótica (Magdesian et al., 1992; Feige et al., 2005).

Los caballos sometidos a sangría o plasmaféresis automatizada reducen su concentración de proteína sérica (Angulo et al., 1997b; Feige et al., 2005). Sin embargo, esta disminución presenta una magnitud menor a la esperada de acuerdo con la cantidad de plasma extraído (Feige et al., 2005). Se cree que esto sucede por la reposición de la albúmina plasmática extraída por albúmina proveniente de las reservas de albumina extravascular, que constituye más del 65 % de la albúmina corporal total (Kaneko, 1989).

Se estima que cerca de 25 días son requeridos para que los caballos recuperen su concentración plasmática de proteína total (Magdesian et al., 1992), y de entre 30 a 50 días para reponer por completo sus reservas de albúmina extravascular (Fleck and Colley, 1984; Magdesian et al., 1992). Por eso, algunos autores recomiendan que las plasmaféresis no sean realizadas con mayor frecuencia a la de una vez cada 30 días (Magdesian et al., 1992; Malikides et al., 2001; Feige et al., 2005).

En el caso de los caballos productores de plasma para la elaboración de antivenenos, estos se dejan reposar por ocho semanas para que repongan su condición física, hematológica y bioquímica sérica, antes de ser sometidos a la siguiente sangría. Sin embargo, la dinámica de recuperación de estos animales durante el periodo de descanso no ha sido estudiada en detalle (León et al., 2015). No existe evidencia de que

este tiempo sea insuficiente o excesivo para que la recuperación de los caballos se complete.

El tiempo máximo que tardan los caballos en recuperarse luego de una sangría determina el mayor número de sangrías a las que los animales pueden ser sometidos en un periodo particular, sin desmejorar su estado físico. Establecer este lapso es importante porque permite maximizar la productividad de plasma y reducir los costos de producción de los antivenenos; lo que permitiría poner los antivenenos a disposición de más comunidades, mismas que los requieren a un menor costo. En ese sentido, se ha sugerido que la administración de albúmina equina intravenosa (AEI) podría acelerar la recuperación de los caballos y así mejorar su productividad de plasma.

### 1.3. Generalidades de la albúmina.

La albúmina es una proteína de 67 kDa que apareció por primera vez en los vertebrados más primitivos, según lo indica su trazado evolutivo hasta los peces teleósteos. Por eso, en la actualidad es posible encontrarla en peces, reptiles, aves y mamíferos (McLachlan y Walker, 1977; Bujacz, 2012). Entre las funciones principales de la albúmina se encuentran el mantenimiento de la presión oncótica, la regulación del pH plasmático, la modulación inmunológica, y el transporte de calcio, hormonas tiroideas, hormonas liposolubles, ácidos grasos libres y bilirrubina no conjugada (Hrkal y Klementova, 1984; Simard et al., 2006).

La albúmina es sintetizada por el hígado y se encuentra en el plasma sanguíneo de mamíferos a concentraciones de entre 2,7 y 5,1 g/dL dependiendo de la especie (Meneses-Guevara & Bouza-Mora, 2014). Debido a que el punto isoeléctrico de la

albúmina se encuentra entre 4,7 y 4,9 g/dL, su carga a pH fisiológico es negativa, lo que facilita la atracción de moléculas de sodio y agua. Además, es repelida por la membrana basal del glomérulo renal que también posee carga negativa. Esta es la razón por la cual, en estado fisiológico normal, la albúmina no es filtrada a nivel renal (Dane et al., 2013; García-Martínez et al., 2013).

Estudios cristalográficos han revelado que la albúmina tiene una estructura terciaria en forma de corazón con un alto contenido helicoidal y tres dominios homólogos, cada uno compuesto por dos subdominios. Esta estructura estable y flexible, posee diferentes sitios de unión que permiten contribuir a la solubilización, el transporte y metabolismo de muchos compuestos, además de su capacidad antioxidante (Roche et al., 2008).

El aumento en la concentración sérica de albúmina puede ocurrir como producto de la deshidratación. Por otro lado, la disminución de la concentración sérica de albúmina puede deberse a enfermedades genéticas, a causas que disminuyen su síntesis (i.e. enfermedades hepáticas, desnutrición, síndrome de mala absorción y diarreas), o a causas que aumentan su eliminación (i.e. síndrome nefrótico, quemaduras graves; García-Martínez et al., 2013). Como consecuencia de la disminución de la albúmina sérica se produce la extravasación del plasma y edema, lo cual puede llegar a ser particularmente importante a nivel pulmonar y gastrointestinal (García-Martínez et al., 2013).

### 1.3.1. Soluciones inyectables de albúmina humana (SIAH).

Las soluciones inyectables de albúmina humana (SIAH) son formulaciones que se preparan a partir de plasma sanguíneo de donadores sanos, mediante técnicas de

separación de proteínas, adaptadas a la escala industrial. Tradicionalmente, las SIAH han sido producidas empleando metodologías basadas en la técnica de Cohn, la cual consiste en la precipitación diferencial/selectiva de las proteínas plasmáticas, con etanol frío (Cohn et al., 1946; More y Harvey, 1991; Tanaka et al., 1998).

Otro método utilizado es el método de Schneider, también conocido como desnaturalización térmica diferencial o termocoagulación selectiva, el objetivo de esta técnica es la obtención de albúmina únicamente, ya que el proceso se lleva a cabo elevando la temperatura cercana a los 70 °C, temperatura a la cual todas las demás proteínas plasmáticas sufren desnaturalización. Esta técnica emplea agentes como el caprilato de sodio y el N- acetil triptofanato de sodio para mantener la estabilidad de la albúmina a dichas temperaturas (Vargas-Arroyo, 2006).

En los últimos años se han desarrollado métodos que incluyen otros tipos de técnicas, como la separación en dos fases acuosas complementada con la termocoagulación selectiva (Vargas et al., 2012; 2015a). Otros investigadores han propuesto el desarrollo de metodologías para la producción de albúmina recombinante (Zhang et al., 2005; Kobayashi 2006).

Normalmente, además de albúmina a una concentración de 5 ó 20 g/dL, las SIAH contienen estabilizantes como caprilato de sodio, acetiltriptofano y glucosa, los cuales se agregan con el fin de prolongar la vida útil del producto y disminuir los requerimientos de las condiciones ambientales en los que debe ser almacenado (Matejtschuk et al., 2000). Debido a que las SIAH se encuentran en el mercado en presentaciones de una dosis por vial (50 mL), estas no incluyen preservantes (Matejtschuk et al., 2000).

Las propiedades farmacológicas de la albúmina están directamente relacionadas con sus funciones. Por eso, la administración intravenosa de SIAH se emplea en el tratamiento del síndrome hipovolémico por hemorragias, quemaduras y diarreas, reversión del colapso cardiovascular, síndromes infecciosos tóxicos, hipoproteinemias de diferentes causas como el síndrome nefrótico y/o desnutrición, y alteraciones hepáticas como la cirrosis o hepatitis B (Demling, 1987, Offringa, 1998).

Es importante considerar que el uso de albúmina puede causar morbilidad consecuente con su aplicación, esto debido mayoritariamente a la velocidad de administración. Luego de una reposición rápida de un 20 % de albúmina se puede producir un aumento en la retención de volumen de hasta unas cuatro veces, causando edema pulmonar intersticial y consecuentemente una disminución en la oxigenación tisular.

Además, la suplementación de la albúmina tiene efectos antihemostáticos y antiplaquetarios (inhibe la agregación) lo que puede incrementar la pérdida sanguínea en pacientes con compromiso posquirúrgico o postraumático. Por último, en pacientes hipovolémicos se puede complicar la condición al afectar la excreción de sodio y agua (Offringa, 1998).

### 1.3.2. Soluciones inyectables de albúmina equina (SIAE).

De forma homóloga a las SIAH, existen soluciones inyectables de albúmina equina (SIAE), las cuales pueden ser producidas a partir del plasma de caballos donadores,

empleando métodos de purificación como la precipitación con sulfato de amonio (Belli et al., 2013) y el fraccionamiento de plasma en sistemas de dos fases acuosas (SDFAs; Vargas et al., 2015b).

La purificación de albúmina mediante SDFAs es realizada por la mezcla del plasma equino con fosfato de potasio y polietilenglicol (PEG 3350). Como resultado se forman dos fases acuosas inmiscibles: una fase inferior salina y otra fase superior polimérica (Vargas et al., 2015b). La albúmina, junto con otras proteínas como la transferrina y la 1-antitripsina, quedan disueltas en la fase inferior salina. Por su parte, las inmunoglobulinas, la ceruloplasmina, el fibrinógeno y el plasminógeno precipitan en la fase polimérica (Vargas, 2015b).

Las proteínas disueltas en las fases salina y polimérica pueden ser separadas por centrifugación o filtración. En este punto la albúmina recuperada constituye cerca del 66 % de la proteína total en la solución. Sin embargo, la pureza de la albúmina puede ser mejorada incorporando al método pasos adicionales de purificación como la termocoagulación y la cromatografía de intercambio iónico (Vargas, 2015b).

La administración de sangre o plasma es una práctica habitual de los cuidados intensivos en caballos (Morris, 1987). Plasma o SIAE se han empleado en el tratamiento de caballos con hipoproteinemia aguda secundaria a cólicos y otros trastornos gastrointestinales (Belli et al., 2013; Bellezo et al., 2014). Aunque en algunos casos la administración de derivados plasmáticos es preferida, su uso está limitado por la poca disponibilidad de estos productos en el mercado (Tennent-Brown, 2011). La SIAE podría aplicarse para la reposición del volumen plasmático de los caballos, reposición de



volumen mediante terapia de fluidos, atención de caballos deshidratados posterior al ejercicio, heridas y/o quemaduras.

En el caso particular del presente trabajo, el uso de albúmina equina en caballos que son empleados como fuente de plasma hiperinmune para la producción de antivenenos ofídicos, podría acelerar su recuperación luego del proceso de sangría industrial. Considerando ciclos productivos de ocho semanas, una reducción de dos semanas en el periodo de descanso de estos caballos sería suficiente para que cada animal aumentara su producción anual en más del 10 %. El aumento en la productividad se vería reflejado en la producción de más viales de antiveneno por cada caballo en un periodo determinado, pero también en la reducción de los costos de producción y eventualmente en el precio de los productos.

## 2. HIPÓTESIS:

La administración intravenosa de albúmina equina acelera la recuperación del volumen plasmático, de los parámetros hematológicos y de química sérica, en los caballos que son sometidos a sangrías industriales para la producción de antivenenos.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que tiene la administración intravenosa de albúmina sobre el volumen plasmático equino y los parámetros hematológicos y de química sérica, para evaluar si esta práctica disminuye el tiempo de recuperación de los animales que son sometidos a sangrías industriales durante la producción de antivenenos ofídicos.

### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1. Comparar la medición directa del volumen plasmático extraído de caballos durante las sangrías industriales con el valor calculado indirectamente por el método del Azul de Evans, para determinar el grado en que este método indirecto aproxima los verdaderos valores de volumen plasmático.
- 4.2. Comparar la electrofisiología cardíaca, el perfil bioquímico sérico y los valores hematológicos (incluyendo el volumen plasmático) de caballos, antes y después de ser sometidos a sangrías industriales, para establecer el grado en que el esquema de sangría afecta estos valores y determinar el tiempo que tardan estos animales en restablecer su condición basal.
- 4.3. Comparar el tiempo de recuperación de caballos luego de ser sometidos al proceso de sangría industrial, cuando se les administra y cuando no se les administra albúmina equina, para determinar si esta práctica acelera el restablecimiento de la condición basal en estos animales.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Consideraciones éticas

Este proyecto cumplió con los Principios de la Guía Internacional para la Investigación Biomédica que involucra Animales (CIOMS, 1985) y las Guías ARRIVE para el Reporte de experimentos *in vivo* (Kilkenny et al., 2011). Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales de experimentación en este estudio fueron aprobados por el Comité para el Uso y Cuido de Animales de Laboratorio (CICUA) de la Universidad de Costa Rica, en su sesión número 139, según consta en el oficio CICUA-28-14.

### 5.2. Animales de experimentación.

Se empleó seis caballos criollos, de ambos sexos, con peso corporal de 400-450 kg, empleados rutinariamente para la producción del antiveneno EchiTAb-plus-ICP (Gutiérrez et al., 2005). Otros tres caballos mantenidos en la misma finca para acarrear materiales fueron empleados como controles normales (i.e. animales no inmunizados ni sometidos a sangrías industriales). Durante todo el proceso experimental, los animales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum*, mediante una técnica de pastoreo en potreros sembrados con forraje del tipo Ray-grass, complementado con alimento peletizado enriquecido con proteínas, vitaminas y minerales.

### 5.3. Albúmina inyectable (SIAE)

Se utilizó una solución estéril y libre de endotoxinas, de albúmina equina a una concentración del 10 % y con una pureza del 60 %, obtenida mediante el fraccionamiento de plasma equino en un sistema de dos fases acuosas (Vargas et al., 2015b).

