

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**COMPARACIÓN ENTRE INMUNIZACIÓN PASIVA E
INMUNIZACIÓN ACTIVA COMO PROCEDIMIENTO PARA
CONTROLAR LOS ENVENENAMIENTOS PRODUCIDOS POR LA
SERPIENTE *Bothrops asper* (TERCIOPELO) EN UN MODELO
CANINO**

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

DANIEL CHAVARRÍA CHAN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a las personas (familia, amigos, colegas y profesores) que han creído en mí y han sido un apoyo para poder llegar hasta este punto. En especial, quiero dedicarle este trabajo a todos mis pacientes que me han inspirado para buscar ser un mejor profesional.

Agradecimientos

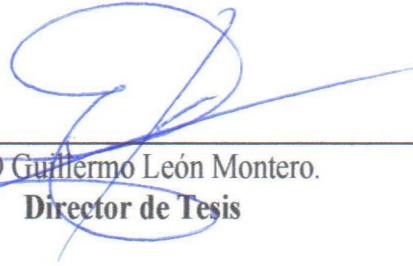
Agradezco a Dios y mi familia por las posibilidades que me han brindado a lo largo de mi vida y el apoyo que me han dado siempre. A los colegas que colaboraron de una u otra forma con la realización de esta investigación. Una mención especial merece mi comité asesor y todas las personas del ICP que, sin conocerme, me abrieron las puertas para lograr este trabajo.

Este estudio fue financiado por la IFS (International Foundation for Science; Grant agreement B/5043-1) y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica mediante el proyecto 741-B2-501, titulado “Estudio de la respuesta inmune contra el veneno de la serpiente *Bothrops asper*: Diseño de una vacuna antiofídica para prevenir los envenenamientos por mordedura de serpiente en Centroamérica”.

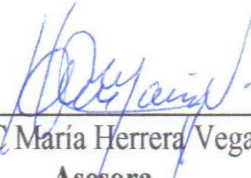
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Análisis clínicos e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.”



Ph.D Julián Fernández Ulate
**Decano o Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



Ph.D Guillermo León Montero.
Director de Tesis



Ms.C María Herrera Vega.
Asesora



Ph.D Mariángela Vargas Arroyo.
Asesora



Ph.D Carlos Chacón Díaz.
**Director Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología,
Análisis Clínicos e Inmunología**



Daniel Chavarría Chan
Candidato

TABLA DE CONTENIDOS

	pág
Portada.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	ii
Hoja de aprobación.....	iii
Tabla de contenidos.....	iv
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de cuadros.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
1. ANTECEDENTES.....	01
1.1. Problemática de accidentes ofídicos a nivel mundial.....	01
1.2. Accidentes ofídicos en Costa Rica.....	02
1.3. Accidentes ofídicos en medicina veterinaria.....	03
1.4. Historia natural de la serpiente <i>Bothrops asper</i>	05
1.5. Componentes del veneno de <i>Bothrops asper</i> y sus efectos tóxicos.....	06
1.6. Tratamiento por inmunización pasiva con antivenenos.....	07
1.7. Inmunización activa con toxoide botrópico.....	09
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVO GENERAL.....	11
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
5.1. Consideraciones éticas.....	12
5.2. Determinación de una dosis eficaz de antiveneno.....	12
5.2.1. Antiveneno equino.....	12
5.2.2. Prueba de coagulación de sangre.....	12

5.2.3. Estudio clínico de perros accidentalmente envenenados por <i>Bothrops asper</i>	13
5.3. Evaluación de la farmacocinética del antiveneno equino en un modelo canino	14
5.3.1. Inmunización pasiva y recolección de muestras.....	14
5.3.2. Determinación de anticuerpos equinos anti-veneno por ELISA.....	14
5.3.3. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos.....	15
5.3.4. Determinación de la Dosis Eficaz Media (DE ₅₀).....	16
5.3.5. Cálculo de la potencia del suero de perros inmunizados pasivamente en t _{max}	16
5.4. Evaluación de la respuesta por anticuerpos inducida por el toxoide botrópico.....	17
5.4.1. Veneno y toxoide botrópico.....	17
5.4.2. Inmunización de perros con toxoide botrópico.....	17
5.4.3. Determinación de anticuerpos caninos anti-veneno por ELISA.....	18
6. RESULTADOS.....	20
6.1. Dosis eficaz de antiveneno en perros envenenados por <i>Bothrops asper</i>	20
6.2. Farmacocinética del antiveneno equino en un modelo canino.....	23
6.3. Inmunización activa de perros con toxoide botrópico.....	25
7. DISCUSIÓN.....	27
7.1. Dosis eficaz de antiveneno en perros envenenados por <i>Bothrops asper</i>	27
7.2. Farmacocinética del antiveneno equino en un modelo canino.....	30
7.3. Inmunización activa de perros con toxoide botrópico.....	34
8. CONCLUSIONES.....	38
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	39
10. REFERENCIAS.....	40

Resumen

Los accidentes ofídicos en animales domésticos son un problema importante para la garantía del bienestar animal en Costa Rica. En este trabajo se comparó la inmunización pasiva por administración de antivenenos con la inmunización activa con un toxoide botrópico para evaluar si el segundo tratamiento podría servir para controlar los envenenamientos por mordedura de *B. asper* en perros. Se encontró que, al igual que en otras especies como humanos, vacas y caballos, los envenenamientos producidos por la mordedura de *B. asper* en perros se caracterizan por efectos locales como edema, dolor, necrosis y eventualmente hemorragia; y por efectos sistémicos como mal estar general, coagulopatía, hemorragia y eventualmente la muerte. Aunque no existe consenso entre los veterinarios sobre la forma de clasificar los envenenamientos, la dosis que debe ser administrada y la vía de administración de antivenenos ofídicos, la mayoría de los veterinarios dicen tener resultados satisfactorios usando una dosis de 20 mL administrada por vía intravenosa. La farmacocinética de esta dosis de antiveneno en perros indica que el t_{max} se alcanza a las 0.02 h con una Cn_{max} de 0.060 mg/mL. Considerando que la potencia de formulación del antiveneno es de 5.8 mg/mL, pudo calcularse que en el t_{max} , la potencia del suero de los perros inmunizados pasivamente se aproxima a 0.21 mg/mL. Este valor fue superado por la potencia de los sueros de un grupo de perros sometidos a hiperinmunización con veneno nativo (i.e. 0.37 mg/mL), pero solo por algunos de los perros inmunizados con toxoide botrópico, que no lograron llegar a los 6 meses manteniendo ese título. Estos resultados indican que la inmunización activa con toxoide botrópico usada en este experimento no induce una respuesta protectora duradera que pueda conferir inmunidad a perros envenenados por mordedura de *Bothrops asper*.

Abstract

Snake bite envenomations in domestic animals are a real problem for animal welfare in Costa Rica. In this paper, we compared passive immunization through administration of antivenoms to active immunization through administration of bothropic toxoid. The objective was to evaluate if the latter was suitable as a prophylactic way to prevent *B. asper* envenomation in dogs. We observed that the symptoms in dogs bitten by *B. asper* are similar to what it's seen in other species, such as humans, cattle and horses. Dogs showed local effects, such as edema, pain, necrosis, and hemorrhage. Systemic effects (malaise, coagulopathy, hemorrhage and eventually death) were also seen. Even when there is no consensus about how to classify, treat and manage canines bitten by this snake, most veterinarians claim to have satisfactory results with 20 ml of antiophytic serum by I.V. injection. Pharmacokinetics of this dose of antivenom in dogs revealed that t_{max} was achieved at 0.02 h, with a $C_{n_{max}}$ of 0.060 mg/mL. Since the strength of the antivenom used was 5.8 mg/mL, we calculated that at t_{max} , the strength achieved in dog's serum passively immunized was close to 0.21 mg/mL. On the other hand, all dogs actively immunized with native venom in Freund's adjuvant achieved higher values (i.e. 0.37 mg/mL), but only some dogs actively immunized with bothropic toxoid developed a good response, which was lost after 6 months. These results show that active immunization with the bothropic toxoid used in this research does not induce a long lasting immunity that will prevent envenomation by *Bothrops asper* in dogs.

Lista de cuadros

Cuadro 1: Casos incluidos en el estudio clínico de perros envenenados por mordedura accidental de terciopelo.

Cuadro 2: Parámetros farmacocinéticos de un antiveneno formulado con inmunoglobulinas equinas en un modelo canino.

Cuadro 3: Potencia neutralizante proyectada del plasma de caninos inmunizados con Toxoide Botrópico.

Lista de figuras

Figura 1: Incidencia de mordeduras de serpiente, por distrito, del año 1990 al 2007. (Tomado de Hansson et al., 2013).

Figura 2: Caso de perro mordido en la pata delantera izquierda por una serpiente *B. asper*. (Foto: Carlos Rodríguez VMD).

Figura 3: Serpiente *B. asper*, conocida como Terciopelo o Barba amarilla. A. Hembra adulta. B. Postura defensiva/agresiva. C. Neonato. (Tomado de Sasa et al., 2009).

Figura 4: Tracto digestivo de un perro con manifestaciones de hemorragia sistémica producida por el veneno de *B. asper*.

Figura 5: Reacción adversa inducida en un perro por la administración intravenosa de antiveneno de origen equino.

Figura 6: Curva concentración/tiempo de anticuerpos equinos anti-veneno en el suero de perros inmunizados pasivamente con 20 mL de antiveneno.

Lista de abreviaturas

ACOPROBA: Asociación Costarricense Pro-Bienestar Animal

AUC_{all}: Área bajo la curva concentración/tiempo en todos los puntos (acrónimo en inglés)

AUC_∞: Área bajo la curva concentración/tiempo proyectada al infinito (acrónimo en inglés)

BSA: Albúmina bovina sérica (acrónimo en inglés)

CL: Aclaramiento sistémico

C_{nmax}: Concentración máxima

CO₂: Dióxido de carbono

DE₅₀: Dosis eficaz media

DL₅₀: Dosis letal media

ELISA: Ensayo inmunoenzimático de adsorción

g: gramo

h: hora

Inec: Instituto Nacional de Estadística y Censos.

i.m.: intramuscular

i.v.: intravenoso

kg: kilogramo

LAAOs: L-aminoácido oxidasas (acrónimo em inglês)

min: minuto

mL: mililitro

μL: microlitro

NaCl: Cloruro de sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Amortiguador de fosfatos (acrónimo en inglés)

pH: potencial de hidrogeniones

PLA₂: Fosfolipasas A₂

SVMPs: Metaloproteinasas de venenos de serpiente (acrónimo en inglés)

SVSPs: Serinaproteinasas de venenos de serpiente (acrónimo en inglés)

t_{1/2}: Vida media

t_{max}: Tiempo de concentración máxima

V_Z: Volumen aparente de distribución



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Daniel Chavarría Chan, con cédula de identidad 1 1190 0485, en mi condición de autor del TFG titulado COMPARACIÓN ENTRE INMUNIZACIÓN PASIVA E INMUNIZACIÓN ACTIVA COMO PROCEDIMIENTO PARA CONTROLAR LOS ENVENENAMIENTOS PRODUCIDOS POR LA SERPIENTE Bothrops asper (TERCIOPELO) EN UN MODELO CANINO.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Karwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Daniel Chavarría Chan

Número de Carné: B 58375 Número de cédula: 1 1190 0485

Correo Electrónico: drchavarría@gmail.com

Fecha: 31 de julio, 2020 Número de teléfono: 8864 7858

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Guillermo León Montero.

DANIEL FRANCISCO
CHAVARRIA CHAN
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
DANIEL FRANCISCO
CHAVARRIA CHAN (FIRMA)
Fecha: 2020.07.31 01:22:16
-05'00'

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declara contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Karwá.

1. ANTECEDENTES

1.1. Problemática de accidentes ofídicos a nivel mundial

Los envenenamientos por mordeduras de serpiente son un problema de salud serio a nivel mundial, especialmente en las regiones tropicales de África, Asia y Latinoamérica (Bhaumik et al., 2018). En seres humanos, la cantidad de accidentes ofídicos no está clara, pero se estima en 2.5 millones anuales, con una mortalidad de 125.000 casos (Julve et al., 2018). Sin embargo, lo más probable es que las cifras reales sean mayores.

Los accidentes ofídicos afectan, mayoritariamente, a las poblaciones dedicadas a labores agrícolas, las cuales suelen ser las más pobres. Usualmente, este sector poblacional tiene menor acceso a servicios de salud y recurren a tratamientos de medicina tradicional, lo que retrasa la instauración de un tratamiento apropiado (Yañez et al., 2014). La mortalidad y las secuelas físicas y psicológicas producidas por estos accidentes suelen perpetuar la pobreza (Bolon et al., 2019). A pesar del impacto socioeconómico de los envenenamientos por mordedura de serpientes, hasta hace poco, este problema de salud no había recibido mayor atención por parte de las autoridades competentes tanto a nivel local como a nivel global.

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó a los accidentes ofídicos dentro de la lista de enfermedades desatendidas (Chippaux, 2017). Esta entidad ha calculado que se requieren al menos 10 millones de viales de antiveneno (i.e. el único tratamiento que ha demostrado ser efectivo contra los accidentes ofídicos) para satisfacer la demanda mundial, la cual supera la capacidad de producción de los 46 fabricantes de antivenenos antiofídicos inscritos en sus registros (Scheske et al., 2015).

1.2. Accidentes ofídicos en Costa Rica

La coincidencia de los hábitats de las serpientes venenosas con las regiones donde se ubican asentamientos humanos y se realizan diferentes actividades agropecuarias, hace que cada año en América Central ocurran aproximadamente 4.000 casos de envenenamientos por mordedura de serpiente en humanos (Gutiérrez, 2014). La terciopelo (*Bothrops asper*) es la serpiente de mayor importancia médica en esta región, ya que produce entre el 50 y el 80% de los accidentes ofídicos, y es responsable del 60-90% de los casos mortales (Hansson et al., 2013).

En Costa Rica, hay regiones donde los accidentes ofídicos se presentan con mayor incidencia, siendo la región sur la más afectada (Figura 1). La población con mayor riesgo suele dedicarse a labores agrícolas en zonas rurales (Hansson et al., 2013). Además, la relación de casos fatales entre hombres y mujeres es de 5:1 (Fernández y Gutiérrez, 2008).

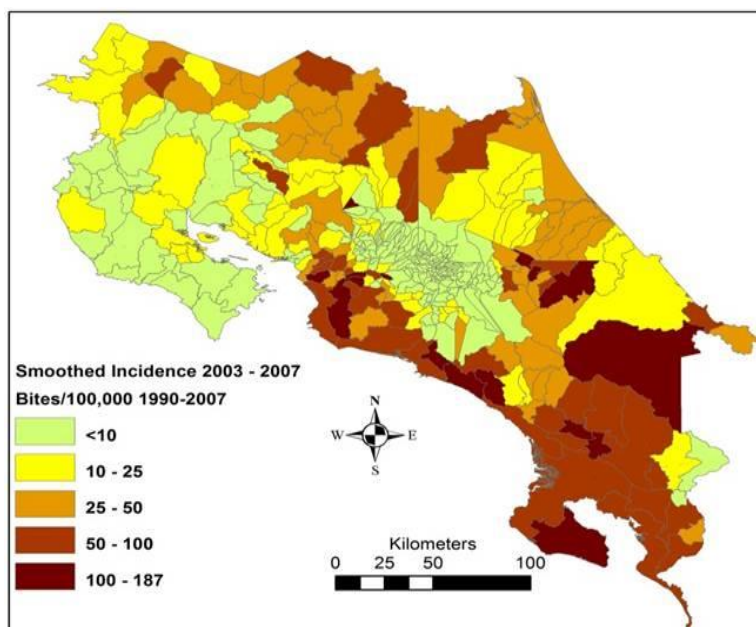


Figura 1: Incidencia de mordeduras de serpiente, por distrito, del año 1990 al 2007. (Tomado de Hansson et al., 2013).

1.3. Accidentes ofídicos en medicina veterinaria

En medicina veterinaria, si bien se reconoce la importancia de los accidentes ofídicos como problema frecuente de salud animal, no existen reportes oficiales de la cantidad de casos que ocurren cada año. Las mordeduras por serpientes han sido reportadas en varias especies domésticas como perros, gatos, caballos, cerdos, aves de corral, entre otros. Además de la afectación al bienestar animal, estos envenenamientos tienen un impacto económico innegable (Bolon et al., 2019).

Según la Encuesta Nacional Agropecuaria realizada en el 2017 por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (Inec), 6.862 cabezas de ganado murieron como consecuencia de ataques producidos por felinos y serpientes (Inec, 2018). Datos preliminares, recolectados de manera no sistematizada en localidades donde los ganaderos no dan tratamiento alguno a sus animales envenenados, sugieren que solo 2 de cada 10 vacas mordidas por serpiente llegan a morir. Esta aproximación en conjunto con los datos del Inec permiten calcular que alrededor de 30.000 cabezas de ganado son envenenadas cada año en Costa Rica.

Considerando que en el 2017 el hato nacional era de 1.497.551 animales (Inec, 2018), puede estimarse que la incidencia de mordeduras en ganado vacuno podría ser cercana al 2%. Cálculos similares de la incidencia de envenenamientos en caballos y perros no son posibles de ser realizados debido a que la información disponible es muy limitada. Tampoco se tienen aproximaciones del número de casos de ofidismo que podrían ocurrir en otros países.

En Costa Rica, existe consenso entre los veterinarios respecto a que *Bothrops asper* es la serpiente que con mayor frecuencia ataca al ganado vacuno. Los signos clínicos

observados en bovinos envenenados por la mordedura de *B. asper* incluyen efectos locales como inflamación, necrosis y hemorragia; y efectos sistémicos como coagulopatía, hemorragia y eventualmente la muerte (Rodríguez et al., 2016). Análisis patológicos han evidenciado que durante el envenenamiento también se produce edema pulmonar y de epiglotis, hemorragia en corazón y aparato digestivo, hepatomegalia, dilatación de vesícula y hematomas renales (Berrocal et al., 1998).



Figura 2: Caso de perro mordido en la pata delantera izquierda por una serpiente *B. asper*. (Foto: Carlos Rodríguez VMD).

Información recopilada de forma anecdótica indica que a nivel local los perros presentan inflamación, dolor, edema y hemorragia (Figura 2), y que a nivel sistémico presentan hemorragia, coagulopatía, insuficiencia renal y muerte. Sin embargo, no se cuenta con una descripción detallada de la evolución clínica de los casos de envenenamiento por *B. asper* en perros. Reportes de caninos mordidos por otros vipéridos describen una

sintomatología similar a la presentada en el bovino (Jacome et al, 2002) y a la observada por el autor.

1.4. Historia natural de la serpiente *Bothrops asper*

El género *Bothrops* comprende un grupo de 37 especies que incluye a la serpiente *B. asper*, también conocida como terciopelo o barba amarilla (Sasa et al., 2009). Esta serpiente habita preferentemente entre los 0 y 600 metros sobre el nivel del mar (pero puede encontrarse hasta los 1200 m.s.n.m.), en los bosques tropicales húmedos distribuidos desde el noreste de México hasta las tierras bajas del Pacífico de Colombia y Ecuador (Solórzano, 2004).

B. asper puede alcanzar un tamaño de 250 cm de longitud y posee un temperamento irritable (Solórzano et al., 2004). Su coloración dorsal varía de café, oliva, gris o gris oscuro, con un patrón triangular. Su vientre suele ser de color crema, generalmente sin marcas y eventualmente con algunas marcas oscuras (Figura 3; Solórzano et al., 2004; Sasa et al., 2009). Su dieta está compuesta por pequeños mamíferos, aves, anuros, otros reptiles y ocasionalmente artrópodos (Sasa et al., 2009).



Figura 3: Serpiente *B. asper*, conocida como Terciopelo o Barba amarilla. A. Hembra adulta. B. Postura defensiva/agresiva. C. Neonato. (Tomado de Sasa et al., 2009).

1.5. Componentes del veneno de *B. asper* y sus efectos tóxicos

El veneno de la serpiente *B. asper* es una mezcla de proteínas capaces de producir diferentes efectos tóxicos. En el caso de ejemplares adultos del Pacífico de Costa Rica, esta mezcla está compuesta por 45% de fosfolipasas (PLA₂s), 44% de metaloproteinasas dependientes de Zn²⁺ (SVMPs), 5% L-aminoácido oxidasas (LAAOs), 4% de serinoproteinasas (SVSPs) y 2% de componentes minoritarios como disintegrinas, proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs) y lectinas tipo C (Alape-Girón et al., 2008). Sin embargo, esta composición puede cambiar de acuerdo con variaciones en el origen geográfico de los ejemplares y su ontogenia (Alape-Girón et al., 2008; Segura et al., 2012).

El principal efecto tóxico producido por las PLA₂s de *B. asper* es la necrosis del tejido muscular en el área donde el veneno es inyectado (Angulo y Lomonte, 2009). Además, a estas proteínas también se les atribuye una importante contribución a la formación del edema, mediante la inducción de contracción en los vasos linfáticos de la región anatómica afectada (Mora et al., 2008).

Por su parte, las SVMPs participan activamente del envenenamiento propiciando la ruptura de pequeños vasos sanguíneos e induciendo hemorragia tanto a nivel local como sistémico (Gutiérrez et al., 2009a; 2009b). Otros efectos tóxicos que se desarrollan con la participación de estas toxinas son dermonecrosis y coagulopatía (Gutiérrez et al., 2009a).