### 5.4. Sangría, autotransfusión y administración de albúmina.

Un grupo de seis caballos periódicamente inmunizados con los venenos de las serpientes *Echis ocellatus*, *Bitis arietans*, *Naja nigricollis* y *Dendroaspis polylepis*, fue retirado de la rutina de producción durante cuatro meses. Posteriormente, sin aplicar el esquema de inmunización, estos animales fueron sometidos a una sangría industrial durante tres días consecutivos. En el primer día, ocho litros de sangre fueron colectados de cada animal empleando una bolsa de sangría de polipropileno conteniendo 400 mL de ACD. La sangre anticoagulada se dejó sedimentar por 18 h a 2-8 °C, para luego separar los glóbulos rojos sedimentados del plasma sobrenatante por decantación aséptica, con la ayuda de una prensa hidráulica. El plasma fue suplementado con timerosal 0.005 % y almacenado a 2-8 °C. Por su parte, los glóbulos rojos fueron resuspendidos en 3 L de una solución estéril de NaCl 0.9 % y atemperados a 37 °C. El segundo día, se siguió un procedimiento de sangría similar al del primer día, solo que al final, los glóbulos rojos atemperados que fueron extraídos el día anterior se transfundieron al caballo correspondiente. El procedimiento del tercer día fue similar al del segundo día, solo que el volumen de sangre extraído fue de solo cuatro litros (Angulo et al., 1997b). Luego de la autotransfusión del tercer día, tres caballos que conformaron el “grupo de prueba”

recibieron la administración intravenosa de albúmina equina a una dosis de 2 g/kg. Los otros tres caballos fueron conservados como “grupo control”. Un tercer grupo, conformado por tres caballos que siendo mantenidos en la misma finca nunca habían sido sometidos a inmunizaciones o sangrías periódicas, fue empleado como “grupo normal”.

#### 5.5. Electrofisiología cardiaca.

Se utilizó un monitor cardiaco con posibilidad de medición de frecuencia cardiaca, oximetría de pulso y presión arterial modelo Cardell Max-1. Para el control de oxigenación se habilitó una vía central en la arteria mandibular. Para la obtención de la derivación base-ápex se colocó el electrodo positivo en el quinto espacio intercostal del lado izquierdo, a la altura del codo; el electrodo neutro sobre la espalda, en un punto alejado del corazón; y el electrodo negativo en la piel del surco yugular derecho, a dos tercios de distancia en el trayecto desde la rama mandibular derecha hasta la entrada del pecho (Mira et al., 2016). Periódicamente los electrodos fueron rociados con alcohol para favorecer el traspaso eléctrico desde el animal. Este procedimiento se realizó momentos antes del inicio de la sangría y se mantuvo durante todo el proceso hasta finalizar la recolección de sangre y realizar las transfusiones.

#### 5.6. Determinación del volumen plasmático

Se determinó el volumen plasmático de los caballos (grupo control y grupo de prueba) antes y después de los tres días de sangría, y posteriormente, una vez a la semana durante siete semanas. En cada determinación se colectó una muestra basal de sangre en tubos heparinizados. Luego, los caballos fueron inyectados en la vena yugular con

colorante de Azul de Evans a una dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso de caballo. Una hora después, de la yugular opuesta a la usada para la inyección del colorante se colectó una segunda muestra de sangre. El plasma de ambas muestras (i.e. la muestra basal y la muestra colectada después de la inyección de Azul de Evans) fue separado por centrifugación. La concentración del colorante en plasma fue analizada registrando la fluorescencia en un lector Cytation 3 Imaging Reader (Biotek), con longitudes de onda de excitación y emisión de 470 y 680 nm, respectivamente. El valor de las Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) de las muestras fue calculado empleando una curva de calibración construida con las RFUs de diferentes patrones de colorante disuelto en suero equino, en función de su concentración. El valor resultante de la concentración de Azul de Evans fue corregido por la concentración basal de Azul de Evans previo a la inyección de este. Finalmente, el volumen plasmático se calculó como el cociente de la masa de Azul de Evans inyectada entre la diferencia de las concentraciones de colorante en las muestras basales y las colectadas después de la inyección del colorante.

#### 5.7. Hematología.

Muestras de sangre fueron colectadas por venopuntura yugular empleando tubos con EDTA. El hematocrito, la hemoglobina y conteo total de leucocitos de estas muestras fue determinado manualmente, de acuerdo con el protocolo establecido por el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (Meneses-Guevara and Bouza-Mora 2014).

### 5.8. Bioquímica sérica.

Las muestras de sangre fueron tomadas por venopuntura yugular empleando tubos sin anticoagulante. La sangre coagulada se centrifugó a 13 000 r.p.m durante 10 minutos para después separar el suero sobrenatante. Diferentes analitos bioquímicos en las muestras de suero fueron determinados empleando técnicas espectrofotométricas y nefelométricas, con un equipo marca Spinreact modelo Spin 200E. Como parte del protocolo de seguridad analítica, antes de cada montaje se realizó la calibración de cada una de las pruebas y se dispusieron controles de calidad al inicio y al final de cada uno de los montajes. Además, se realizaron montajes por duplicado al azar de algunas muestras y del grupo control, para asegurar la fiabilidad analítica de los resultados obtenidos. En el caso de la fosfatasa alcalina (ALP), se utilizó el método de dietanolamina (DEA), así mismo, el método escogido para la CK fue basado en la reacción de N-acetilcisteína (NAC).

### 5.9. Estadística

La significancia estadística de las diferencias observadas en los valores hematológicos y bioquímicos antes y después de la sangría fue evaluada mediante una prueba *t* de student en muestras pareadas. Por su parte, las diferencias en los valores hematológicos y bioquímicos observadas dentro del mismo grupo a lo largo del periodo de recuperación fueron evaluadas por una prueba no paramétrica de Friedman. Las diferencias en los valores hematológicos y bioquímicos observadas entre los caballos del grupo de prueba y el grupo control, fueron evaluadas mediante un análisis general linear de medidas repetidas, evaluando la homogeneidad de los datos por medio del test de



esfericidad de Mauchly y ajustando la normalidad por medio del valor Greenhouse-Geisser para los grados de confianza. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## 6. RESULTADOS

Un grupo de seis caballos periódicamente inmunizados con venenos de serpiente fue removido del programa de inmunización por cuatro meses para luego ser sometido a tres días consecutivos de sangrías industriales alternadas con autotransfusiones, según se especifica en la sección de materiales y métodos. Luego de las sangrías, los caballos fueron separados en dos grupos de tres animales. El primer grupo fue inyectado con albúmina equina y denominado “grupo de prueba”, mientras que el segundo grupo no recibió ningún tratamiento adicional y fue denominado “grupo control”.

### 6.1. Estimación del volumen plasmático por el método del Azul de Evans

De acuerdo con las mediciones realizadas directamente al plasma separado luego de las sangrías (Cuadro 1),  $(8,1 \pm 0,4)$  L de plasma fueron extraídos de cada caballo, lo que corresponde al  $(29 \pm 1)$  % del total de su plasma.

Cuadro 1: Relación entre el volumen de plasma total y plasma extraído de los caballos.

Caballo	Peso (kg)	Hematocrito (%)	Volumen plasmático teórico (L)*	Volumen de plasma extraído (L)
#50	453	34	30	8,1
#78	445	37	28	8,6
#82	401	35	26	8,0
#90	432	37	27	7,8
#94	422	31	29	8,4
#96	400	38	25	7,4

\*Calculado asumiendo que el volumen de sangre corresponde al 10% de peso del animal.

Por otro lado, con los datos obtenidos mediante la técnica del Azul de Evans (Cuadro 2) pudo calcularse que la cantidad de plasma extraído durante la sangría fue de

( $4,5 \pm 5,5$ ) L, que no es significativamente diferente de los ( $8,1 \pm 0,4$ ) L que realmente fueron extraídos. Sin embargo, la diferencia entre el volumen plasmático antes y después de la sangría, determinada con el método del Azul de Evans tampoco fue significativa ( $t = 1.989$ ;  $gl = 5$ ;  $P = 0.103$ ; Cuadro 2).

Cuadro 2: Estimación del volumen de plasma extraído mediante el Azul de Evans.

Caballo	Volumen plasmático calculado (L)		
	Antes de la sangría	Después de la sangría	Diferencia
#50	31	18	13
#78	28	23	5
#82	18	20	-2
#90	26	27	-1
#94	25	21	4
#96	27	19	8
Promedio	$25,8 \pm 4,4$	$21,3 \pm 3,3$	$4,5 \pm 5,6$

## 6.2. Efecto de la sangría sobre la electrofisiología, hematología y química sérica.

Asumiendo como correcta la propuesta de Marcilese et al., (1964), en la cual el volumen de sangre de los caballos es igual al 10 % de su peso corporal, se calculó que antes de la sangría el volumen de sangre teórico de los animales correspondía a ( $43 \pm 2$ ) L de sangre. La sangría industrial consistió en extracciones de 5 L de sangre durante tres días consecutivos, por lo que en cada día se extrajo ( $12 \pm 1$ ) % del volumen sanguíneo, parte del cual fue repuesto en el segundo y tercer día mediante las autotransfusiones.

Al inicio de la sangría del primer día, los caballos presentaron una frecuencia cardiaca ligeramente aumentada. Sin embargo, esa frecuencia disminuyó rápidamente hasta llegar y mantenerse en los valores de referencia durante el resto del proceso de ese

día. Por su parte, la saturación porcentual de oxígeno ( $SpO_2$ ) disminuyó a lo largo de la sangría, pero sin alcanzar valores que indicaran riesgo de hipoxia (i.e. 90 %). Finalmente, la presión sistólica osciló dentro del intervalo referencial, mientras que la presión diastólica se mantuvo por encima de los valores de referencia desde el principio de la sesión. A lo largo de la sangría no se observó otras alteraciones en los electrocardiogramas de los caballos (Figura 3).

Cuadro 3: Signos vitales durante el primer y segundo día de sangría industrial.

Día	Volumen extraído (L)	Frecuencia cardiaca (lpm)	$SpO_2$ (%)	Presión (mmHg)		
				Sistólica	Diastólica	Media
1	0	$56 \pm 8$	$99 \pm 0$	$148 \pm 5$	$125 \pm 1$	$134 \pm 7$
	2	$46 \pm 5$	ND	$182 \pm 8$	$145 \pm 1$	$160 \pm 8$
	4	$45 \pm 4$	ND	$127 \pm 12$	$104 \pm 2$	$118 \pm 7$
	6	$43 \pm 3$	$94 \pm 1$	$113 \pm 7$	$98 \pm 1$	$104 \pm 3$
2	0	$44 \pm 5$	$93 \pm 2$	$153 \pm 13$	$92 \pm 0$	$119 \pm 1$
	2	$45 \pm 3$	ND	$165 \pm 9$	$97 \pm 1$	$127 \pm 4$
	4	$45 \pm 6$	ND	$159 \pm 11$	$88 \pm 1$	$116 \pm 8$
	6	$43 \pm 7$	$93 \pm 3$	$152 \pm 7$	$90 \pm 3$	$115 \pm 6$
	post-autotransfusión	$45 \pm 6$	$94 \pm 6$	$180 \pm 14$	$92 \pm 2$	$125 \pm 2$

\*Valores de referencia: frecuencia cardiaca de 30 – 50 latidos por minuto (lpm),  $SpO_2$  de 95 - 98 % y presión sanguínea de 83 - 146 / 36 - 93 mmHg.

ND: No determinado.

n = dos caballos.



Figura 2: Electrocardiograma de un caballo durante el primer día de sangría. (A) antes de iniciar la sangría y (B) luego de extraer 5 L de sangre.

Durante la sangría del segundo día y luego de la autotransfusión de glóbulos rojos, los caballos no mostraron alteraciones en la frecuencia cardíaca y mantuvieron valores bajos de SpO<sub>2</sub>. A lo largo de la sesión mostraron valores elevados de presión sistólica que incrementaron aún más después de la autotransfusión; mientras que la presión diastólica se mantuvo dentro del intervalo de referencia (Cuadro 3). La sangría del tercer día no se pudo monitorear.

A diferencia de los glóbulos rojos colectados en el primer y segundo día, los glóbulos rojos extraídos durante el tercer día no fueron transfundidos a los caballos. Por eso, la pérdida de glóbulos rojos resultante al final de los tres días de sangría fue aproximadamente de  $(1,6 \pm 0,1)$  L de glóbulos rojos empacados. Considerando que el hematocrito antes de la sangría era de  $(33 \pm 3)$  %, y asumiendo que el volumen de sangre en un caballo era cercano al 10% de su peso corporal, se pudo calcular que la pérdida de glóbulos rojos pudo haber producido una disminución del  $(3,9 \pm 0,5)$  % del hematocrito y de  $(1,4 \pm 0,2)$  g/dL en la concentración de hemoglobina. A pesar de la extracción de sangre, la concentración de leucocitos no disminuyó. Las variaciones obtenidas experimentalmente para estos valores se indican en el Cuadro 3.

Por otro lado, con la extracción de  $(8,1 \pm 0,4)$  L de plasma se removió de los animales  $(628 \pm 33)$  g de proteína total, de la cual  $(301 \pm 19)$  g correspondieron a albúmina. Con base en el peso de los animales, los valores de hematocrito, los volúmenes de plasma extraído, las concentraciones de albúmina y proteína total antes de la sangría, y obviando el efecto de los mecanismos compensatorios de los caballos, se calculó que la sangría podría producir una disminución de  $(1,1 \pm 0,1)$  g/dL en la concentración de

albúmina y de  $(2,2 \pm 0,1)$  g/dL de proteína total. Sin embargo, los valores obtenidos experimentalmente son más bajos que estas proyecciones teóricas (Cuadro 4).