Algunos componentes poco abundantes en el veneno también contribuyen en algún grado con los efectos tóxicos inducidos por el veneno. Por ejemplo, las SVSPs juegan un papel central en la inducción de coagulopatía, mientras que las lectinas tipo C contribuyen levemente a la coagulopatía y a las hemorragias (Gutiérrez et al., 2009a), y las disintegrinas inhiben la agregación plaquetaria y la angiogénesis (Angulo et al., 2014). Por su parte las

LAAOs y las CRISPs no han sido asociadas con efectos tóxicos relevantes (Angulo y Lomonte, 2009).

1.6. Tratamiento por inmunización pasiva con antivenenos ofídicos

En la actualidad, el tratamiento indicado para los envenenamientos por mordedura de serpiente se basa en la administración de antivenenos, también conocidos como sueros antiofídicos. Los antivenenos son preparaciones de anticuerpos obtenidos del plasma de animales que han sido inmunizados con venenos de serpiente (Gutiérrez et al., 2011).

La producción de antivenenos inicia con la obtención del veneno de serpiente que se quiere neutralizar. Este veneno es inyectado en los animales (usualmente caballos, aunque también se puede emplear ovejas o gallinas) para estimular en ellos la producción de inmunoglobulinas anti-veneno. Posteriormente, las inmunoglobulinas son purificadas mediante diversos métodos físico-químicos, formuladas con excipientes como preservantes y estabilizantes, esterilizadas por filtración y dispensadas asépticamente en viales de grado farmacéutico. Antes de ser liberados para el consumo, cada lote de antiveneno debe superar un riguroso control de calidad con el que se verifica el cumplimiento de las especificaciones de diseño (León et al., 2016).

La eficacia de los antivenenos se ve afectada por factores propios de la formulación, como 1) la especificidad del antiveneno por el veneno de la serpiente que produce el accidente, 2) la potencia de formulación del antiveneno y 3) la dosis de antiveneno administrada (Gutiérrez et al., 2011). Sin embargo, otros factores que afectan la eficacia del tratamiento con antivenenos están más relacionados con las particularidades de cada caso de

envenenamiento; por ejemplo 1) la especie animal que sufre el envenenamiento, 2) la cantidad de veneno inyectado, 3) el sitio anatómico donde el veneno es inyectado, 4) el tiempo transcurrido entre el envenenamiento y la administración del antiveneno, y 5) la vía por la cual el antiveneno es administrado (Rodríguez et al., 2016).

Existe evidencia que indica que cuando se aplica correcta y oportunamente, el tratamiento con antivenenos es eficaz para el tratamiento de los envenenamientos producidos por *B. asper* en animales domésticos (Rodríguez et al., 2016). Sin embargo, el hecho de que con frecuencia los animales son mordidos en horas de la noche, no siempre hace posible que los antivenenos sean administrados a tiempo. En esta circunstancia, la administración del antiveneno ocurre hasta el día siguiente, luego de que el animal ha permanecido envenenado por más de 8 horas, los signos de envenenamiento han evolucionado a una mayor severidad, y las posibilidades de rescatar al animal han disminuido considerablemente (Rodríguez et al., 2016).

Otra desventaja que se puede señalar al tratamiento de animales domésticos con antivenenos es la manifestación de reacciones adversas. En bovinos y equinos, estas reacciones se presentan con incidencias menores al 3% (Estrada et al., 2010), aunque la misma formulación en humanos induce reacciones adversas con una incidencia entre el 20-25% (Otero et al., 1999; 2006; 2012). En gatos, las reacciones adversas inducidas por la administración de antiveneno han sido observadas en un 22% de los pacientes, incrementando hasta 10 veces las posibilidades de muerte (Pashmakova et al., 2013). En los perros este número llega al 7% de los casos (Schaeffer et al., 2012).

1.7. Inmunización activa con toxoide botrópico

La inmunización con toxoides preparados a partir de venenos de serpiente ha sido sugerida como una alternativa para mejorar la probabilidad de supervivencia de animales domésticos envenenados en condiciones en las que la administración de antiveneno no puede realizarse de forma oportuna (Carvalho, et al., 2000; Gilliam et al., 2013; Cates, et al., 2015; Herrera et al., 2017). Sin embargo, no es claro que todas las formulaciones desarrolladas hayan resultado ser eficaces (Gilliam et al., 2013).

Para que la inmunización activa con un toxoide botrópico pueda considerarse eficaz a nivel preclínico, esta debe inducir en el animal un título de anticuerpos igual o mayor que la concentración máxima de anticuerpos anti-veneno alcanzada en plasma, luego de la administración intravenosa de una dosis terapéuticamente eficaz de antiveneno (Herrera et al., 2017). Si este título es alcanzado, se establece la base ética para ensayar la eficacia del toxoide en la prevención del envenenamiento producido luego de la mordedura accidental de una serpiente venenosa.

Recientemente ha sido demostrado que la inmunización activa de ganado bovino con un toxoide botrópico resulta en el incremento de la resistencia de bovinos contra el veneno de *B. asper* (Herrera et al., 2017). Sin embargo, no se han realizado experiencias que demuestren la eficacia de esta práctica con otros animales domésticos como caballos o perros. La presente tesis se plantea con el objeto de comparar la inmunización pasiva con un antiveneno y la inmunización activa con un toxoide, como procedimiento para controlar los envenenamientos producidos en perros por la mordedura de la serpiente *B. asper*.

2. HIPÓTESIS:

Los perros inmunizados activamente con un toxoide botrópico desarrollan una respuesta por anticuerpos, cuya eficacia en el control de los efectos tóxicos del veneno de *B. asper* es similar o superior a la que se observa luego de la administración temprana de una dosis terapéutica de antiveneno.

|

3. OBJETIVO GENERAL:

Relacionar la farmacocinética de un antiveneno anti-botrópico en perros con el título de anticuerpos desarrollado por estos animales tras la inmunización activa con un toxoide botrópico, para determinar cuál de las dos estrategias de inmunización resulta más eficaz en el control de los efectos tóxicos producidos por el veneno de la serpiente *B. asper*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.1. Caracterizar la clínica presentada por perros envenenados accidentalmente por la mordedura de la serpiente *B. asper* y la forma en la que esta clínica responde al tratamiento con diferentes dosis de antiveneno, para validar alguna dosis como dosis eficaz de antiveneno en estos casos.

4.2. Determinar los parámetros farmacocinéticos de la dosis eficaz de antiveneno en perros, para establecer la concentración plasmática mínima de inmunoglobulinas equinas anti-veneno que tienen la capacidad de controlar los efectos del envenenamiento accidental producido por *B. asper*.

4.3. Determinar la concentración plasmática de inmunoglobulinas caninas anti-veneno producidas como respuesta a la inmunización activa con toxoide botrópico, para establecer si esta alcanza la concentración plasmática mínima de inmunoglobulinas anti-veneno requeridas para controlar los efectos del envenenamiento accidental producido por *B. asper*.

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., 2010). 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; Acta 072-2019) de la Universidad de Costa Rica.

5.2. Determinación de una dosis eficaz de antiveneno.

5.2.1. Antiveneno equino

Se empleó el antiveneno PoliVet-ICP (lote 555) producido por el Instituto Clodomiro Picado. Este antiveneno está formulado con inmunoglobulinas completas, purificadas mediante la técnica del ácido caprílico (Rojas et al., 1994), a partir del plasma de caballos inmunizados con los venenos de las serpientes *B. asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenoprhyis* (Angulo et al., 1997).

5.2.2. Prueba de coagulación de sangre.

Para la prueba de coagulación, muestras de 5 mL de sangre fueron recolectadas sin anticoagulante, por punción de la vena radial del perro cuyo estado estaba siendo evaluado. Posteriormente las muestras fueron colocadas en tubos de vidrio secos y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Cada cinco minutos los tubos fueron invertidos para evaluar si la

sangre había coagulado o no. La no coagulación de la sangre en un periodo de 20 min fue considerada como señal de coagulopatía. El tiempo de coagulación normal en perros fue determinado realizando esta prueba en la sangre de 10 perros no envenenados, con pesos corporales entre los 18 y 22 kg.

5.2.3. Estudio clínico de perros accidentalmente envenenados por *B. asper*

Se realizó un estudio clínico enrolando casos de perros envenenados por mordedura de serpiente durante 6 meses. Solo fueron considerados casos en los que los dueños se percataron del ataque de la serpiente en contra de su perro y pudieron dar certeza de: 1) la identidad de un ejemplar de *B. asper* como responsable del ataque (i.e. identificación por fotografía), 2) la hora en la que ocurrió el accidente, 3) la hora en la que el antiveneno fue administrado y 4) la dosis de antiveneno administrado. Los signos de envenenamiento que fueron evidentes al momento del abordaje del paciente fueron registrados. Todos los casos fueron tratados inmediatamente después de su admisión mediante la administración intravenosa de una dosis de 20 ml de antiveneno. La respuesta de los signos del envenenamiento luego de la administración del antiveneno fue observada y registrada durante las 48 horas siguientes a la administración del antiveneno.

5.3. Evaluación de la farmacocinética del antiveneno equino en un modelo canino

5.3.1. Inmunización pasiva y recolección de muestras.

Un grupo de 4 perros (2 hembras, 2 machos, sin raza definida, con una edad promedio de 4 años y un peso corporal entre 18 y 22 kg) fue inyectado intravenosamente (i.e. por la vena radial) con 20 mL de antiveneno, pues esta fue la dosis de menor volumen

que resultó validada en el estudio clínico. Luego, muestras de suero de los perros fueron recolectadas inmediatamente antes y en varios tiempos después de la administración del antiveneno (i.e. 1, 5, 15, 30, 60 minutos; 3, 6, 24 y 48 horas; y 1, 2, 3 y 4 semanas). Las muestras fueron congeladas hasta su análisis por ELISA para la determinación de anticuerpos equinos anti-veneno.