Antes de iniciar el experimento, los caballos mostraron valores dentro del rango de referencia del sodio, pero los valores de potasio y cloruro se encontraron por debajo del intervalo referencial. Durante la sangría, los caballos desarrollaron hiponatremia leve. Por otro lado, mientras que las concentraciones de potasio no mostraron alteraciones muy pronunciadas respecto al intervalo de valores referenciales a lo largo de la sangría, las concentraciones de cloruro mostraron un incremento, llegando a valores de referencia (Cuadro 4).

Cuadro 4: Hematología y bioquímica sérica antes y después de la sangría<sup>1</sup>.

Parámetro	Antes de la sangría	Después de la sangría	Estadística
Volumen plasma (L)	25,8 ± 4,1	21,3 ± 3,3	t = 1.989; gl = 5; P = 103
Hematocrito (37-48 %)	33 ± 3	32 ± 3	t = 2.746; gl = 4; P = 0.052
Hemoglobina (12-18 g/dL)	12 ± 1	11 ± 1	t = 2.188; gl = 4; P = 0.094
Leucocitos (6000-14000 cel./μL)	10708 ± 1949	11725 ± 1959	t = 1.334; gl = 5; P = 0.240
Albúmina (2,7-3,7 g/dL)	3,7 ± 0,1	3,5 ± 0,1	t = 5.534; gl = 5; P = 0.003*
Proteínas totales (4,1-7,3 g/dL)	7,8 ± 0,3	7,2 ± 0,3	t = 8.216; gl = 5; P < 0.0001*
Sodio (133-141 mEq/L)	141 ± 1	120 ± 2	t = 17.968; gl = 4; P < 0.0001*
Potasio (3,4-4,6 mEq/L)	2,4 ± 1,3	3,2 ± 1,2	t = 0.994; gl = 5; P = 0.366
Cloruro (100-104 mEq/L)	77 ± 1	103 ± 3	t = -24.265; gl = 5; P < 0.0001*
Creatinina (1,0-2,4 mg/dL)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	t = 0.0001; gl = 5; P = 1.000
Nitrógeno ureico (5-22 mg/dL)	21 ± 2	18 ± 2	t = 9.155; gl = 5; P < 0.0001*
AST (150-350 UI/L)	299 ± 46	282 ± 37	t = 3.827; gl = 5; P = 0.012*
Fosfatasa alcalina (< 350 UI/L)	529 ± 120	490 ± 132	t = 2.596; gl = 5; P = 0.048*
GGT (5-18 UI/L)	29 ± 14	24 ± 11	t = 4.438; gl = 5; P = 0.007*
Haptoglobina (27-50 mg/dL)	56 ± 22	56 ± 22	t = 0.208; gl = 5; P = 0.844
CK (< 160 UI/L)	254 ± 35	208 ± 33	t = 2.748; gl = 5; P = 0.040*
Glucosa (76-127 mg/dL)	107 ± 7	115 ± 4	t = 2.879; gl = 5; P = 0.035*
Colesterol (50-143 mg/dL)	98 ± 14	88 ± 10	t = 3.641; gl = 5; P = 0.015*
Triglicéridos (20-34 mg/dL)	16 ± 4	20 ± 5	t = -1.206; gl = 5; P = 0.282

<sup>1</sup>Entre paréntesis se especifica el intervalo de valores referenciales.

\*Valores de P &lt; 0.05.

n = 6 caballos.

A lo largo de la sangría, los caballos presentaron valores dentro del rango de referencia para indicadores de función renal como la creatinina y el nitrógeno ureico (Cuadro 4). También mostraron valores similares a los de referencia para indicadores de enfermedad hepática como la AST, fosfatasa alcalina y GGT (Cuadro 4). Sin embargo, antes y después de la sangría, presentaron valores anormalmente elevados de proteínas de fase aguda como la haptoglobina y de marcadores de destrucción de fibras musculares como la creatina quinasa (Cuadro 4). Además, a lo largo de la sangría y del periodo de recuperación, los caballos del grupo control presentaron valores dentro del rango de referencia para glucosa, colesterol y triglicéridos (Cuadro 4).

### 6.3. Efecto del tratamiento con albúmina en la recuperación de los caballos.

#### 6.3.1. Recuperación de caballos del grupo control.

Empleando la técnica del Azul de Evans no se pudo demostrar diferencias significativas entre los volúmenes plasmáticos antes y después de la sangría (Cuadro 4). En otras palabras, esta técnica no permitió determinar diferencias tan pequeñas como 4,5 L determinadas por ella misma, o incluso diferencias de 8,1 L determinada por la medición directa del plasma extraído.

Consecuentemente, la técnica del Azul de Evans no fue útil para determinar el momento exacto en el que los caballos del grupo control retornaron a su condición basal de volumen plasmático ( $\chi^2 = 7.045$ ; gl = 8; P = 0.532; Figura 3). Sin embargo, la curva obtenida para el grupo control sugiere que los caballos habían regresado a su condición



basal ya para la cuarta semana posterior a la sangría, y en todo caso antes de la séptima semana del periodo de recuperación (Figura 3).

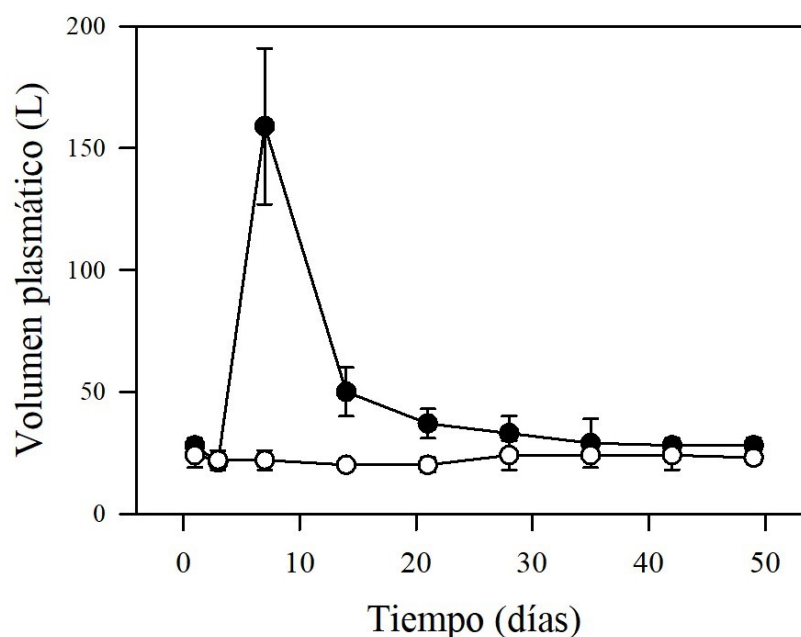


Figura 3: Volumen plasmático durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y grupo de prueba (círculos negros).

Luego de la sangría, los valores de hematocrito de los caballos del grupo control aumentaron para mantenerse con variaciones mínimas dentro de su intervalo de referencia correspondiente ( $\chi^2 = 24.081$ ; gl = 9; P = 0.004; Figura 4). Algo similar sucedió con la hemoglobina ( $\chi^2 = 24.366$ ; gl = 9; P = 0.004; Figura 5). La concentración de leucocitos también varió durante el periodo de recuperación ( $\chi^2 = 18.968$ ; gl = 9; P = 0.025), pero siempre se mantuvo dentro del intervalo referencial (Figura 6). Los caballos considerados normales mostraron valores bajos de hematocrito y hemoglobina, pero valores dentro del rango referencial para la cantidad de leucocitos (Figuras 4, 5 y 6).

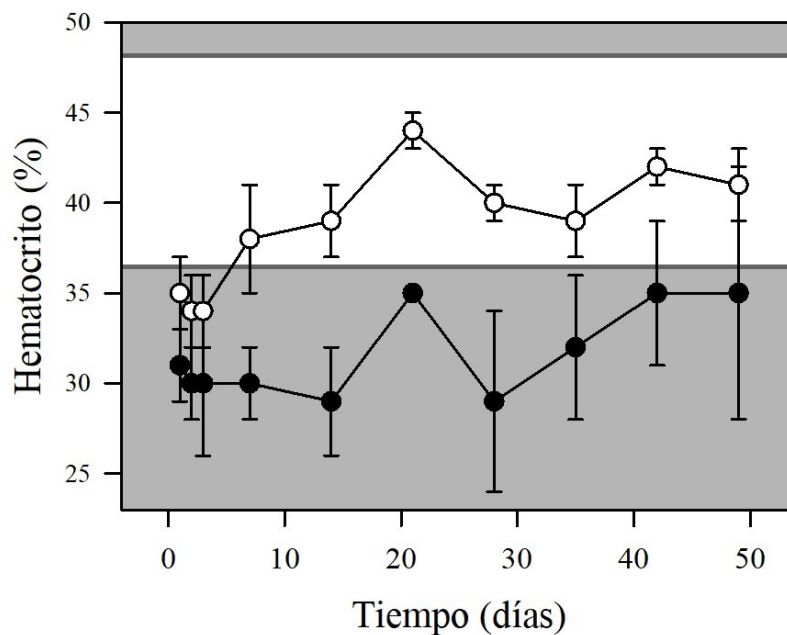


Figura 4: Hematocrito durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores referenciales. El valor de hematocrito en el grupo normal fue de  $(33 \pm 2) \%$ .

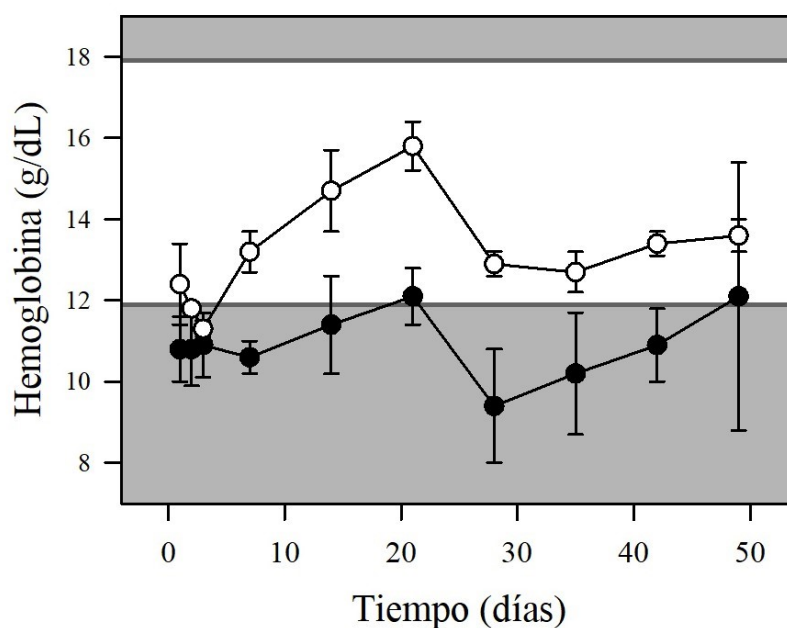


Figura 5: Concentración de hemoglobina durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores referenciales para equinos. La concentración de hemoglobina en el grupo normal fue de  $(11 \pm 1) \text{ g/dL}$ .

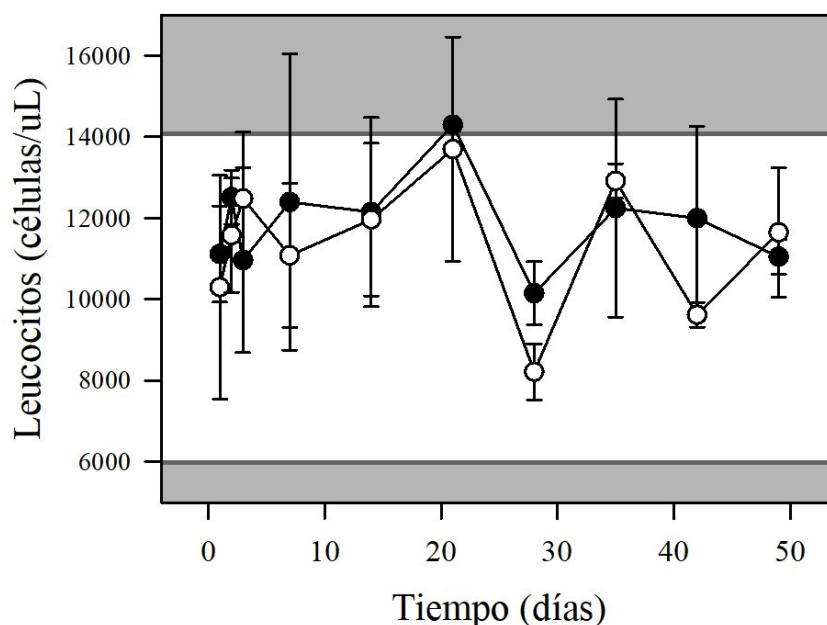


Figura 6: Concentración de leucocitos durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de leucocitos en el grupo normal fue de  $(9933 \pm 10)$  cel./ $\mu$ L.

Luego de la sangría, la concentración de albúmina de los caballos del grupo control no varió significativamente ( $\chi^2 = 15.662$ ; gl = 9; P = 0.074) y mostró valores similares a los valores iniciales en la segunda semana posterior a la sangría (Figura 7). Los cambios observados en las concentraciones de proteína total sí fueron significativos ( $\chi^2 = 23.511$ ; gl = 9; P = 0.005) pero alcanzaron a los valores basales en la tercera semana posterior a la sangría (Figura 8). Una vez alcanzados los valores iniciales, las concentraciones de albúmina y proteína total se mantuvieron estables por el resto del periodo de descanso (Figuras 7 y 8).

Mientras que en todo momento la concentración de albúmina de los caballos del grupo control se mantuvo cerca del intervalo de referencia (Figura 7), la concentración de

proteína total estuvo por encima de este intervalo desde antes de la sangría, condición que se asocia a periodos de deshidratación o hemoconcentración (Marichal C. y Hernández M., 2013) y finalizó por encima del intervalo luego del periodo de recuperación (Figura 8). La concentración de albúmina y de proteínas totales en los caballos normales estuvo dentro de los intervalos de valores referenciales respectivos.

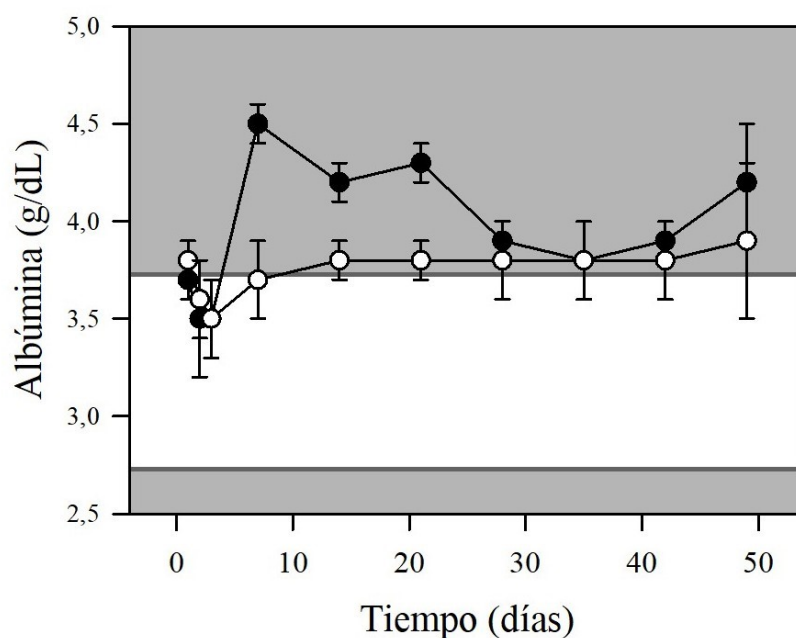


Figura 7: Concentración de albúmina durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de albúmina en el grupo normal fue de  $(3,5 \pm 0,3)$  g/dL.

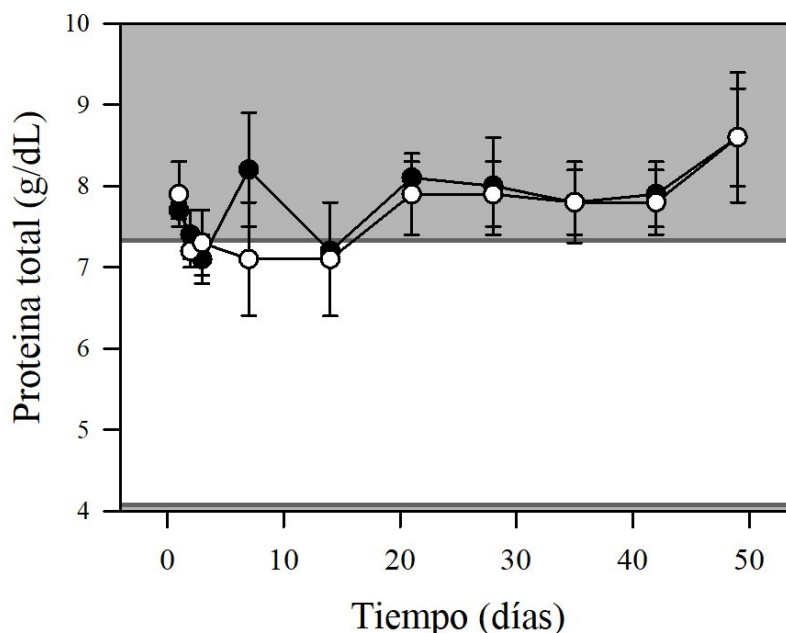


Figura 8: Concentración de proteína total durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de proteína total en el grupo normal fue de  $(7,2 \pm 0,2)$  g/dL.

El sudor en los equinos es hipertónico con respecto al plasma, la composición de este variará según las condiciones ambientales (estrés) y la intensidad del ejercicio, como lo confirma Marichal C. y Hernández M., (2013).

Las concentraciones de sodio de los caballos del grupo control variaron significativamente ( $\chi^2 = 17.754$ ; gl = 9; P = 0.038) presentando una concentración cercana al límite superior al valor de referencia y a partir de la segunda semana posterior a la sangría, se observa un descenso, a medida que el animal ingiere agua y va reponiendo el volumen, esta disminución puede asociarse a la dilución sufrida por la rehidratación, o reposición hídrica luego de experimentar un descenso en el volumen sanguíneo (Marichal C. y Hernández M., 2013), las concentraciones se tornaron más altas que el intervalo de

referencia, volviendo a sus valores basales en la séptima semana, Ver Figura 9. Es importante recordar que los caballos recibieron refuerzos de electrolitos diarios y contaban con acceso a piedras de sal, como parte de su periodo de recuperación post-sangría. En el caso de las concentraciones de potasio, éstas no mostraron alteraciones muy pronunciadas respecto al intervalo de referencia lo largo de todo el experimento, su variación en el tiempo sí fue significativa ( $\chi^2 = 18.810$ ; gl = 9; P = 0.027; Figura 10). Las concentraciones de cloruro iniciales se encontraban por debajo del valor de referencia, esto puede ser asociado a ejercicio exhaustivo (los animales se encontraban, previo a la sangría en un gran potrero, en donde podían correr sin limitación, aunado a esa actividad física, el estrés del transporte y la demanda de la sangría incrementa las pérdidas de cloruro por sudor (Marichal C. y Hernández M., 2013). Luego se presentó un incremento abrupto durante la sangría, mismo que es relaciona a una hemoconcentración, así como una movilización interna entre compartimentos extra e intracelulares (Marichal C. y Hernández M., 2013). La concentración de cloruro fue disminuyendo gradualmente, variando de modo significativo ( $\chi^2 = 25.344$ ; gl = 9; P = 0.003), hasta concentraciones por debajo del límite inferior del intervalo de referencia a partir de la tercera semana posterior a la sangría (Figura 11). Los valores de electrolitos del grupo normal estuvieron dentro de los intervalos referenciales correspondientes.

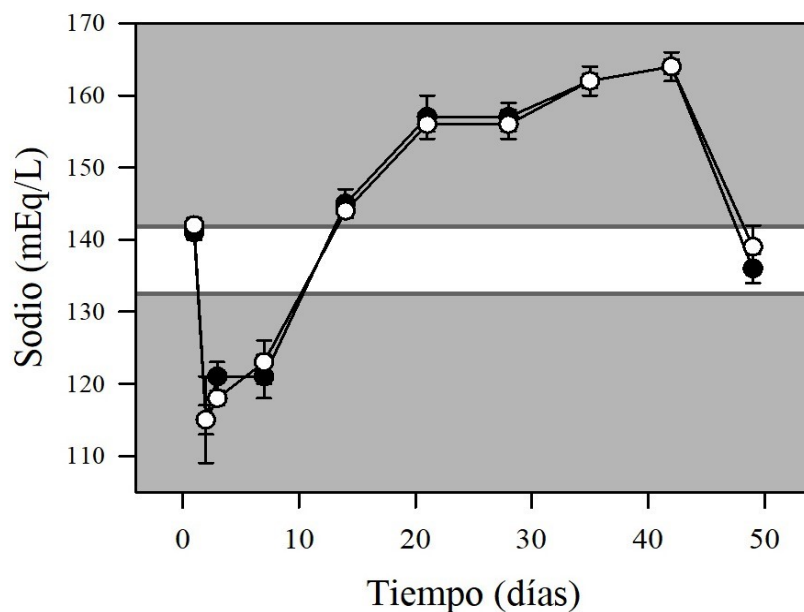


Figura 9: Concentración de sodio durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de referencia. La concentración de sodio en el grupo normal fue de  $(137 \pm 1)$  mEq/L.

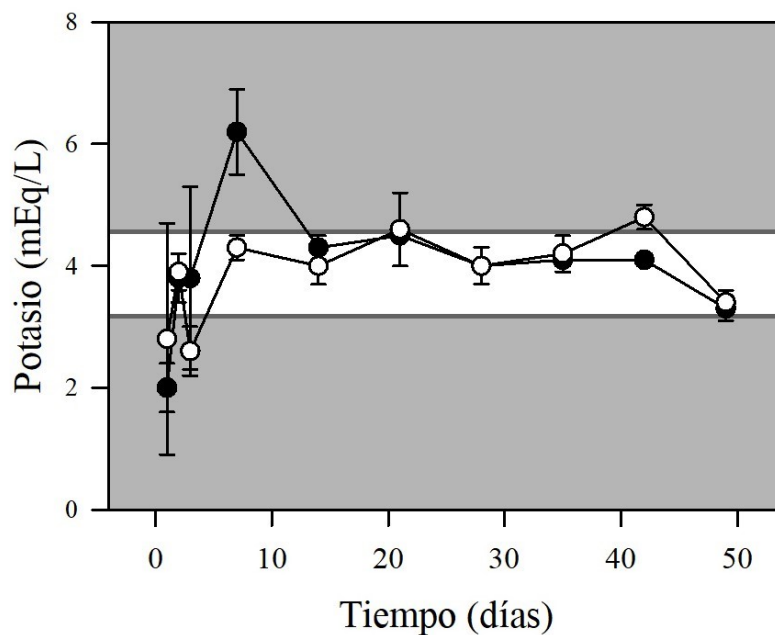


Figura 10: Concentración de potasio durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo referencial. La concentración de potasio en el grupo normal fue de  $(3,6 \pm 0,2)$  mEq/L.

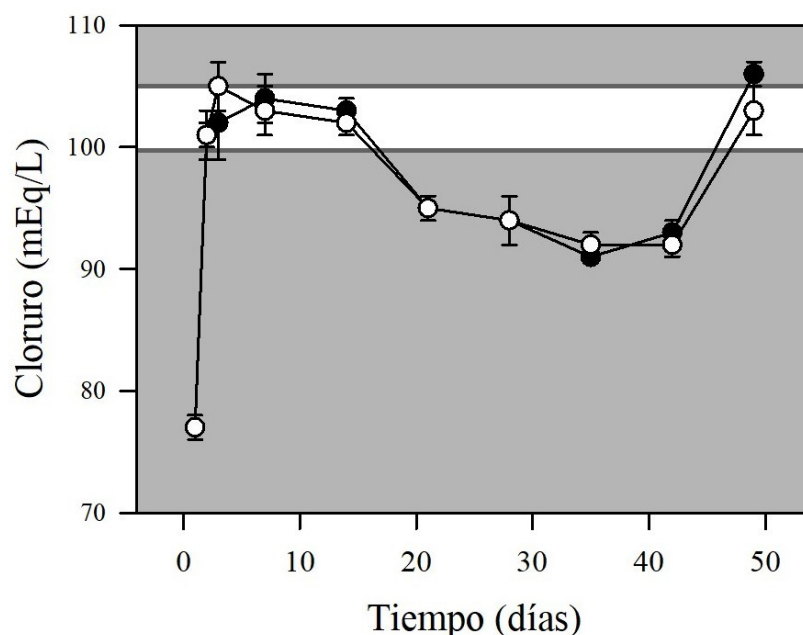


Figura 11: Concentración de cloruro durante el periodo de recuperación de los caballos del grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores referenciales. La concentración de cloruro en el grupo normal fue de  $(103 \pm 5)$  mEq/L.

A lo largo del periodo de recuperación, los caballos del grupo control presentaron variaciones en los valores de indicadores de función renal como la creatinina ( $\chi^2 = 23.164$ ; gl = 9; P = 0.006; Figura 12) y de nitrógeno ureico ( $\chi^2 = 23.769$ ; gl = 9; P = 0.005; Figura 13), pero siempre se mantuvieron dentro del intervalo de valores de referencia, al igual que los caballos de grupo normal.

Aunque los valores de AST no variaron significativamente ( $\chi^2 = 12.943$ ; gl = 9; P = 0.165; Figura 14), sí lo hicieron los valores de otros indicadores de enfermedad hepática como fosfatasa alcalina ( $\chi^2 = 17.471$ ; gl = 9; P = 0.042; Figura 15) y GGT ( $\chi^2 = 18.332$ ; gl = 9; P = 0.032; Figura 16). Tanto en el grupo control como en el grupo normal, los valores de AST y GGT se encontraron dentro del intervalo de valores de referencia,



mientras que los de fosfatasa alcalina estuvieron por encima de su intervalo de valores referenciales correspondiente.