5.3.2. Determinación de anticuerpos equinos anti-veneno por ELISA

Se utilizó placas de ELISA de 96 pocillos (Costar 9017, Corning). Estas placas fueron recubiertas agregando a cada pocillo 100 μ L de una solución de veneno de *B. asper* a una concentración de 3 μ g/100 μ L, usando como disolvente un amortiguador de fosfatos (0.14 M NaCl, 0.04 M fosfatos y pH 7.2; PBS), e incubando las placas toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente las placas fueron lavadas 10 veces con agua destilada, para después agregar 100 μ L de antiveneno o de muestras de suero (i.e. de los perros inmunizados pasivamente con antiveneno) diluidas en albúmina bovina (BSA) al 2% en PBS. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas con agua destilada y luego fueron cargadas con 100 μ L de un conjugado anti-Igs equinas, preparado en conejos, marcado con peroxidasa y diluido en BSA2%/PBS. Luego de una última incubación de una hora a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas 10 veces con agua destilada, para posteriormente ser reveladas mediante la adición a cada pocillo de 150 μ L de una solución de *o*-fenilendiamina (Aldrich P23938, St. Louis, MO, USA) a 2mg/ml disuelto en un amortiguador de citrato de sodio 0.1M, pH 5, y en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% (1 μ l/mL). La reacción de color fue detenida agregando a cada pocillo 50 μ l de HCl 2M y la absorbancia fue determinada a 402 nm con un

fotómetro para microplacas (Multiskan FC; Thermo Scientific). La concentración de anticuerpos equinos anti-veneno fue calculada interpolando las absorbancias de las muestras en una curva de calibración construida graficando la absorbancia determinada para una serie de patrones de anticuerpos equinos anti-veneno (purificados por cromatografía de afinidad) en función de su concentración.

5.3.3. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados sin asumir compartimientos (Rojas et al., 2013). Las áreas bajo las curvas concentración/tiempo AUC_{all} y AUC_{∞} fueron calculadas empleando la regla de trapecios. La Concentración máxima ($C_{n_{max}}$) y el tiempo de Concentración máxima (t_{max}) fueron determinados a partir de la curva de concentración plasmática de inmunoglobulinas versus tiempo. Los demás parámetros farmacocinéticos fueron calculados empleando el software WinNonlin (versión 5.1). El volumen de distribución aparente (V_z), la vida media ($t_{1/2}$) y el aclaramiento sistémico (CL) fueron calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones: $V_z = D/(k_{el}AUC_{all})$; $t_{1/2} = \ln 2/k_{el}$; $CL = k_{el}V_z$, donde D representa la dosis y K_{el} la constante de eliminación. Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados para cada perro individualmente y expresados para el grupo de animales como la mediana y su intervalo de confianza del 95%.

5.3.4. Determinación de la dosis eficaz media (DE_{50})

Para la determinación de la DE_{50} , una cantidad constante de veneno de *B. asper* fue mezclada con diferentes diluciones de muestra (i.e. antiveneno, muestras de suero de los perros inmunizados pasivamente en el método 5.3.1. correspondientes al estado basal y al t_{max} , o muestras de suero de los perros inmunizados activamente con toxoide botrópico o

veneno nativo), de modo que una dosis de reto de 2 dosis letales medias (DL_{50} s) quedara contenida en un volumen de 0.5 mL. Luego de ser incubadas a 37°C por 30 minutos, las mezclas fueron inyectadas por vía intraperitoneal en grupos de cinco ratones de la cepa CD-1, de ambos sexos, con peso corporal de 18-20 g, proveídos por el Bioterio del Instituto Clodomiro Picado. Las muertes ocurridas durante las siguientes 48 h fueron registradas para calcular la potencia del antiveneno expresada como la dosis eficaz media (DE_{50}) en términos de mg de veneno por mL de antiveneno (i.e. mg/mL), de acuerdo con el método de Spearman-Kärber. Durante todo el proceso experimental, los animales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum*, en cajas de 42,5 cm x 26,6 cm x 18,5 cm, a 21°C con 64% de humedad y ciclos de luz de 12 horas. Los animales que sobrevivieron a la prueba fueron sometidos a eutanasia mediante inhalación de CO_2 .

5.3.5. Cálculo de la potencia del suero de perros inmunizados pasivamente en t_{\max}

La potencia de las muestras de suero de los perros inmunizados pasivamente (método 5.3.1.) correspondientes al t_{\max} fue calculada como el producto de la Cn_{\max} y el valor de DE_{50} del antiveneno, dividido por la concentración de inmunoglobulinas anti-veneno en el antiveneno, determinada por ELISA según el método 5.3.2. Esta potencia pronosticada fue sometida a comprobación mediante la determinación de la DE_{50} aplicada a la misma muestra.

5.4. Evaluación de la respuesta por anticuerpos inducida por el toxoide botrópico

5.4.1. Veneno y toxoide botrópico.

El veneno fue obtenido por estimulación mecánica de la glándula de veneno de ejemplares adultos de la especie *B. asper*, capturados en el Pacífico de Costa Rica y

mantenidos en cautiverio en el Serpentario del Instituto Clodomiro Picado. Este veneno fue estabilizado por liofilización hasta su uso en pruebas de laboratorio, o en la preparación de 3 lotes iguales de toxoide botrópico (A, B y C). Los tres lotes de toxoide botrópico fueron elaborados según el método descrito por Herrera y colaboradores (2017). Brevemente, 60 ml de una solución de veneno a una concentración de 10 mg/ml fue esterilizada por filtración a través de una membrana de 0.22 μm , para luego ser mezclada con 60 ml fosfato de calcio (Brenntag Biosector, Dinamarca). Posteriormente, la mezcla veneno/adyuvante fue incubada a 70°C durante 45 minutos para inactivar el veneno. No se adicionó preservantes. El toxoide botrópico se conservó en refrigeración (2 a 8°C) hasta su uso.

5.4.2. Inmunización de perros con el toxoide botrópico.

Para este experimento se empleó 4 grupos de 5 perros sin raza definida, clínicamente sanos, con un peso de entre 18 y 22 kg, y con un rango de edad de 1 a 5 años. Los perros fueron mantenidos en las instalaciones de la Asociación Costarricense Pro-Bienestar Animal (ACOPROBA), en un ambiente de montaña donde no es común encontrar serpientes *B. asper*, ubicado en el cantón de Aserrí, distrito de Tarbaca. Esta zona presenta una altura promedio de 1.796 metros sobre el nivel del mar. Ninguno de los perros tenía en su historia haber sufrido una mordedura por *B. asper*, lo cual fue confirmado por la determinación de anticuerpos caninos anti-veneno (ver método 5.4.3.) en las muestras basales. La inmunización se realizó aplicando a los perros tres inyecciones de 1 mL de toxoide botrópico, por vía subcutánea, a intervalos de 15 días (un grupo de cinco perros por cada lote de toxoide). Un grupo control fue conformado por 5 perros que en intervalos de 15 días fueron inyectados 5 veces con veneno nativo de *B. asper* por la vía subcutánea. Los primeros

dos refuerzos aplicados al grupo control estuvieron compuestos por 2 mg de veneno emulsificado en 2 mL del adyuvante de Freund completo (el primer refuerzo) o en el adyuvante de Freund incompleto (el segundo refuerzo). Los 3 refuerzos restantes estuvieron compuestos por 2 mg de veneno nativo disuelto en PBS. Previo a cada inyección y 6 meses posteriores al último refuerzo, se tomaron muestras de sangre para determinar el título de anticuerpos anti-veneno a lo largo del esquema de inmunización, tanto de los grupos inyectados con toxoide como del grupo control.

5.4.3. Determinación de anticuerpos caninos anti-veneno por ELISA

Se utilizó placas de ELISA de 96 pocillos (Costar 9017, Corning). Estas placas fueron recubiertas agregando a cada pocillo 100 μ L de una solución de veneno de *B. asper* a una concentración de 3 μ g/100 μ L, usando como disolvente un amortiguador de fosfatos (0.14 M NaCl, 0.04 M fosfatos y pH 7.2; PBS), e incubando las placas toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente las placas fueron lavadas 10 veces con agua destilada, para después agregar 100 μ L de muestras de suero (i.e. de los perros inmunizados activamente con toxoide botrópico o con veneno nativo) diluidas en albúmina bovina (BSA) al 2% en PBS. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas con agua destilada y luego fueron cargadas con 100 μ L de un conjugado anti-IgG caninas, preparado en conejos, marcado con peroxidasa y diluido en BSA2%/PBS. Luego de una última incubación de una hora a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas 10 veces con agua destilada, para posteriormente ser reveladas mediante la adición a cada pocillo de 150 μ L de una solución de *o*-fenilendiamina (Aldrich P23938, St. Louis, MO, USA) a 2mg/ml disuelto en un amortiguador de citrato de sodio 0.1M, pH 5, y en presencia

de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% ($1\mu l/mL$). La reacción de color fue detenida agregando a cada pocillo $50\mu l$ de HCl $2M$ y la absorbancia fue determinada a 402 nm con un fotómetro para microplacas (Multiskan FC; Thermo Scientific). La concentración de anticuerpos caninos anti-veneno fue calculada interpolando las absorbancias de las muestras en una curva de calibración construida graficando la absorbancia determinada para diferentes diluciones de una mezcla de los sueros de los perros del grupo control, en función de su potencia determinada según el método 5.3.4.

6. RESULTADOS

6.1. Dosis eficaz de antiveneno en perros envenenados por *B. asper*

Veintiocho casos de perros mordidos por serpiente fueron recibidos. De estos, únicamente 9 casos cumplieron los requisitos de inclusión (i.e. certeza de la identidad de un ejemplar de *B. asper* como responsable del ataque, la hora en la que ocurrió el accidente, la hora en la que el antiveneno fue administrado y la dosis de antiveneno administrado).

En cinco casos, los perros fueron mordidos en los miembros anteriores, en tres la mordedura ocurrió en la cabeza y en uno en el tórax (Cuadro 1). Con respecto al tiempo transcurrido entre la mordedura y la atención médica, se establecieron rangos: de 0 a 6 horas (1 caso), 6 a 12 horas (3 casos), 12 a 24 horas (4 casos) y más de 24 horas (1 caso). Al momento de la evaluación clínica, todos los animales mordidos presentaron taquicardia, taquipnea, dolor, inflamación y edema en la zona mordida.

Cuadro 1: Casos enrolados en el estudio clínico de perros envenenados por mordedura accidental de terciopelo.

Observación	Identificación del caso								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
Zona anatómica de la mordedura	Nariz	Cuello	Belfos	Mano	Mano	Pata	Mano	Pata	Tórax
Lapso entre accidente y tratamiento (h)	0-6	6-12	12-24	12-24	6-12	6-12	12-24	12-24	>24
Coagulopatía al momento de tratamiento	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí
Necrosis al momento de tratamiento	No	Sí	Sí	No	No	No	Sí	No	No
Clasificación del envenenamiento*	M	M	S	M	L	L	M	M	S
Dosis de antiveneno	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Sobrevida del animal	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No

* Los envenenamientos fueron clasificados según su severidad como no envenenamiento (N), envenenamiento leve (L), envenenamiento moderado (M) ó envenenamiento severo (S).

Siete de los animales envenenados presentaron coagulopatía (i.e. tiempo de coagulación superior a 20 min; Cuadro 1). En 10 perros no envenenados se determinó un tiempo de coagulación de $8.75 \pm 0,46$ minutos. Algunas zonas necróticas fueron encontradas en aquellos animales en los que el envenenamiento se desarrolló sin tratamiento durante más horas (Cuadro 1).