Por otro lado, los caballos del grupo control mostraron valores anormalmente elevados de la haptoglobina (i.e. una proteína de fase aguda), los cuales variaron durante el periodo de descanso ( $\chi^2 = 26.2$ ; gl = 9; P = 0.002; Figura 17), y de marcadores de destrucción de fibras musculares como la creatina quinasa, que también variaron a lo largo del tiempo ( $\chi^2 = 17.198$ ; gl = 9; P = 0.046; Figura 18). Los valores de haptoglobina del grupo normal estuvieron dentro del intervalo de referencia, pero los de creatina quinasa estuvieron por encima.

Además, a lo largo de la sangría y del periodo de recuperación, los caballos del grupo control presentaron valores dentro del rango de referencia para glucosa (Figura 19), colesterol (Figura 20) y triglicéridos (Figura 21). Aunque se observó variaciones significativas en los valores de glucosa a lo largo del tiempo ( $\chi^2 = 23.422$ ; gl = 9; P = 0.005; Figura 19), no fueron significativas las variaciones observadas para los valores de colesterol ( $\chi^2 = 14.598$ ; gl = 9; P = 0.103) o triglicéridos ( $\chi^2 = 5.893$ ; gl = 9; P = 0.751). Las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos de los caballos del grupo normal estuvieron dentro de los intervalos de referencia (Figuras 19, 20 y 21).

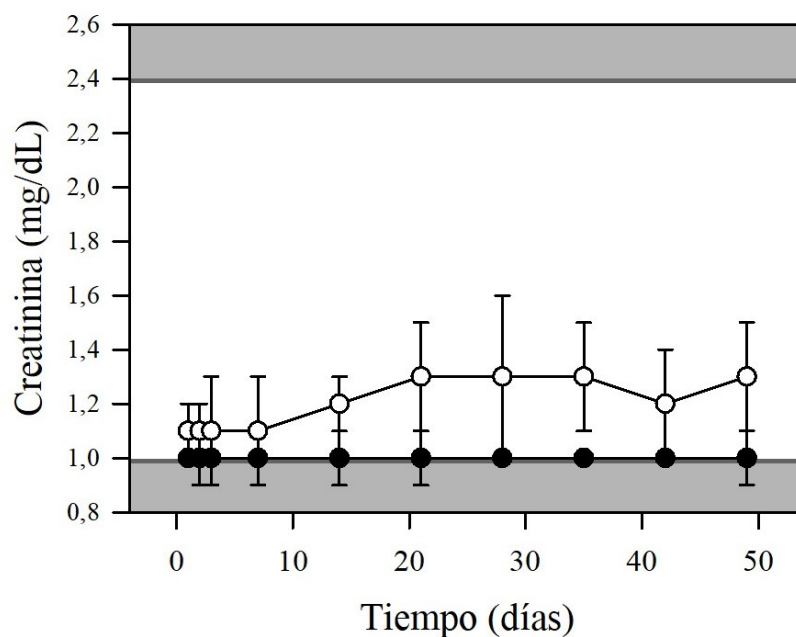


Figura 12: Concentración de creatinina durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores referenciales. La concentración de creatinina en el grupo normal fue de  $(1,4 \pm 0,3)$  g/dL.

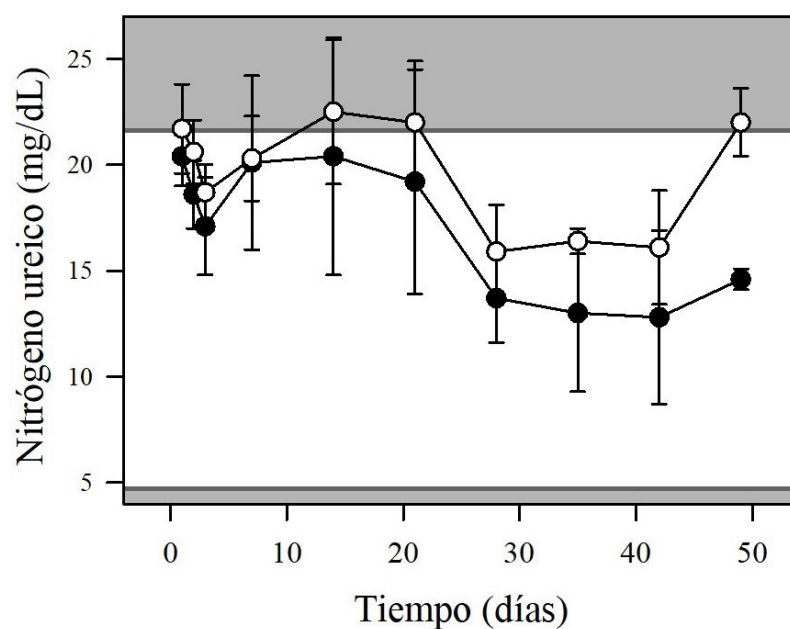


Figura 13: Concentración de nitrógeno ureico durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de nitrógeno ureico en el grupo normal fue de  $(20 \pm 2)$  mg/dL.

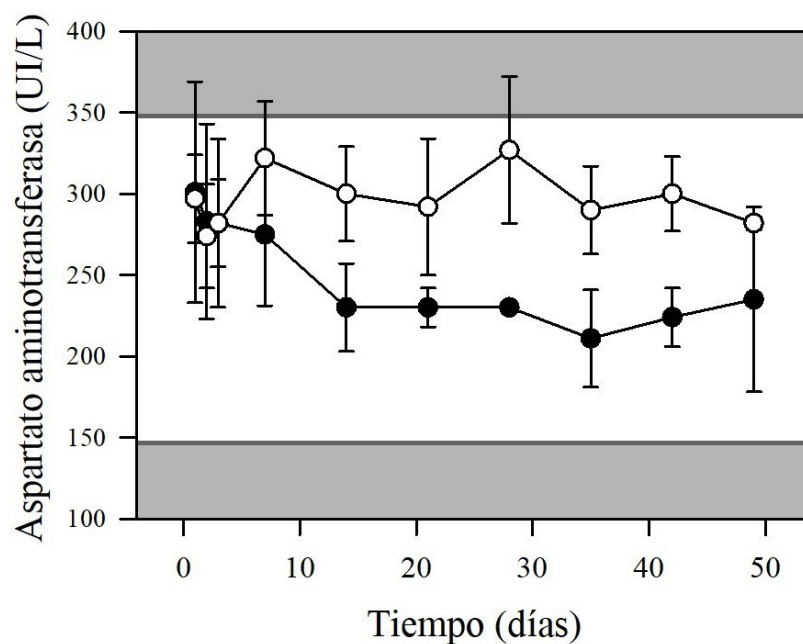


Figura 14: Concentración de AST durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores referenciales. La concentración de AST en el grupo normal fue de  $(319 \pm 13)$  UI/mL.

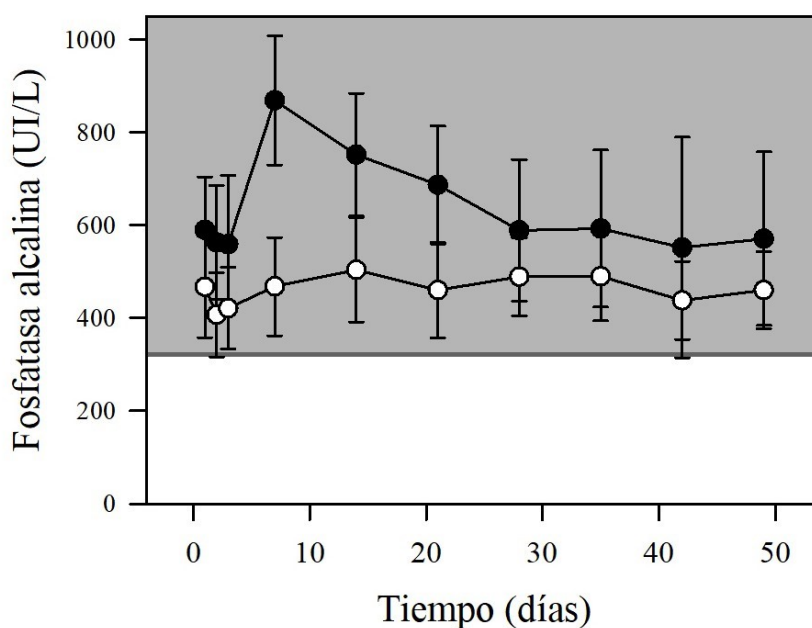


Figura 15: Concentración de fosfatasa alcalina durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de fosfatasa alcalina en el grupo normal fue de  $(467 \pm 76)$  UI/L.

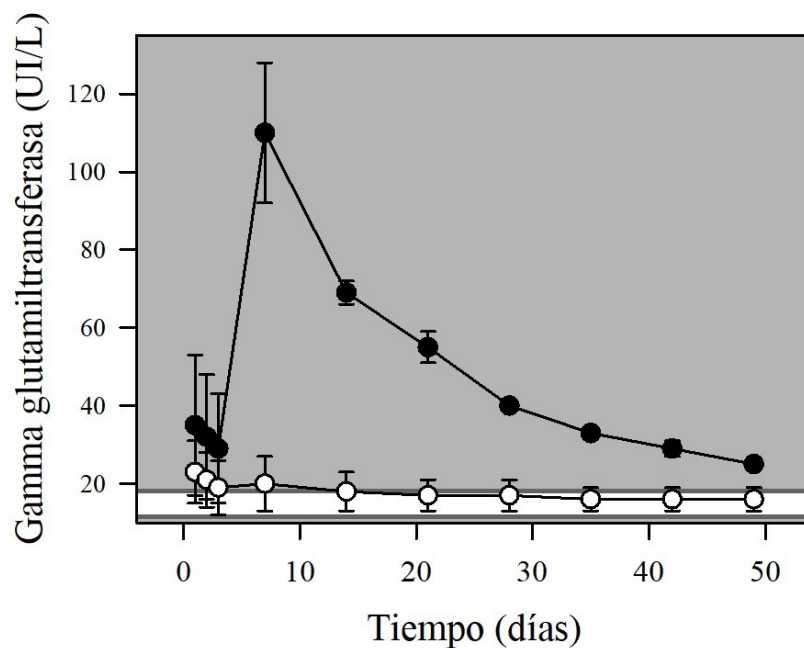


Figura 16: Concentración de GGT durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de GGT en el grupo normal fue de  $(15 \pm 1)$  UI/mL.

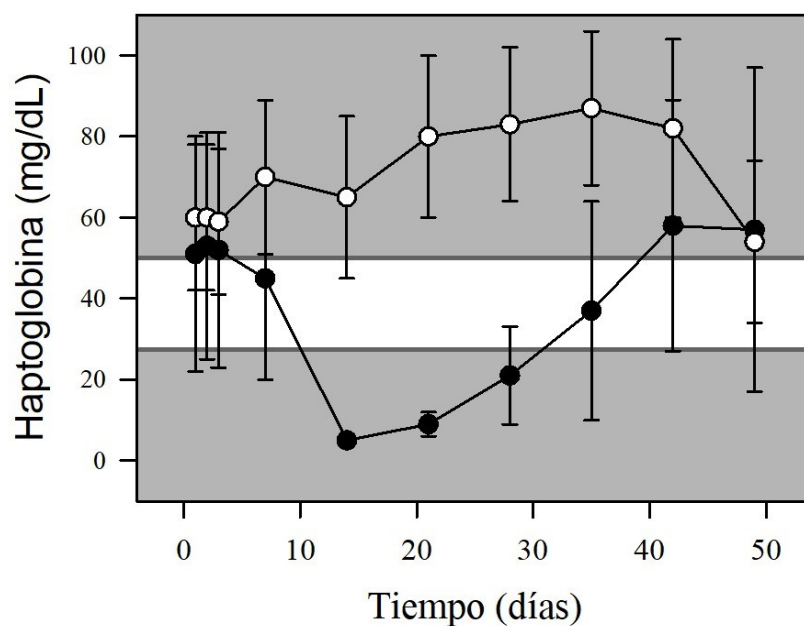


Figura 17: Concentración de haptoglobina durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de haptoglobina en el grupo normal fue de  $(33 \pm 4)$  mg/dL.

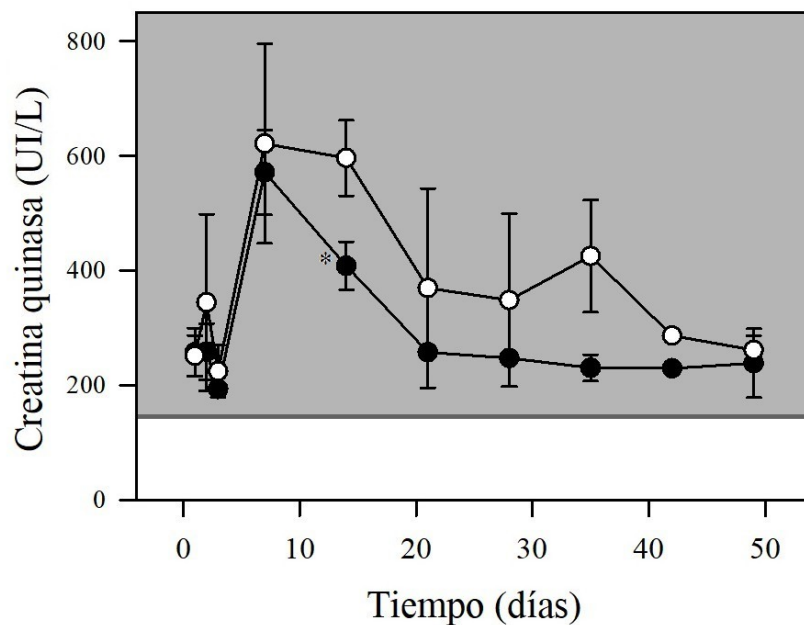


Figura 18: Concentración de CK durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores referenciales. La concentración de CK en el grupo normal fue de  $(325 \pm 84)$  UI/mL

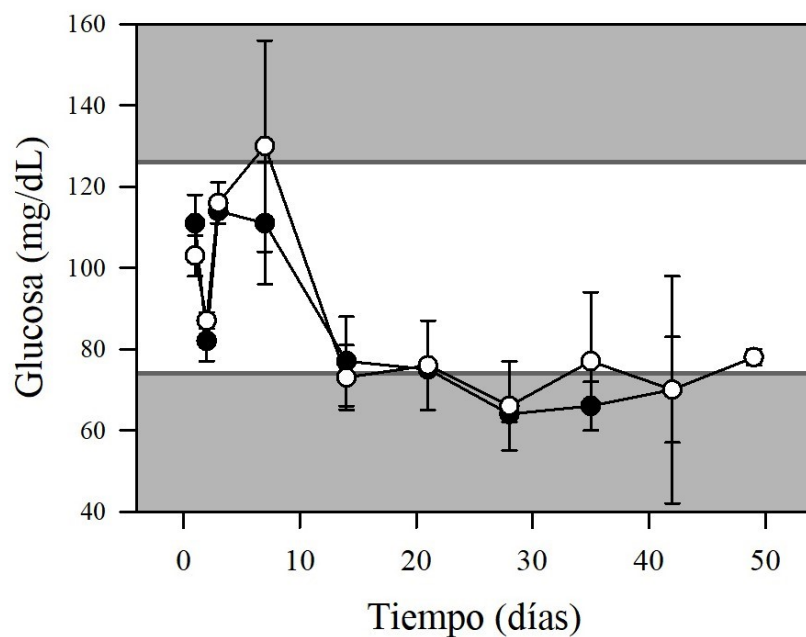


Figura 19: Concentración de glucosa durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de glucosa en el grupo normal fue de  $(125 \pm 10)$  mg/dL.

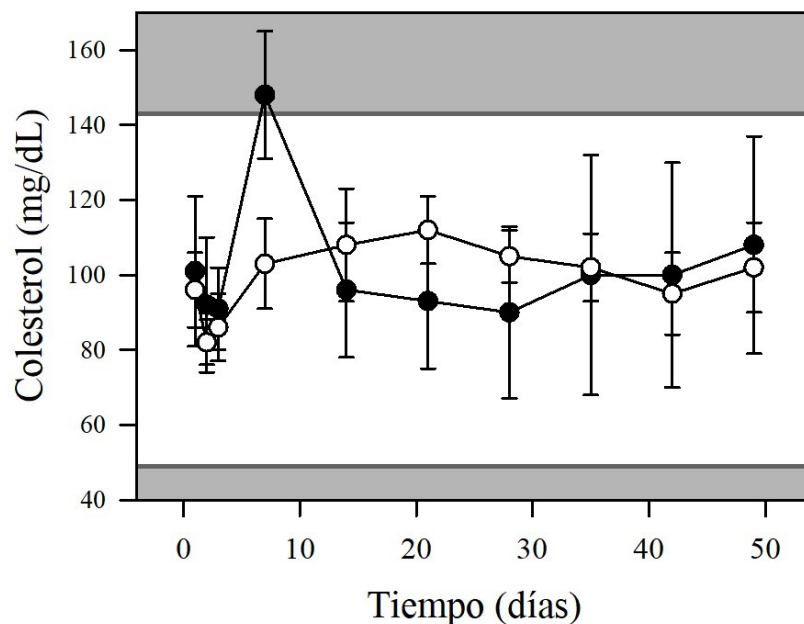


Figura 20: Concentración de colesterol durante el periodo de recuperación de los caballos del grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de colesterol en el grupo normal fue de  $(100 \pm 3)$  mg/dL.

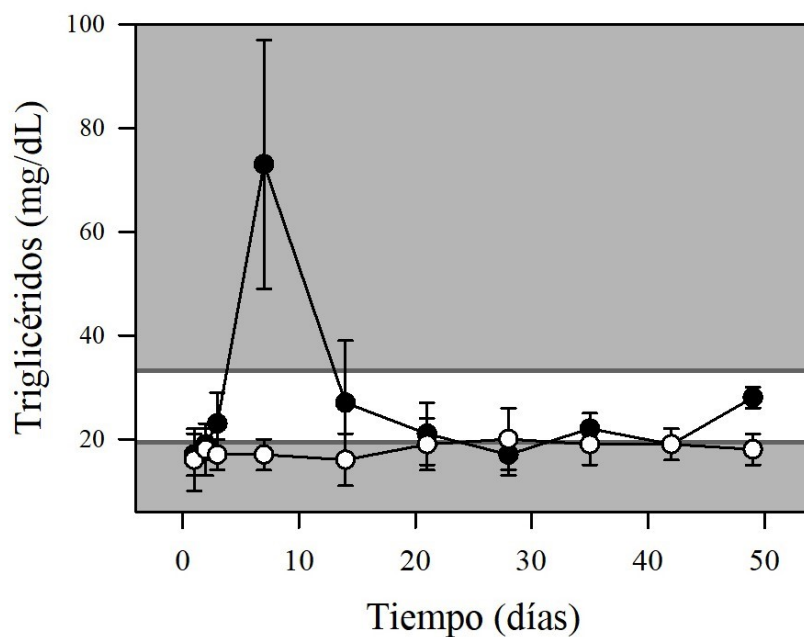


Figura 21: Concentración de triglicéridos durante el periodo de recuperación de los caballos. Grupo control (círculos blancos) y los del grupo de prueba (círculos negros). La zona blanca representa el intervalo de valores de referencia. La concentración de triglicéridos en el grupo normal fue de  $(19 \pm 5)$  mg/dL.

### 6.3.2. Recuperación de caballos del grupo de prueba.

En la hora posterior a la administración de la albúmina, los tres caballos del grupo de prueba presentaron un sarpullido generalizado (Figura 22), respiración profunda y agitada, y alteraciones gastrointestinales. Estas reacciones no fueron presentadas por los caballos del grupo control. Para controlar las reacciones adversas producidas por la albúmina, los caballos fueron tratados con clorfeniramina maleato (Histaminex) a una dosis de 0,25 mg/kg y dexametasona a una dosis de 0,1 mg/kg. Doce horas después del tratamiento, ninguno de los caballos mostraba signos de reacción adversa.

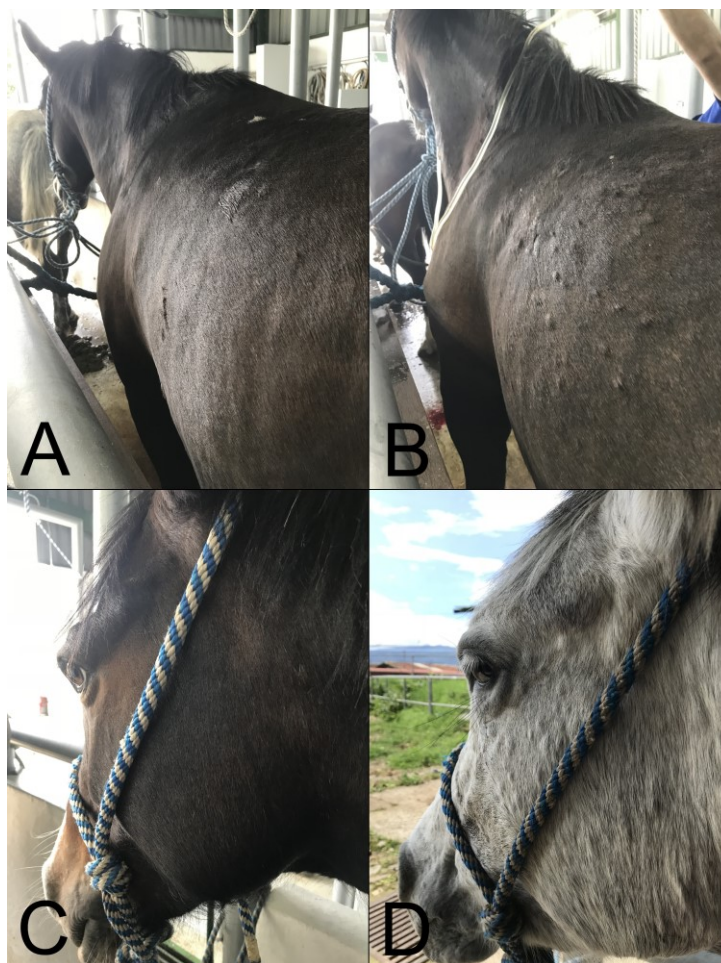


Figura 22: Sarpullido generalizado presentado en los caballos del grupo de prueba (B y C), en comparación con el estado mostrado por los caballos del grupo control (A y C).

En la muestra inicial, los caballos del grupo de prueba presentaron hematocrito y hemoglobina menores que el límite inferior del intervalo de valores de referencia (Figuras 4 y 5). Estos valores se mantuvieron por debajo del intervalo de referencia durante el periodo de recuperación, pero no disminuyeron significativamente respecto a los valores iniciales de hematocrito ( $\chi^2 = 15.757$ ; gl = 9; P = 0.072; Figura 4) y hemoglobina ( $\chi^2 = 12.869$ ; gl = 9; P = 0.169; Figura 5), y ambos grupos difirieron significativamente en hematocrito (F = 12.830; gl = 1, 3; P = 0.037; Figura 4) y hemoglobina (F = 11.886; gl = 1, 3; P = 0.041; Figura 5). Por otro lado, la concentración de leucocitos se mantuvo dentro del rango referencial sin mayores cambios ( $\chi^2 = 9.818$ ; gl = 9; P = 0.365; Figura 6) y sin diferencias significativas respecto al grupo control (F = 0.755; gl = 1, 3; P = 0.449; Figura 6).

Luego de la administración de albúmina el grupo de prueba experimentó un aumento de su volumen plasmático que a pesar de ser evidente en el gráfico (Figura 3), no alcanzó a marcar una significancia estadística, tal vez por lo pequeño de la muestra empleada ( $\chi^2 = 5.4$ ; gl = 3; P = 0.145). Sin embargo, si fue suficiente para evidenciar la diferencia significativa observada respecto al grupo control (F = 47.385; gl = 1, 3; P = 0.020).

La concentración de albúmina en sangre aumentó significativamente luego de su administración intravenosa ( $\chi^2 = 17.365$ ; gl = 9; P = 0.043; Figura 7). Este aumento fue mayor al proyectado teóricamente con base en la dosis de albúmina administrada debido a la disminución de albúmina como consecuencia de la sangría fue menor a lo esperado. En las semanas posteriores la concentración de albúmina disminuyó hasta alcanzar sus



valores basales en la quinta semana. No obstante, se observó un incremento inesperado en las semanas sexta y séptima (Figura 7). Las diferencias en la concentración de albúmina entre el grupo control y el grupo de prueba no fueron significativas ( $F = 4.538$ ;  $gl = 1, 3$ ;  $P = 0.123$ ). Por su parte, las variaciones en la concentración de proteína total en el grupo de prueba no fueron significativas a lo largo del periodo de recuperación ( $\chi^2 = 11.860$ ;  $gl = 9$ ;  $P = 0.221$ ; Figura 8), ni en comparación de las del grupo control ( $F = 0.154$ ;  $gl = 1, 3$ ;  $P = 0.717$ ).

A partir de la segunda semana posterior a la sangría, las concentraciones de sodio de los caballos del grupo de prueba fueron significativas ( $\chi^2 = 17.973$ ;  $gl = 9$ ;  $P = 0.035$ ), tornándose más altas que el intervalo de referencia y volviendo a sus valores basales hasta en la séptima semana (Figura 9). Por otro lado, mientras que las concentraciones de potasio no mostraron alteraciones muy pronunciadas a lo largo del tiempo ( $\chi^2 = 16.043$ ;  $gl = 9$ ;  $P = 0.055$ ) ni valores alejados del intervalo de valores referenciales (Figura 10), las variaciones en las concentraciones de cloruro sí fueron significativas ( $\chi^2 = 17.012$ ;  $gl = 9$ ;  $P = 0.049$ ) y seguido al incremento abrupto mostrado durante la sangría, disminuyeron gradualmente hasta concentraciones por debajo del límite inferior del intervalo de valores establecidos como referencia, a partir de la tercera semana posterior a la sangría (Figura 11). A lo largo del periodo de descanso, los grupos de prueba y control difirieron significativamente en sus concentraciones de potasio ( $F = 0.026$ ;  $gl = 1, 3$ ;  $P = 0.883$ ; Figura 10), pero no en sus concentraciones de sodio ( $F = 0.076$ ;  $gl = 1, 3$ ;  $P = 0.809$ ; Figura 9) y cloruro ( $F = 0.472$ ;  $gl = 1, 3$ ;  $P = 0.541$ ; Figura 11).