En todos los casos la dosis de antiveneno empleada fue de 20 mL y la vía de administración fue intravenosa (i.v.). En algunos casos no incluidos en el estudio se usaron dosis superiores y la vía intramuscular (i.m.). También en todos los casos se instauró una terapia analgésica (e.g. tramal), antibiótica (e.g. amoxicilina) y de fluidos (NaCl 0.9 %). A pesar de la administración de antiveneno, hubo dos casos letales: uno de ellos fue mordido en el tórax y transcurrieron más de 24 horas entre el accidente y la atención médica; el otro caso se trató de una mordedura en el belfo y para cuando el antiveneno fue administrado ya habían transcurrido entre 12 y 24 horas. Los otros 7 casos se recuperaron sin complicaciones.

Durante el estudio se tuvo acceso a dos casos que si bien es cierto no cumplieron los criterios de inclusión, ofrecieron imágenes que ilustran algunos hallazgos clínicos que pueden encontrarse en casos de perros envenenados y durante el tratamiento con antivenenos; y que según nuestra opinión, merecen ser registradas. La primera corresponde a un animal envenenado que sufrió coagulopatía y una hemorragia interna severa, evidenciada macroscópicamente en la irrigación sanguínea de la membrana mesenterial (Figura 4); la segunda corresponde a un perro que luego de la administración intravenosa del antiveneno presentó una reacción anafiláctica caracterizada por urticaria y edema facial, sin compromiso de la función respiratoria (Figura 5).

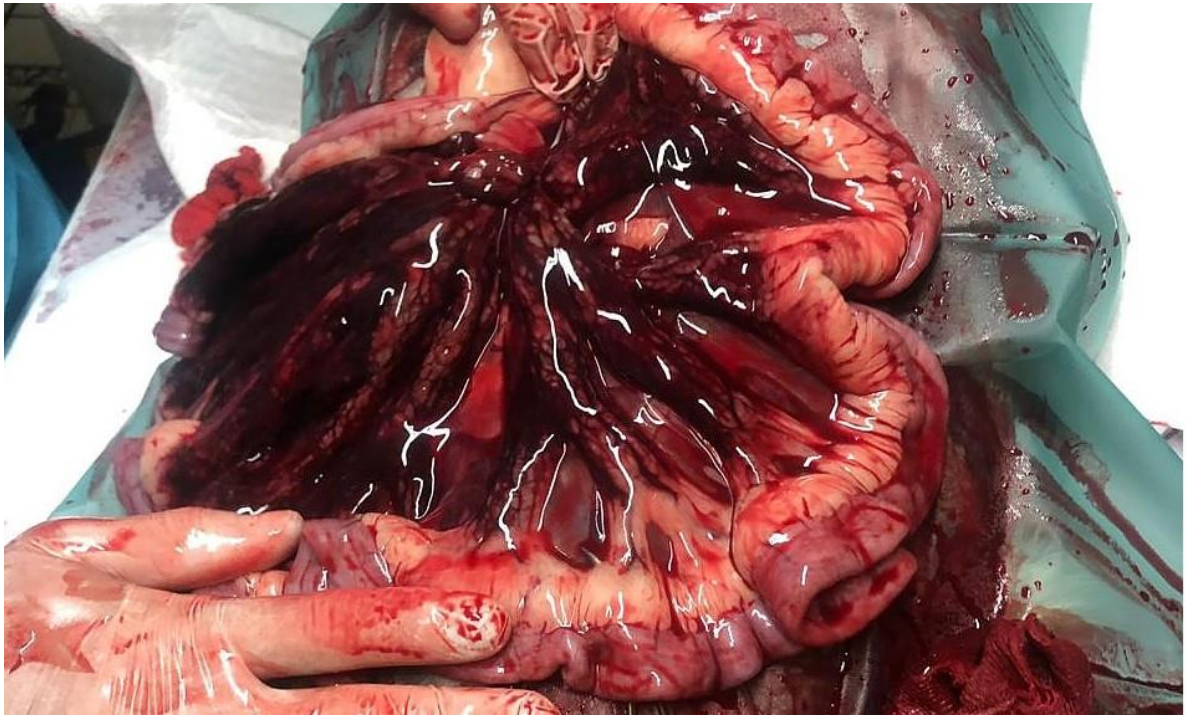


Figura 4: Tracto digestivo de un perro con manifestaciones de hemorragia sistémica producida por el veneno de *B. asper*.



Figura 5: Reacción adversa inducida en un perro por la administración intravenosa de antiveneno de origen equino.

6.2. Farmacocinética del antiveneno equino en un modelo canino.

Para el estudio de farmacocinética se usó una dosis de 20 mL, administrada por vía intravenosa. Esta dosis fue seleccionada debido a que es la dosis más frecuentemente usada por los veterinarios que, basados en su experiencia, consideran que es suficiente para el tratamiento de los envenenamientos por mordedura de terciopelo.

Luego de la administración intravenosa de la dosis de antiveneno, la concentración de anticuerpos equinos varió a lo largo del tiempo, mostrando un incremento repentino en el instante de la administración, seguido por una fase inicial y corta de disminución rápida y una fase final y larga de disminución lenta (Figura 6).

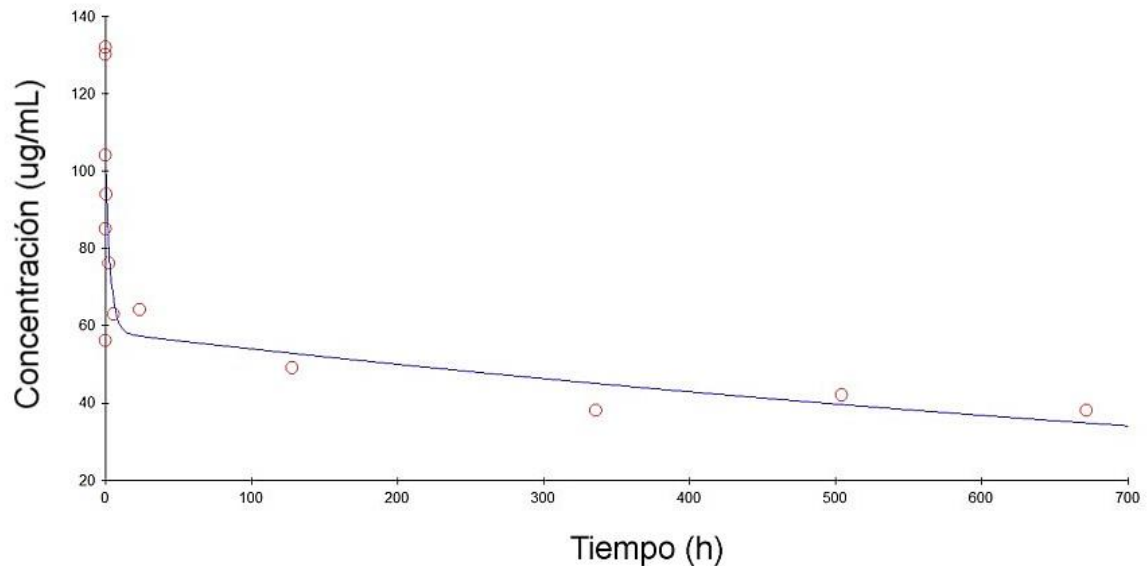


Figura 6: Curva concentración/tiempo de anticuerpos equinos anti-veneno en el suero de perros inmunizados pasivamente con 20 mL de antiveneno.

El comportamiento de la curva concentración/tiempo de los anticuerpos equinos anti-veneno en el suero de los perros inmunizados pasivamente fue usado para calcular los parámetros farmacocinéticos que se resumen en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Parámetros farmacocinéticos de un antiveneno formulado con inmunoglobulinas equinas en un modelo canino.

Parámetro farmacocinético	Valor*
AUC _{all} ($\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1} \times \text{h}$)	270.1 (165.3-380.1)
AUC _{∞} ($\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1} \times \text{h}$)	367.6 (21.0-796.8)
V _z (L)	12.4 (11.6-13.1)
t _{max} (h)	0.02 (-0.10-0.19)
C _{nmax} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	60.0 (42.1-74.9)
t _{1/2} (h)	9.60 (1.83-18.80)
K _{el} (h^{-1})	0.07 (-0.02-0.19)
Cl (mg/h)	0.93 (-0.17-2.39)

*Valores expresados como mediana e intervalo de confianza del 95%.

El análisis por ELISA indicó que el antiveneno empleado en este estudio contenía 16,7 mg/mL de anticuerpos anti-veneno. Además, empleando un modelo murino en el que los animales fueron retados con 2DL_{50s} del veneno de *B. asper*, se determinó que la potencia de formulación del antiveneno correspondía a 5.8 (4.8-7.3) mg/mL.

Utilizando estos datos fue posible calcular que la potencia de los sueros de los perros inmunizados pasivamente, al alcanzar su C_{nmax}, deberían presentar una potencia aproximada de 0.021 mg/mL. Interesantemente, este dato es inferior a 0.095 mg/mL que se obtiene al considerar únicamente la dilución que sufre la dosis de antiveneno administrada en el volumen plasmático teórico en perros de 20 kg (i.e. 1200 mL). De todos modos, ambas aproximaciones se encuentran muy por debajo del límite de cuantificación reportado para el ensayo de potencia con una dosis de reto de 2DL_{50s} de veneno de *B. asper* (i.e. 0.35 mg/mL; Solano et al., 2010).

6.3. Inmunización activa de perros con toxoide botrópico

Empleando el modelo murino en el que los animales fueron retados con 2DL_{50s} de veneno de *B. asper* se determinó que, luego de ser inmunizados con veneno nativo de *B. asper*, el suero de los perros del grupo control alcanzó una potencia de 0.37 mg/ml (0.19-0.64), la cual es muy superior a la potencia calculada para los sueros de los perros inmunizados pasivamente (i.e. 0.021 mg/mL). En contraste, la potencia de los sueros de los perros inmunizados con toxoide fue inferior al límite de cuantificación de la prueba en ratones (i.e. 0.35 mg/mL; Solano et al., 2010) y debió estimarse mediante el análisis de ELISA para anticuerpos caninos anti-veneno.

Por ELISA y usando como referencia el suero de los perros del grupo control, pudo proyectarse la potencia del suero de los perros inmunizados con toxoide botrópico a lo largo del esquema de inmunización y hasta seis meses posteriores a la misma (Cuadro 3). Siendo que la potencia de los perros inmunizados pasivamente con una dosis terapéutica de antiveneno se proyectó en 0.021 mg/mL, este valor fue considerado el límite aceptable de la potencia estimada para los perros inmunizados activamente.