Al igual que el grupo control, a lo largo del periodo de recuperación, los caballos del grupo de prueba presentaron valores dentro del rango aceptado y sin variaciones significativas de indicadores de función renal como la creatinina ( $\chi^2 = 1.750$ ; gl = 9; P = 0.995; Figura 12) y de nitrógeno ureico ( $\chi^2 = 14.945$ ; gl = 9; P = 0.092; Figura 13). Además, no se observó diferencias significativas entre ambos grupos de caballos respecto a sus concentraciones de creatinina (F = 2.507; gl = 1, 3; P = 0.211; Figura 12) y nitrógeno ureico (F = 1.262; gl = 1, 3; P = 0.343; Figura 13).

Los caballos de grupo de prueba mostraron valores sin variaciones significativas de indicadores que podrían evidenciar algún grado de compromiso hepático como la AST ( $\chi^2 = 11.415$ ; gl = 9; P = 0.248; Figura 14), fosfatasa alcalina ( $\chi^2 = 13.309$ ; gl = 9; P = 0.149; Figura 15), GGT ( $\chi^2 = 14.416$ ; gl = 9; P = 0.108; Figura 16), haptoglobina ( $\chi^2 = 15.237$ ; gl = 9; P = 0.085; Figura 17) y triglicéridos ( $\chi^2 = 12.988$ ; gl = 9; P = 0.163; Figura 21). De estos indicadores no se encontró variación significativa respecto al grupo control en AST (F = 4.045; gl = 1, 3; P = 0.138; Figura 14), fosfatasa alcalina (F = 2.641; gl = 1, 3; P = 0.203; Figura 15), haptoglobina (F = 2.117; gl = 1, 3; P = 0.242; Figura 17) y triglicéridos (F = 6.432; gl = 1, 3; P = 0.085; Figura 21). Las diferencias entre el grupo de prueba y el grupo control respecto a GGT sí fueron significativas (F = 55.466; gl = 1, 3; P = 0.005; Figura 16). De estos indicadores, solo la AST se encontró dentro del intervalo de valores referenciales; los demás mostraron valores fuera de sus intervalos correspondientes (Figuras 14, 15, 16, 17 y 21).

Los valores de CK del grupo de prueba no aumentaron significativamente respecto a sus valores basales inmediatamente después de la sangría ( $\chi^2 = 14.073$ ; gl = 9; P =

0.120; Figura 18). Además, este incremento no fue diferente de mostrado por el grupo control ( $F = 8.379$ ;  $gl = 1, 3$ ;  $P = 0.063$ ; Figura 18). Sin embargo, tanto los caballos del grupo control, como los del grupo de prueba y el grupo normal presentaron valores por encima del intervalo referencial (Figura 18).

Otros parámetros bioquímicos del grupo de prueba que durante el periodo de reposo no mostraron alteraciones respecto a sus valores basales fueron glucosa ( $\chi^2 = 14.182$ ;  $gl = 9$ ;  $P = 0.108$ ; Figura 19) y colesterol ( $\chi^2 = 12.298$ ;  $gl = 9$ ;  $P = 0.200$ ; Figura 20). En ambos casos, los valores mostrados por los caballos del grupo de prueba mostraron valores cercanos al intervalo de referencia (Figuras 19 y 20). Las diferencias entre el grupo de prueba y el control no fueron significativas para las concentraciones de glucosa ( $F = 0.534$ ;  $gl = 1, 3$ ;  $P = 0.518$ ) y colesterol ( $F = 0.130$ ;  $gl = 1, 2$ ;  $P = 0.753$ ).

## 7. DISCUSIÓN

La elaboración de antivenenos requiere contar con grandes cantidades de plasma hiperinmune, cuya producción se logra mediante la inmunización y sangría periódica de los animales seleccionados como fuente de inmunoglobulinas antiveneno. Debido a que ambos procesos afectan el estado físico de estos animales fue necesario suspender la inmunización de los equinos empleados en esta investigación para poder estudiar sin interferencias los efectos del programa de sangrías sobre su condición general.

### 7.1. Estimación del volumen plasmático por el método del Azul de Evans

Si bien azul de Evans es una sustancia que permite calcular su concentración a nivel sanguíneo, tiene predisposición por unirse a las proteínas, en especial a la albúmina, debido a esto, podría ocurrir un secuestro momentáneo del colorante a nivel extravascular y generar variaciones en la concentración que podrían confundir los resultados del experimento (Richalet et al., 2018). El volumen plasmático medido por la técnica del Azul de Evans ( $8,1 \pm 0,4$ ) L no se aproximó a las proyecciones teóricas basadas en el peso y hematocrito de los animales. Esto, debido a que el volumen de plasma perdido es parcialmente compensado por el volumen de solución salina en el que los glóbulos rojos son suspendidos para ser autotransfundidos y por los fluidos que son movilizados desde otros compartimientos corporales hacia el compartimiento intravascular. Sin embargo, la precisión de los resultados obtenidos no es suficiente para evidenciar diferencias tan importantes como la pérdida del ( $29 \pm 1$ ) % de la cantidad total de plasma.

## 7.2. Efecto de la sangría sobre la electrofisiología, hematología y química sérica.

Al inicio de la sangría, los caballos estaban incómodos y molestos por el manejo al que deben ser sometidos para la realización de la sangría y el monitoreo cardiaco. Esto podría explicar por qué inician con una frecuencia cardiaca ligeramente aumentada que se normaliza durante la sesión de sangría.

A lo largo de muchos años, se ha sabido que una sangría industrial como la aplicada en este estudio no se manifiesta negativamente en la clínica del animal (Estrada et al., 1992; Angulo et al., 1997b). Sin embargo, el monitoreo de la electrofisiología cardiaca no había sido realizado hasta ahora. Con base en lo observado en la clínica, los caballos a pesar de las extracciones masivas de sangre que conlleva la sangría no evidencian alteraciones de comprometimiento cardiaco, aún sin realizarse la autotransfusión al final del según día de colecta sanguínea, siendo éste el día más crítico debido a que acumula la pérdida de dos días seguidos de sangre.

La disminución en la  $SpO_2$  es consistente con la extracción de sangre, y la ausencia de signos clínicos de hipoxia. Siendo que durante la sangría se extrae el  $(35 \pm 2) \%$  del total de la sangre de los caballos, sería esperable observar signos de choque hipovolémico. Sin embargo, estos signos se limitaron a las alteraciones tempranas de la presión sanguínea que ocurren para compensar la pérdida de volumen de sangre.

La pérdida de glóbulos rojos producida por la sangría es compensada por la movilización de glóbulos rojos hacia el compartimiento intravascular por la contracción esplénica y por los glóbulos rojos que se transfunden durante el segundo y tercer día. Consecuentemente, la disminución en los valores de hematocrito y hemoglobina

obtenidos experimentalmente fue menor que la proyectada teóricamente a partir de su peso corporal. Sin embargo, interesantemente también es menor a la encontrada por Angulo y colaboradores (1997b) en un grupo similar de animales.

De modo similar, la pérdida de albúmina producida por la sangría fue parcialmente compensada muy probablemente por la movilización de albúmina desde el compartimiento extravascular. Este efecto compensatorio también fue evidente desde las mediciones de proteína total.

Los bajos valores basales de potasio y cloruro podrían deberse a problemas en el balance de la dieta que reciben los caballos. Aunque estudios previos ya habían reportado la disminución de la concentración de potasio durante la sangría (Angulo et al., 1997b), la hiponatremia discreta en este estudio fue inesperada, ya que los animales fueron rehidratados con el NaCl 0,9 % que se emplea para suspender los glóbulos rojos previo a la autotransfusión. Tal y como se esperaba, los valores de glucosa, colesterol y triglicéridos no fueron afectados significativamente durante la sangría.

Los valores de creatinina y nitrógeno ureico indican que durante la sangría no hay una afectación importante de la función renal. De modo similar, los valores de AST, fosfatasa alcalina y GGT indican que la sangría no produce alteraciones importantes a nivel hepático. Estos resultados coinciden con hallazgos reportados previamente (Angulo et al., 1997b). Los valores basales aumentados de proteínas totales, haptoglobinas y CK podrían ser consecuencia residual de la inflamación, la respuesta inmune y el daño tisular producidos por la inyección de venenos de serpiente (Estrada et al., 1992; Angulo et al.,

1997a), a pesar del tiempo que se suspendió la inmunización para evitar este tipo de interferencias.

Los resultados obtenidos sugieren que los caballos sometidos a sangría industrial se recuperan durante las cuatro semanas posteriores a la sangría. Estos resultados coinciden con estimaciones previas que indican que cerca de 25 días son requeridos para que los caballos recuperen su concentración plasmática de proteína total (Magdesian et al., 1992), y 30 a 50 días para reponer por completo sus reservas de albúmina extravascular (Fleck and Colley, 1984; Magdesian et al., 1992).

### 7.3. Efecto del tratamiento con albúmina en la recuperación de los caballos.

La utilización de soluciones de albúmina equina, como complemento terapéutico ante diversas patologías, debe ser considerada como una buena opción para el tratamiento de caballos con cólicos, quemaduras, problemas de deshidratación por diarreas, infecciones, pero especialmente en situaciones de shock; donde es necesaria la elevación de la presión arterial, por ejemplo, en pacientes que requieren una intervención quirúrgica (Belli et al., 2013).

Aunque la preparación de albúmina empleada en este estudio era estéril y libre de endotoxinas, produjo reacciones adversas tempranas en los caballos que las recibieron. Estas reacciones pudieron presentarse por varias circunstancias entre ellas, volumen y velocidad de pasaje inadecuado. Es improbable que esas reacciones se debieran a anticuerpos de la clase IgE contra proteínas homólogas. Sin embargo, debido a que la

preparación de albúmina tenía una pureza del 60 %, es posible que dichas reacciones fueran mediadas por anticuerpos presentes en la albúmina que reaccionaran contra antígenos como por ejemplo los eritrocitarios. De este modo, sin producirse hemólisis intravascular, se pudo liberar anafilotoxinas que promovieran la degranulación de mastocitos, la liberación de histamina a nivel local y sus efectos sobre endotelio y músculo liso. La patogénesis de estas reacciones adversas merece ser estudiada con mayor detenimiento.

El tratamiento empleado en este estudio produjo un incremento en la concentración de albúmina más grande que la disminución de esta proteína producida por la sangría. Esto debió producir una inhibición por retroalimentación de la síntesis de albúmina y otras proteínas a nivel hepático. Al mismo tiempo, el incremento en la concentración de albúmina produjo una redistribución de líquidos hacia el compartimiento vascular, incrementando el volumen plasmático.

El valor de más de 150 L obtenido para el volumen plasmático de los animales que recibieron la albúmina es poco creíble. Nosotros consideramos que dos posibles situaciones pudieran ser responsables de esta dilución tan abrupta. Es probable que el aumento artificial en la concentración de albúmina activara las vías catabólicas de esta proteína, y su movilización hacia el espacio extravascular. Esto podría haber producido la remoción del Azul de Evans asociado a la albúmina del espacio intravascular, lo cual a su vez pudo evidenciarse como concentraciones más bajas que afectaron el cálculo del volumen de distribución, haciéndolo parecer más grande de lo que en realidad es. La otra posibilidad es el efecto de dilución que ejerce el Azul de Evans a nivel vascular, al ser



una sustancia cuya concentración en sangre no es estable, según lo demuestra el tiempo requerido para alcanzar su concentración máxima y la tasa de aclaramiento variable durante las fases de distribución y eliminación (Richalet et al., 2018).

Aunque el aumento del volumen plasmático se alinea con lo esperado como consecuencia del tratamiento recibido por los caballos, la magnitud de este aumento debe ser estudiada con más detalle. A pesar de que los resultados obtenidos con la técnica del Azul de Evans no fueron útiles para determinar el momento exacto en el que los caballos retornaron a su condición basal de volumen plasmático, las tendencias observadas en el grupo control parecen sugerir que un tiempo de reposo de siete semanas es excesivo para lograr ese objetivo.

Es posible que el aumento en el volumen plasmático producido por la administración de albúmina influyera de alguna forma para hacer que los valores de hematocrito y hemoglobina de los caballos del grupo de prueba fueran menores que los de los animales del grupo control. Por su parte, debido a la constante y nutrida movilización de leucocitos desde sus reservas extravasculares, la concentración de estas células fue poco susceptible a las variaciones producidas por los cambios en el volumen plasmático. En todo caso, se estima que para la cuarta semana posterior a la sangría los valores de hematocrito y hemoglobina regresaron a su normalidad, independientemente de si los animales fueron tratados con albúmina o no.

La concentración de electrolitos durante la sangría y el periodo de recuperación parece ser más influenciada por factores como la dieta de los animales que por la sangría misma. Con excepción de la concentración de potasio en la semana siguiente a la sangría,

se observó que la administración de albúmina no afecta la concentración de electrolitos. De modo similar la administración de albúmina no evidenció afección de la función renal, ni el metabolismo de la glucosa.

Nuestros resultados coinciden con estudios previos que indican que, aunque el proceso de sangría pudiera parecer muy agresivo, los caballos tienen mecanismos muy eficientes para compensar hipoxemias e hipercapnias (Bayly et al., 1989) y soportar extracciones del (20-25) % del contenido total de sangre de un caballo sin producir alteraciones cardiorespiratorias, hematológicas o bioquímicas graves (Schmotzer et al., 1985; Collatos, 1997; Malikides et al., 2001).

La respuesta rápida y momentánea ante esa demanda de oxígeno se da principalmente a través de dos mecanismos: reducción del volumen plasmático y liberación de células sanguíneas del bazo (Udroiu, 2017). La contracción esplénica puede proveer aproximadamente desde un 15 % del volumen eritrocitario a la circulación, esta reserva esplénica se relaciona al peso del bazo y el volumen total de sangre (Udroiu, 2017).

Nuestros resultados también coinciden con estudios previos que demuestran que luego de la extracción de ocho litros de sangre, los caballos reducen su conteo de glóbulos rojos en un 10 % y para reponer su recuento de eritrocitos requieren aproximadamente de una a cuatro semanas (Lumsden et al., 1975; Magdesian et al., 1992; Angulo et al., 1997b).

Por otro lado, aunque la AST no indica que exista daño hepático, el incremento observado en los valores de fosfatasa alcalina y GGT, sugiere la presencia de colestasis o algún proceso hepatobiliar en los caballos del grupo de tratados con albúmina (Stockham,

1995). Los valores de haptoglobina, colesterol y triglicéridos también indican algún grado de afectación a nivel hepático. La patogénesis y magnitud de este daño merece ser estudiada con más detalle.

## 8. CONCLUSIONES

- 8.1. La medición directa del volumen plasmático extraído de caballos durante las sangrías industriales no pudo ser relacionada a la estimación indirecta realizada por el método del Azul de Evans, debido a la serie de variables presentadas: secuestro del colorante, dilución de este por el proceso fisiológico compensatorio en la reposición de volumen plasmático, entre otras.
- 8.2. Un programa de sangría compuesto por la extracción de 5 L de sangre durante 3 días consecutivos, con autotransfusiones en el segundo y tercer día no afectan significativamente la electrofisiología cardíaca, el perfil bioquímico sérico y los valores hematológicos de caballos productores de plasma. Las principales afectaciones se limitan a un aumento de la presión arterial.
- 8.3. Los caballos que son sometidos a sangría industrial con el programa empleado en este estudio recuperan su condición basal antes de la séptima semana del periodo de recuperación.
- 8.4. La administración intravenosa de albúmina incrementa el volumen plasmático equino y afecta el valor de parámetros hematológicos como la hemoglobina y el hematocrito; y de química sérica como la albúmina, proteínas totales, potasio, GGT, fosfatasa alcalina, haptoglobinas, colesterol y triglicéridos, pero no contribuye a disminuir el tiempo de recuperación de los animales que son sometidos a sangrías industriales durante la producción de antivenenos ofídicos.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- 9.1. Ensayar la eficacia y seguridad de una formulación de albúmina de mayor pureza aplicada en una dosis menor que la empleada en este estudio.
- 9.2. Estudiar la recuperación de caballos que una vez sometidos al programa de sangría empleado en este estudio, se dejan reposar por periodos más cortos que las siete semanas.
- 9.3. Estudiar el efecto de la administración de albúmina en caballos con otras afecciones como cólicos, deshidratación, accidentes, etc.

## 10. REFERENCIAS

Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 1997a. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotaline) antivenom. *Toxicon*, 35, 81-90.

Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 1997b. Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. *Rev Biol Trop*, 45, 1215-1221.

Bayly, W.M., Hodgson, D.R., Schulz, D.A., Dempsey, J.A., Gollnick, P.D., 1989. Exercise-induced hypercapnia in the horse. *J Appl Physiol*, 67, 1958-1966.

Becht, J.L., Gordon, B.J., 1987. Blood and plasma therapy. In: Robinson, N.E. (Ed.), *Current Therapy in Equine Medicine Vol. 2*. Saunders, Philadelphia, pp. 317-322.

Bellezzo, F., Kuhnmuench, T., Hackett, E.S., 2014. The effect of colloid formulation on colloid osmotic pressure in horses with naturally occurring gastrointestinal disease. *BMC Veterinary Research*, 10(1), S8.

Belli, C.B., Fernandes, J.P., de Azevedo, R., Fernandes, W.R., 2013. Evaluation of equine albumin solution in fluid therapy in horses with colic. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 509-514.

Bujacz, A., 2012. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68(10), 1278-1289.

Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, Jr. W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., Taylo, H.I., 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc*, 68(3), 459-475.

Collatos, C., 1997. Blood and Blood Component Therapy. In: Robinson, N.E. (Ed.), *Current Therapy in Equine Medicine Vol. 4*. Saunders, Philadelphia, pp. 290-292.

Council of International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), 1985. The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. *Altern Lab Anim.*, 12, ii.

Dane, M.J., van den Berg, B.M., Avramut, M.C., Faas, F.G., van der Vlag, J., Rops, A.L., Ravelli, R.B., Koster, B.J., van Zonneveld, A.J., Vink, H., Rabelink, T.J., 2013. Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *Am J Pathol*, 182(5), 1532-1540.

Demling, R.H., 1987. Fluid replacement in burned patients. *Surg Clin North Am*, 67(1), 15-30.

Estrada, R., Chaves, F., Robles, A., Rojas, E., Segura, E., Gutiérrez, J.M., 1992. Hematologic values and serum enzymes in horses inoculated with snake venoms for the production of antivenins in Costa Rica. *Rev Biol Trop*, 40, 95-99.

Feige, K., Ehrat, F.B., Kästner, S.B.R., Schwarzwald, C.C., 2003. Automated plasmapheresis compared with other plasma collection methods in the horse. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(4), 185-189.

Feige, K., Ehrat, F.B., Kästner, S.B.R., Wampfler, B., 2005. The effects of automated plasmapheresis on clinical, haematological, biochemical and coagulation variables in horses. *The Veterinary Journal*, 169, 102-107.

Fleck, A., Colley, C.M., 1984. How much plasma, relative to body weight, can a donor give over certain period without a continuous deviation of his plasma protein metabolism in the direction of plasma protein deficiency? *Vox Sanguinis*, 47, 436-438.

Garcia-Martinez, R., Caraceni, P., Bernardi, M., Gines, P., Arroyo, V., & Jalan, R. 2013. Albumin: pathophysiologic basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. *Hepatology*, 58(5), 1836-1846.

Gordon, B.J., Latimer, K.S., Murray, M.C., Moore, J.N., 1986. Continuous-flow centrifugation hemapheresis in the horse. *American Journal of Veterinary Research*, 47(2), 342-345.

Gutiérrez, J.M., Rojas, E., Quesada, L., León, G., Nuñez, J., Laing, J.D., Sasa, M., Renjifo, J.M., Nasidi, A., Warrell, D.A., Theakston, R.D.G., Rojas, G., 2005. Pan-african polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: An alternative to the antivenom crisis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99, 468-475.



Gutiérrez, J.M., León, G., Burnouf, T., 2011. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals*, 39(3), 129-142.

Hrkal, Z., Klementova, S., 1984. Bilirubin and haeme binding to human serum albumin studied by spectroscopy methods. *Int J Biochem*, 16(7), 799-804.

Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G., 2011. Animal research: reporting in vivo experiments—the ARRIVE guidelines. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(4), 991.

Kobayashi, K., 2006. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals*, 34, 55-59.

León, G., Estrada, R., Chaves, F., Rojas, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., 1999. Inhibition by  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: Application in horse immunization for antivenom production. *Toxicon*, 36(2), 321-331.

León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 10(5), 381-398.

León, G., Segura, Á., Gómez, A., Hernández, A., Navarro, D., Villalta, M., Vargas, M., Herrera, M., Gutiérrez, J.M., 2015. Industrial production and quality control of snake antivenoms. In: Gopalakrishnakone, P., Calvete, J.J. (Eds.). *Venom Genomics and Proteomics*. Springer, pp. 1-22.

León, G., Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., Solano, G., Gómez, A., Sánchez, M., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 2018. Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*, 151, 63-73.

Lumsden, J.H., Valli, V.E.O., McSherry, B.J., 1975. The hematological response to hemorrhagic anemia in the standardbred horse. In: Krehbiel, J.D. (Ed.), *Proceedings of the First International Symposium on Equine Hematology of the American Association of Equine Practitioners*. American Association of Equine Practitioners, East Lansing, pp. 356–361.

Magdesian, K.G., Brook, M.S., Wickler, S.J., 1992. Temporal effects of plasmapheresis on serum proteins in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 53(7), 1149-1153.

Malikides, N., Hodgson, J.L., Rose, R.J., Hodgson, D.R., 2001. Cardiovascular, haematological and biochemical responses after large volume blood collection in horses. *The Veterinary Journal*, 162, 44-55.

Marcilese, N. A., Valsecchi, R. M., Figueiras, H. D., Camberos, H. R., & Varela, J. E. (1964). Normal blood volumes in the horse. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 207(1), 223-227.

Marichal Camejo, G y Hernández Mederos, J. (2013). *Determinación de las variaciones electrolíticas séricas pre, durante y post competencia en el equino de resistencia (RAID)*. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.

Matejschuk, P., Dash, C.H., Gascoigne, E.W., 2000. Production of human albumin solution: a continually developing colloid. *Br J Anaesth*, 85(6), 887-895.

McLachlan, A.D., Walker, J.E., 1977. Evolution of serum albumin. *J Mol Biol*, 112(4), 543-558.

Meneses-Guevara A. & Bouza Mora L., 2014. *Manual de Hematología y Química Clínica en Medicina Veterinaria*. Heredia, Costa Rica: EUNA.

Mira, J., Posada, S., Castillo, C., Saldarriaga, A., 2016. Parámetros electrocardiográficos en caballos de raza Criollo Colombiano, pacientes de un establecimiento veterinario de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 32, 39-51.

More, J.E., Harvey, M.J., 1991. Purification technologies for human plasma albumin. In: *Blood separation and plasma fractionation*. Ed. Wiley-Liss. New York, USA. 497 p.

Morris, D.D., 1987. Blood products in large animal medicine: a comparative account of current and future technology. *Equine Veterinary Journal*, 19(4), 272-275.

Niinistö, K., Raekallio, M., Sankari, S., 2008. Storage of equine red blood cells as a concentrate. *The Veterinary Journal*, 176(2), 227-231.

Offringa, M., 1998. Excess mortality after human albumin administration in critically ill patients: clinical and pathophysiological evidence suggests albumin is harmful. *BMJ: British Medical Journal*, 317(7153), 223.

Richalet, J. P., Marchant, D., Macarlupu, J. L., Voituren, N., 2018. Modeling the Evans Blue Dilution Method for the Measurement of Plasma Volume in Small Animals: A New Optimized Method. *Annals of biomedical engineering*, 1-7.

Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., Bourdon, E., 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters*, 582(13), 1783-1787.

Rucavado, A., Escalante, T., Franceschi, A., Chaves, F., León, G., Cury, Y., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., 2000. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: Effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa<sub>2</sub>EDTA. *Am J Trop Med Hyg*, 63(5), 313-319.

Schmotzer, W.B., Riebold, T.W., Porter, S.L., Blauvelt, S.R., 1985. Time saving techniques for the collection, storage, and administration of equine blood and plasma. *Veterinary Medicine*, 80, 89-94.

Simard, J.R., Zunszain, P.A., Hamilton, J.A., Curry, S., 2006. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J. Mol. Biol.* 361(2), 336–351.

Stockham, S. L. 1995. Interpretation of equine serum biochemical profile results. *Veterinary clinics of North America: equine practice*, 11(3), 391-414.

Tanaka, K., Shigueoka, E.M., Sawatani, E., Dias, G.A., Arashiro, F., Campos, T.C.X.B., Nakao, H.C., 1998. Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. *Brarzilian Journal of Medica and Biological Research*, 31(11), 1383-1388.

Tennent-Brown, B., 2011. Plasma therapy in foals and adult horses. *Compend Contin Educ Vet*, 33, E1-4.

Udroiu, I. 2017. Storage of Blood in the Mammalian Spleen: An Evolutionary Perspective. *Journal of Mammalian Evolution*, 24(3), 243-260.

Vargas-Arroyo, M. 2006. Implementación de un método para la purificación de albúmina a partir de plasma equino (Doctoral dissertation, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología).

Vargas, M., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., León G., Burnouf T., 2012. Purification of IgG and albumin from human plasma by aqueous two-phase system fractionation. *Biotechnol Prog*, 28(4), 1005-1011.

Vargas, M., Segura, Á., Wu, Y.W., Herrera, M., Chou, M.L., Villalta, M., León, G., Burnouf, T., 2015a. Human plasma-derived immunoglobulin G fractionated by an aqueous two-phase system, caprylic acid precipitation, and membrane chromatography has a high purity level and is free of detectable in vitro thrombogenic activity. *Vox Sanguinis*, 108(2), 169-177.

Vargas, M., Segura, Á., Villalta, M., Herrera, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2015b. Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. *Biologicals* 43, 37-46.

Waghmare, A.B., Salvi, N.C., Deopurkar, R.L., Shenoy, P.A., Sonpetkar, J.M., 2014. Evaluation of health status of horses immunized with snake venom and montanide adjuvants, IMS 3012 (nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (emulsion based) during polyvalent snake antivenom production: hematological and biochemical assessment. *Toxicon* 82, 83-92.

Zhang, W., Lib, Z.J., Agblevora, F.A., 2005. Microbubble fermentation of recombinant *Pichia pastoris* for human serum albumin production. *Process Biochemistry* 40(6), 2073-2078.