Cuadro 3: Potencia neutralizante proyectada del plasma de caninos inmunizados con Toxoide Botrópico.

# Muestra	Potencia proyectada (mg/mL)		
	Lote A	Lote B	Lote C
Basal	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
1er refuerzo	0.000 ± 0.000	0.006 ± 0.006	0.007 ± 0.012
2do refuerzo	0.023 ± 0.024	0.031 ± 0.018	0.008 ± 0.008
3er refuerzo	0.057 ± 0.063	0.058 ± 0.046	0.010 ± 0.007
6 meses después	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

*La potencia de los sueros de los perros del grupo control fue de 0.37 (0.19-0.64) mg/mL.

De los 15 perros inmunizados con toxoide botrópico, solo aquellos inmunizados con los lotes A y B lograron una respuesta superior al valor límite (i.e. 0.021 mg/mL). Los animales inmunizados con el lote C no levantaron un título de anticuerpos adecuado (Cuadro 3). Además, en todos los casos, la inmunidad conferida por la inmunización activa con toxoide botrópico no alcanzó a mantenerse en niveles aceptables durante los 6 meses posteriores a la inmunización (Cuadro 3).

7. DISCUSIÓN

7.1. Dosis eficaz de antiveneno en perros envenenados por *Bothrops asper*

Los envenenamientos por mordedura de serpiente son comunes en nuestro país, tanto en seres humanos (Hanson et al., 2013) como en animales domésticos (Rodríguez et al., 2016). Este estudio se realizó con la colaboración de varios médicos veterinarios que realizan su práctica profesional en zonas de alta incidencia de envenenamientos por mordedura de serpiente. De este modo se tuvo acceso a casos atendidos en diferentes regiones del país.

La principal causa de no inclusión de casos fue la identificación de *B. asper* como la serpiente responsable de los envenenamientos. Al parecer, esta situación es común en otras latitudes. En Estados Unidos, por ejemplo, se hizo necesario implementar guías para identificar las especies de serpientes implicadas en accidentes ofídicos (Hurt & Maday, 2016); y en Nepal se ha propuesto el uso de métodos de diagnóstico molecular para identificar a las serpientes responsables de casos de envenenamiento (Sharma et al., 2016).

En el presente estudio se documentaron 9 casos en los que se tuvo certeza de que la serpiente implicada fue *B. asper*. Los casos provinieron principalmente de la región del Pacífico Central (específicamente, Parrita), Zona Sur (Pérez Zeledón) y Atlántica (Guápiles y Limón). El cuadro clínico observado incluyó efectos locales como edema, dolor, hemorragia y necrosis; y efectos sistémicos como malestar general, anorexia, coagulopatía y hemorragia; los cuales son similares a los reportados en otras especies como bovinos (Rodríguez et al., 2016) y humanos (Otero et al., 1999; 2006; 2012). Estas manifestaciones clínicas también son similares a las observadas en envenenamientos en caninos producidos por otros vipéridos como *Bothrops alternatus* (Jacome et al., 2002).

Dos de los pacientes enrolados no presentaron coagulopatía a pesar de haberse confirmado que fueron mordidos por una serpiente *B. asper* (presentaban heridas de mordedura, dolor, inflamación, y se identificó a la serpiente). Una posible explicación para la ausencia de coagulopatía es que se haya tratado de una mordedura seca. Naik (2017) expone diferentes causas para que se dé una mordedura de este tipo, como el control voluntario de la cantidad de veneno inyectado, anomalías en los colmillos, enfermedades de las glándulas de veneno, movimiento de retirada de la víctima, inmunidad natural o adquirida, entre otros.

Uno de los casos mortales fue un paciente que sufrió la mordedura en el tórax. La zona corporal mordida es relevante para determinar la severidad del envenenamiento. Pinto y colaboradores (2019) publicaron un caso de mordedura de *B. asper* en el tórax en un joven que presentó hemotórax severo. Por su parte, Ribeiro y colegas (2001) identificaron que, en seres humanos, la zona atacada por serpientes del género *Bothrops* puede influir en la presentación de lesiones necróticas. Este factor debe ser investigado con un número mayor de casos en perros.

Todos los profesionales entrevistados señalaron la necesidad de utilizar fluidos intravenosos y controlar el dolor e inflamación con antiinflamatorios no esteroides, opioides y antibióticos. Curiosamente, la dosis de antiveneno recomendada fue muy variable, recomendándose dosis entre los 10 y 160 mL por paciente, con 20 mL i.v. como la dosis más frecuentemente utilizada. Es importante señalar que en el momento de recopilar esta información, en Costa Rica el único suero que estaba disponible para uso veterinario era el PoliVet-ICP, por lo que la información recabada en este estudio corresponde a casos tratados con ese antiveneno. Otras respuestas clínicas podrían ser obtenidas con otros antivenenos.

Sanhajariya y colaboradores (2018) señalaron que la dosis y el tiempo en el que se administra el antiveneno sigue siendo empírica y basada en datos de neutralización en animales de laboratorio. Los mismos autores coincidieron con lo observado en este trabajo, en que la dosis administrada por los médicos tratantes se basa en observaciones subjetivas de síntomas y análisis de laboratorio.

El principal criterio empleado por los profesionales entrevistados para evaluar la respuesta al tratamiento con antivenenos fue la recuperación de la coagulabilidad de la sangre. Angulo y Lomonte (2009) describieron ampliamente la composición y actividad del veneno de *B. asper*, destacando la presencia de componentes como SVSPs y SVMPS con capacidad para producir coagulopatías a través de su actividad desfibrinogenante.

Por lo tanto, la recuperación de la coagulabilidad de la sangre debe esperarse hasta que los niveles séricos de fibrinógeno vuelven a la normalidad. En los casos incluidos en este estudio, la recuperación de la coagulabilidad de la sangre ocurrió 24 h posteriores a la administración del antiveneno. Este lapso debe ser considerado a la hora de evaluar la eficacia de la terapia y tomar la decisión de administrar o no más dosis de antiveneno.

Con base en la experiencia de los veterinarios entrevistados, se estableció 20 mL como una dosis efectiva. Sin embargo, este dato debe confirmarse mediante estudios clínicos controlados en los que se comparen varias dosis de antiveneno para identificar la menor dosis que produzca la mayor de las respuestas clínicas. Dosis menores que la requerida podrían tener problemas en neutralizar al veneno, y dosis mayores podrían aumentar innecesariamente la incidencia de reacciones adversas a la terapia (Estrada et al., 2010) y el costo del tratamiento. Tal vez el uso de dosis mayores a las necesarias podría explicar por

qué Park y colaboradores (2019) no pudieron encontrar beneficios de utilizar varias dosis de antiveneno en el tratamiento del ofidismo en Corea del Sur.

La determinación de la efectividad de la terapia con antivenenos también requiere conocer las tasas de mortalidad en los casos en los que los animales envenenados no reciben tratamiento alguno. Con base en datos anecdóticos se cree que solo 1 de cada 10 humanos envenenados por *B. asper* llegaría a morir; y en el caso de bovinos, las proyecciones indican que solo 2 de cada 10 envenenamientos son letales.

En este estudio, 2 de 10 casos fueron letales, por lo que la comparación con datos obtenidos en ausencia de tratamiento es necesaria para determinar si la eficacia del antiveneno se evidencia más en la sobrevida de los animales envenenados o en el periodo de convalecencia de los animales tratados. En todo caso, no deja de ser notable que los dos casos letales que fueron registrados corresponden a casos en los que antiveneno se administró tardíamente.

7.2. Farmacocinética del antiveneno equino en el modelo canino.

Los resultados obtenidos en el estudio clínico indican que una dosis de 20 mL de antiveneno, administrada por vía intravenosa, es eficaz y segura para el tratamiento de envenenamientos producidos por *B. asper* en perros. Al usar la vía intravenosa, los anticuerpos neutralizan de inmediato a las toxinas que ejercen efectos tóxicos sistémicos desde el compartimiento central. Por ejemplo, las SVSPs que producen coagulopatía y las SVMPS que producen hemorragia sistémica.

Además, desde el compartimiento central, los anticuerpos anti-veneno producen la redistribución de las toxinas presentes en los tejidos hacia la sangre, donde son acomplejadas y removidas de la circulación (Gutiérrez et al., 2003). Igualmente, las inmunoglobulinas equinas presentes en la circulación sanguínea son extravasadas a través de las lesiones producidas por el veneno, lo cual favorece que ejerzan su poder neutralizante el tejido afectado (Gutiérrez et al., 2003). Por lo tanto, el estudio de farmacocinética fue realizado empleando una dosis de 20 mL de antiveneno administrados por la vía intravenosa.

Luego de la administración intravenosa de los 20 mL de antiveneno, la concentración de anticuerpos equinos en plasma y tejidos cambia constantemente a lo largo del tiempo. El perfil de la curva concentración/tiempo varía de acuerdo con la dosis y la vía de administración, y el área bajo esta curva (AUC_{all} y AUC_{∞}), siendo proporcional a la dosis administrada, es la medida más importante de la biodisponibilidad del antiveneno.

La diferencia observada entre AUC_{all} (limitada a todos los puntos de muestro) AUC_{∞} (proyectada al infinito) indica que debieron usarse más puntos intermedios de muestro para poder capturar la cinética de la totalidad de la dosis administrada. Sin embargo, esta eventualidad no afecta los parámetros farmacocinéticos requeridos para los objetivos de este trabajo.

El perfil de la curva concentración/tiempo es el vector resultante de tres procesos que ocurren simultáneamente: 1) Absorción (i.e. el paso de los anticuerpos equinos desde el punto de administración a la sangre), 2) Distribución (i.e. el paso de los anticuerpos equinos desde la sangre a los tejidos) y 3) Eliminación (i.e. el paso de los anticuerpos equinos desde la sangre y los tejidos hacia el exterior del cuerpo).

En este estudio el antiveneno fue administrado por vía intravenosa y en consecuencia fue absorbido instantáneamente en su totalidad. Normalmente en farmacología, el concepto de “absorción” no se usa en modelos en los que los medicamentos son administrados por vía intravenosa y se reserva para los casos en los que se usan otras vías (i.e. oral, intramuscular, subcutánea, etc). Sin embargo, aquí lo usamos para ilustrar la mecánica del proceso farmacocinético.

El valor de V_z (Cuadro 2) sugiere que en cuanto el antiveneno fue administrado intravenosamente, este se distribuyó en la totalidad del compartimiento central (i.e. sangre y tejidos altamente irrigados como corazón, pulmones, bazo y riñones), y alcanzó su $C_{n_{max}}$ a las 0.02 h (i.e. t_{max}). Sin embargo, es claro que un V_z de 12.4 L corresponde a un volumen mucho mayor que el esperado para el compartimiento central de un perro de 18-22 kg.

Esto se explica porque además de la dilución de los anticuerpos en el compartimiento central, existen mecanismos inmunes que reconocen a los anticuerpos equinos como extraños y los remueven activamente de la circulación, introduciendo un sesgo que afecta el cálculo y hace parecer el valor de V_z mayor de lo que realmente es. Por eso, V_z se conoce como volumen de distribución “aparente”.

Obviando los mecanismos inmunes del perro que remueven a los anticuerpos equinos y asumiendo que el volumen sanguíneo de los perros es equivalente al 10% de su peso corporal (i.e. 2.0 L) y que sus hematocritos son de 40, puede calcularse que, en el t_{max} , el antiveneno formulado inicialmente a una potencia de 5.80 mg/mL, ha sufrido una dilución en el plasma de 1/61. Esto indica que la potencia del suero del perro en ese momento debería ser de aproximadamente 0.095 mg/mL.

Por otro lado, considerando los mecanismos inmunes del perro que remueven a los anticuerpos equinos, pueden usarse los datos de potencia y concentración de anticuerpos anti-veneno en el antiveneno, y $C_{n_{max}}$ para calcular la potencia de los sueros de los perros inmunizados pasivamente en su t_{max} . Entonces tenemos que la potencia proyectada es de 0.021 mg/mL (i.e. $5.8 * 0.060 * 16.7^{-1} = 0.021$).

Ambas proyecciones de potencia (i.e. 0.095 mg/mL y 0.021 mg/mL) se encuentran muy por debajo del límite de cuantificación del ensayo de neutralización de la letalidad empleando una dosis de reto de 2 DL_{50s} (i.e. 0.35 mg/mL; Solano et al., 2010), por lo que no se pueden determinar experimentalmente con ese modelo. En este caso, la alternativa de aumentar la sensibilidad del ensayo de potencia mediante la disminución de la dosis de reto no es posible, debido a que 2 DL_{50s} es la menor cantidad de veneno que garantiza la respuesta (i.e. letalidad) en todos los ratones desafiados.

Interpretando 0.021 mg/mL como la potencia máxima que tendría el suero de los perros después de ser inmunizados pasivamente con una dosis terapéutica de antiveneno, ese valor fue seleccionado como el valor meta que debe ser alcanzado mediante inmunización activa con toxoide botrópico. Solo los animales que alcancen o superen ese valor serían considerados como protegidos contra el envenenamiento por mordedura de terciopelo.

Luego de alcanzar su concentración máxima, la concentración de antiveneno en el suero de los perros disminuye bi-exponencialmente, dibujando una fase inicial de pendiente rápida, influenciada principalmente por la distribución del antiveneno al compartimento periférico o tisular), que es seguida por una fase terminal con pendiente menos pronunciada, que ha sido asociada a la eliminación del antiveneno (Gutiérrez et al., 2003).

Para la mayoría de los medicamentos, esta fase de eliminación es explicada como una consecuencia de la extravasación mediada por difusión pasiva. Sin embargo, en el caso de los anticuerpos heterólogos, se ha demostrado que también participan mecanismos inmunes de eliminación (Scherrmann, 1994; Bazin-Redureau et al., 1998; Rojas et al., 2013), como los que son esperables para la remoción de anticuerpos equinos de la circulación de un perro.

La constante de eliminación (i.e. k_{el}) indica que aproximadamente el antiveneno es eliminado a una tasa del 7%/h. Este dato es interesante porque coincide con el obtenido en el modelo homólogo de caballo, pero no con los obtenidos en modelos heterólogos de vacas y conejos (Rojas et al., 2013). Por otra parte, el valor de $t_{1/2}$ indica que 9.6 h son requeridas para que la concentración inicial del antiveneno disminuya en un 50%.

7.3. Inmunización activa de perros con toxoide botrópico

La eficacia de la inmunización pasiva con antivenenos depende de que la terapia se aplique lo más pronto posible luego de haber ocurrido el envenenamiento. Sin embargo, esto no siempre es posible en el caso de envenenamientos por mordedura de *B. asper* en animales domésticos. Uno de los factores que afecta el tratamiento oportuno de los perros envenenados es que, debido a los hábitos nocturnos de *B. asper*, muchos accidentes ocurren durante la noche, y los dueños no se percatan de lo ocurrido hasta el día siguiente.

En 2017, Herrera y colaboradores probaron el uso de un toxoide botrópico en bovinos con un éxito parcial: si bien la inmunización activa no logró evitar el envenenamiento, se incrementó la posibilidad de sobrevivencia. De modo similar, la inmunización activa contra el veneno de *B. asper* podría ser una alternativa para prevenir el envenenamiento de perros expuestos a estos envenenamientos.

La potencia alcanzada en el suero de los perros inmunizados activamente en el grupo control (i.e. 0.37 mg/mL) indica que es posible alcanzar mediante inmunización activa, una concentración de anticuerpos cuya capacidad neutralizante sea suficiente para controlar los envenenamientos producidos por mordedura de *B. asper* (i.e. potencias > 0.021 mg/mL). Sin embargo, debido a que emplea los adyuvantes de Freund, el procedimiento usado para inmunizar los animales del grupo control es un poco agresivo y complejo de manejar (Hawksworth, 2018). Por lo tanto, no pareciera adecuado para ser liberado en el mercado como procedimiento de rutina.

Por otro lado, la inmunización con toxoide botrópico produce efectos locales muy leves en los animales inmunizados, pero la inmunidad conferida es bastante muy baja como para poder ser evaluada mediante la prueba de neutralización de la letalidad en ratones. A pesar de eso, las proyecciones realizadas por ELISA indican que la respuesta por anticuerpos a la inmunización con toxoide botrópico podría ser suficiente para controlar envenenamientos accidentales.

El hecho de que los animales inmunizados con el lote C de toxoide botrópico no levantaran títulos adecuados de anticuerpos anti-veneno evidencia la necesidad de estandarizar los procedimientos de manufactura, para obtener lotes con características homogéneas. Uno de los pasos que mayor variación podría introducir variación es el procedimiento térmico para la inactivación del veneno.

En los lotes de toxoide A y B, la potencia proyectada como límite (i.e. 0.021) fue alcanzada después de la administración del segundo refuerzo y superada después de la administración del tercer refuerzo. Sin embargo, la duración de la respuesta no llegó a los 6

meses, por lo que la utilidad de la inmunización activa con toxoide no pareciera ser de utilidad práctica para proteger perros.

Aunque la metodología empleada en este estudio permite proyectar el potencial de la inmunización activa como procedimiento para conferir inmunidad, solo mediante el envenenamiento experimental de perros inmunizados es posible determinar a ciencia cierta la eficacia de esta práctica. Sin embargo, realizar esta experiencia se justifica solo si existe certeza de que la inmunidad conferida a los animales será suficiente como para protegerlos; y los resultados obtenidos con el toxoide botrópico en este estudio no general la certeza necesaria.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos con un toxoide crotálico que fue utilizado por años en Estados Unidos a pesar de no contar con estudios clínicos que probaran su eficacia en perros. Cates y colaboradores (2015) evaluaron dicho toxoide en ratones. Si bien la mortalidad fue menor en el grupo tratado, algunos de los ratones vacunados desarrollaron complicaciones cardiovasculares que fueron asociadas con reacciones anafilácticas.

Por su parte, Gilliam y su grupo (2013) estudiaron la respuesta inmunológica de caballos vacunados con el toxoide crotálico mediante ELISA. Los títulos de anticuerpos desarrollados por los equinos vacunados fueron menores a los desarrollados por equinos que habían sido previamente mordidos por la serpiente (por lo tanto, expuestos al veneno nativo). El principal problema encontrado en ese estudio es que no todos los caballos vacunados lograron levantar un título de anticuerpos que pudiera ser considerado eficaz.

Aunque los animales inmunizados con toxoide botrópico evidenciaron efectos locales como inflamación leve y dolor, no hubo evidencia de reacciones alérgicas inducidas por la

exposición al veneno. Debido a que los perros nunca fueron envenenados no fue posible evaluar si durante la inmunización los animales se vuelven sensibles a cuadros de hipersensibilidad experimentados durante el envenenamiento (i.e. hipersensibilidad mediada por complejos inmunes).

En contraste, Petras y sus colegas (2018) describieron reacciones anafilácticas en dos pacientes caninos inmunizados con toxoide crotálico luego de ser mordidos por una serpiente de cascabel. Al igual que en el estudio en bovinos, el toxoide crotálico tampoco brindó protección clínica a los animales inmunizados.

8. CONCLUSIONES

- 8.1. Los envenenamientos producidos por la mordedura de *B. asper* en perros se caracterizan por efectos locales como edema, dolor, necrosis y eventualmente hemorragia; y por efectos sistémicos como mal estar general, coagulopatía, hemorragia y eventualmente la muerte.
- 8.2. No existe consenso entre los veterinarios sobre la forma de clasificar los envenenamientos, la dosis que debe ser administrada y la vía de administración de antivenenos ofídicos. La dosis y vía más frecuentemente usadas, validadas por datos recopilados de forma no sistematizada, son 20 mL administrados por la vía intravenosa.
- 8.3. La farmacocinética del antiveneno de origen equino en un modelo canino parece corresponder a un modelo bi-compartimental. La obtención de V_z mayor al esperado y $C_{n_{max}}$ menor a la esperada, hacen pensar en la existencia de mecanismo inmunes de remoción de proteínas heterólogas.
- 8.4. La inmunización activa con veneno nativo demuestra que es posible inducir en perros una respuesta por anticuerpos con capacidad para controlar los envenenamientos por mordedura de *B. asper*. Sin embargo, la homogeneidad y la duración de las respuestas obtenidas con el toxoide botrópico usado en este estudio no son adecuadas para satisfacer lo requerido por el mercado.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- 9.1. Experimentar con métodos de inactivación de veneno que, conservando la antigenicidad de los componentes del veneno, permitan mayor reproducibilidad entre lotes.
- 9.2. Experimentar con otros adyuvantes que permitan obtener respuestas por anticuerpos que se mantengan tiempo, hasta alcanzar al menos los 6 meses.
- 9.3. Experimentar con otros esquemas de inmunización (i.e. número de refuerzos, tamaño de la dosis e intervalos de aplicación) que permitan obtener respuestas por anticuerpos que se mantengan tiempo, hasta alcanzar al menos los 6 meses.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res* 7(8):3556-71.

Angulo, Y., Lomonte, B., 2009. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 54(7):949-57.

Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 1997. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. *Toxicon* 35(1):81-90.

Angulo, Y., Castro, A., Lomonte, B., Rucavado, A., Fernández, J., Calvete, J.J., Gutiérrez, J.M., 2014. Isolation and characterization of four medium-size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of the genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. *Biochimie* 107 Pt B:376-84.

Bazin-Redereau, M., Pepin, S., Hong, G., Debray, M., Schermann, J.M., 1998. Interspecies scaling of clearance and volume of distribution for horse antivenom F(ab')₂. *Toxicol Appl Pharmacol* 150(2), 295-300.

Berrocal, A., Gutierrez, J.M., Estrada, R., 1998. Snake envenomation in bovine. Large Animal Practice 19, 26–27.

Bhaumik, S., Jagadesh, S., Lassi, Z., 2018. Quality of WHO guidelines on snakebite: the neglect continues. BMJ Global Health 3(2), e000783.

Bolon, I., Finat, M., Herrera, M, Nickerson, A., Grace, D., Schutte, S., Martins, S., Ruiz de Castañeda, R., 2019. Snakebite in domestic animals: First global scoping review. Prev Vet Med 170, 104729.

Carvalho, V.T., Gomes, R.T., Viotti, A.P., Freitas, T.V., 2000. Immunization with liposome-encapsulated *Bothrops jararaca* venom. Toxicon 38(6), 881-886.

Cates, C.C., Valore, E.V., Couto, M.A., Lawson, G.W., McCabe, J.G., 2015. Comparison of the protective effect of a commercially available western diamondback rattlesnake toxoid vaccine for dogs against envenomation of mice with western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*), northern Pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus oreganus*), and southern Pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*) venom. Am J Vet Res 76, 272e9.

Chippaux, J.P., 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases 23, 38.

CIOMS (Council of International Organizations of Medical Sciences). The international

guiding Principles for biomedical Research involving animals. Geneva: Z.Bankowski & N. Howard-Jones; 1986.

Estrada, R., Herrera, M., Segura, A., Araya, J., Boschini, C., Gutiérrez, J.M., León, G., 2010. Intravenous administration of equine-derived whole IgG antivenom does not induce early adverse reactions in non-envenomed horses and cows. *Biologicals* 38(6):664-9.

Fernández, P., Gutiérrez, J.M., 2008. Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993-2006). *Toxicon* 52(3), 530-533.

Gilliam, L.L., Carmichael, R.C., Holbrook, T.C., Taylor, J.M., Ownby, C.L., McFarlane, D., et al., 2013. Antibody responses to natural rattlesnake envenomation and a rattlesnake toxoid vaccine in horses. *Clin Vaccine Immunol* 20, 732e7.

Gutiérrez, J.M., 2014. Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 20(1), 7.

Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B., 2003. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinet* 42(8), 721-741.

Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009a. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54(7), 976-987.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., Escalante, T., 2009b. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54(7), 958-975.

Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B., Angulo, Y., 2011. Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10(5), 369-380.

Hansson, E., Sasa, M., Mattisson, K., Robles, A., Gutiérrez, J.M., 2009. Using geographical information systems to identify populations in need of improved accessibility to antivenom treatment for snakebite envenoming in Costa Rica. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1), e2009.

Hawksworth, D., 2018. Advancing Freund's and AddaVax Adjuvant Regimens Using CpG Oligodeoxynucleotides. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*. doi:10.1089/mab.2018.0022.

Herrera, M., González, K., Rodríguez, C., Gómez, A., Segura, Á., Vargas, M., Villalta, M., Estrada, R., León, G., 2016. Active immunization of cattle with a bothropic toxoid does not abrogate envenomation by *Bothrops asper* venom but increases the likelihood of survival. *Biologicals* 46, 1-5.

Hurt, J.B., Maday, K.R., 2016. Recognizing and treating patients with envenomations. *JAAPA* 29(7), 40-45.

Inec (Instituto Nacional de Estadística y Censos), 2018. Encuesta Nacional Agropecuaria 2017. San José, Costa Rica.

Jacome, D., Melo, M., Santos, M., Heinene, L., 2002. Kinetics of venom and antivenom serum and clinical parameters and treatment efficacy in *Bothrops alternatus* envenomed dogs. *Vet Hum Toxicol* 44(6), 334-338.

Julve, J., Huet, E., Fernández-del-Carmen, A., Segura, A., Venturi, M., Gandia, A., Pan, W., Albaladejo, I., Forment, J., Pla, D., Wigdorovitz, A., Calvete, J., Gutiérrez, C., Gutiérrez, J., Granell, A., & Orzaez, D., 2018. A synthetic biology approach for consistent production of plant-made recombinant polyclonal antibodies against snake venom toxins. *Plant Biotechnology Journal* 16, 727–736. doi:10.1111/pbi.12823.

Kallel, H., Mayence, C., Houcke, S., Mathien, C., Mehdaoui, H., Gutiérrez, J. M., Megarbane, B., Hommel, D., & Resiere, D. 2018. Severe snakebite envenomation in French Guiana: When antivenom is not available. *Toxicon*, 146, 87–90. doi:10.1016/j.toxicon.2018.04.004

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 1(2), 94-99.

León, G., Monge, M., Rojas, E., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2001. Comparison between IgG and F(ab')₂ polyvalent antivenoms: neutralization of systemic effects induced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon* 39(6), 793-801.

León, G., Segura, Á., Gómez, A., Hernández, A., Navarro, D., Villalta, M., Vargas, M., Herrera, M., Gutiérrez, J.M., 2016. Industrial production and quality control of snake antivenoms. En: Gopalakrishnakone, P., Calvete, J.J. (Eds.). *Venom Genomics and Proteomics*. Springer, pp. 1-22.

Mora, J., Mora, R., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2008. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. *PLoS Negl Trop Dis* 2(10), e318.

Naik, B. S., 2017. “Dry bite” in venomous snakes: A review. *Toxicon*, 133, 63–67.

Otero-Patiño R., Segura A., Herrera M., Angulo Y., León G., Gutiérrez J.M., Barona J., Núñez V., Estrada S., Pereañez A., Quintana J.C., Vargas L.J., Gómez J.P., Díaz A., Suárez A.M., Fernández J., Ramírez P., Fabra P., Perea M., Fernández D., Arroyo Y., Betancur D., Pupo L., Córdoba E.A., Ramírez C.E., Arrieta A.B., Rivero A., Mosquera D.C., Conrado N.L., Ortiz R., 2012. Comparative study on the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated IgG and F(ab')₂ antivenoms, in *Bothrops asper* bites in Colombia. *Toxicon* 59, 344-355.

Otero R., León G., Gutiérrez J.M., Rojas G., Toro M.F., Barona J., Rodríguez V., Díaz A., Núñez V., Quintana J.C., Ayala Sh., Mosquera D., Conrado L.L., Fernández D., Arroyo Y., Paniagua C.A., López M., Ospina C.E., Alzate C., Fernández J., Meza J.J., Silva J.F., Ramírez P., Fabra P.E., Ramírez E., Córdoba E., Arrieta A.B., Warrell D., Theakston D.,

2006. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without β -propiolactone, in the treatment of *Bothrops asper* bites in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 1173-1182.

Park, K. H., Shin, H., Kang, H., Kim, C., Choi, H. J., Yoo, K., Oh, J., & Lim, T. H., 2019. Effectiveness of repeated antivenom therapy for snakebite-related systemic complications. *Journal of International Medical Research*, 030006051987001.

Pashmakova, M.B., Bishop, M.A., Black, D.M., Bernhard, C., Johnson, S.I., Mensack, S., Wells, R.J., Barr, J.W., 2013. Multicenter evaluation of the administration of crotalid antivenom in cats: 115 cases (2000-2011). *J Am Vet Med Assoc* 243(4), 520-525.

Petras, K. E., Wells, R. J., & Pronko, J., 2018. Suspected anaphylaxis and lack of clinical protection associated with envenomation in two dogs previously vaccinated with *Crotalus atrox* toxoid. *Toxicon* 142, 30–33.

Pinto, L.J., Lee Fernández, L., Gutiérrez, J.M., Simón, D.S., Ceballos, Z., Aguilar, L.F., Sierra, M., 2019. Case Report: Hemothorax in envenomation by the viperid snake *Bothrops asper*. *Am J Trop Med Hyg* 100(3), 714-716.

Ribeiro, L. A., Jorge, M. T., Lebrão, M. L., 2001. Prognostic factors for local necrosis in *Bothrops jararaca* (Brazilian pit viper) bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(6), 630–634.

Rodríguez, C., Estrada, R., Herrera, M., Gómez, A., Segura, Á., Vargas, A., Villalta, M., León, G., 2016. *Bothrops asper* envenoming in cattle: Clinical features and management using equine-derived whole IgG antivenom. *The Veterinary Journal* 207, 160-163.

Rojas, A., Vargas, M., Ramírez, N., Estrada, R., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J.M., León, G., 2013. Role of the animal model on the pharmacokinetics of equine-derived antivenoms. *Toxicon* 70, 9-14.

Rojas, G., Jiménez, J.M., Gutiérrez, J.M., 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32(3), 351-363.

Sanhajariya, S., Duffull, S.B., Isbister, G.K., 2018. Pharmacokinetics of Snake Venom. *Toxins (Basel)* 10(2), 73.

Sasa, M., Wasko, D.K., Lamar, W.W., 2009. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon* 54(7), 904-922.

Schaeffer, T. H., Khatri, V., Reifler, L. M. and Lavonas, E. J., 2012. Incidence of immediate hypersensitivity reaction and serum sickness following administration of crotalidae polyvalent immune Fab antivenom: A meta-analysis. *Academic Emergency Medicine*, 19, 121–131.

Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Uscanga-Reynell, A., de León-Rosales, S.P., Jiménez-Corona, M.E., Reta-Mares, J.F., Gutiérrez, J.M., León, G., 2012. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon* 59(1), 158-162.

Sharma, S.K., Kuch, U., Höde, P., Bruhse, L., Pandey, D.P., Ghimire, A., Chappuis, F., Alirol, E., 2016. Use of molecular diagnostic tools for the identification of species responsible for snakebite in Nepal: A pilot study. *PLoS Negl Trop Dis* 10(4), e0004620.

Scherrmann, J.M. 1994. Antibody treatment of toxin poisoning-recent advances. *J Toxicol Clin Toxicol*, 32 (4), 363-375.

Scheske, L., Ruitenber, J., Bissumbar, B., 2015. Needs and availability of snake antivenoms: relevance and application of international guidelines. *International Journal of Health Policy and Management*, 4(7), 447–457.

Solano G. Segura A., Herrera M., Gómez A., Villalta M., Gutiérrez J.M., León G., 2010. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. *Biologicals* 38, 577-585.

Solorzano, A., 2004. Snakes of Costa Rica: Distribution, taxonomy, and natural history. INBio, Heredia, Costa Rica, pp. 663–668.

Yanez-Arenas, C., Peterson, A.T., Mokondoko, P., Rojas-Soto, O., Martínez-Meyer, E., 2014. The use of ecological niche modeling to infer potential risk areas of snakebite in the mexican state of Veracruz. Plos One 9(6), e100957.