



**Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología
Instituto Clodomiro Picado**



Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos

Manual de métodos de
laboratorio

2007

Indice

Presentación	3
Determinación de la actividad letal	4
Determinación de la neutralización de la actividad letal	6
Determinación de la actividad hemorrágica	8
Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica	10
Determinación de la actividad mitotóxica	12
Determinación de la neutralización de la actividad mitotóxica	15
Determinación de la actividad edematizante	17
Determinación de la neutralización de la actividad edematizante	19
Determinación de la actividad coagulante	21
Determinación de la neutralización de la actividad coagulante	23
Determinación de la actividad desfibrinante	25
Determinación de la neutralización de la actividad desfibrinante	27

Presentación

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes constituyen un importante problema de salud pública en América Latina, así como en otras regiones del mundo. El tratamiento de estos envenenamientos se basa, fundamentalmente, en la administración parenteral de antivenenos de origen equino. Diversos laboratorios en América Latina producen antivenenos, los cuales son distribuidos tanto al interior de los países donde se producen como a otros países de la región que demandan estos productos inmunobiológicos.

La introducción de un nuevo antiveneno en un país para su uso en el tratamiento del envenenamiento ofídico requiere de una validación preclínica, la cual involucra, entre otros análisis, una demostración de su eficacia neutralizante. Tradicionalmente, la eficacia de un antiveneno se ha establecido mediante la prueba de neutralización de la actividad letal de los venenos, también denominada prueba de potencia. Sin embargo, estudios efectuados por diversos grupos durante las últimas décadas han demostrado que una evaluación más completa y rigurosa de la capacidad neutralizante de los antivenenos debe basarse en el análisis de la neutralización no sólo de la letalidad, sino además de otras actividades toxicológicas relevantes que participan en la fisiopatología de estos envenenamientos. En el caso de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, los principales efectos tóxicos que inducen son, a nivel local, hemorragia, mionecrosis y edema y, a nivel sistémico, hemorragia y coagulopatías, especialmente desfibrin(ogen)ación. En el caso de las serpientes de la familia Elapidae, el efecto predominante es la neurotoxicidad, la cual se ve reflejada en la prueba de letalidad.

En el Instituto Clodomiro Picado, de la Universidad de Costa Rica, se ha trabajado durante las últimas décadas en el desarrollo y adaptación de procedimientos de laboratorio simples para la determinación cuantitativa de los principales efectos toxicológicos de los venenos de la región latinoamericana. Estos procedimientos se han empleado en diversos estudios dirigidos a conocer la capacidad neutralizante de varios antivenenos producidos en Costa Rica y en otros países. Todo este esfuerzo, en el que también han participado otros grupos de investigación y producción de diversos países latinoamericanos, ha generado una rica y valiosa información en cuanto a la eficacia preclínica de los antivenenos de la región. Sin embargo, es necesario continuar con estos esfuerzos colaborativos a nivel regional para lograr un mayor conocimiento de la eficacia de los antivenenos.

El presente Manual de Procedimientos es un esfuerzo del Instituto Clodomiro Picado para poner a disposición de los grupos y profesionales interesados los ensayos que se utilizan en la caracterización de las principales actividades tóxicas de los venenos, así como en el estudio de su neutralización por antivenenos. Se pretende que este Manual tenga un carácter dinámico y que sea enriquecido con nuevos métodos para evaluar otras actividades tóxicas de los venenos. Por ello, se ha editado en forma de fascículos independientes, con el fin de que sean utilizados más fácilmente y de que se puedan agregar nuevos ensayos. El Instituto Clodomiro Picado agradece a todas las personas que, mediante su trabajo de investigación, de producción y de control de calidad, han contribuido al desarrollo y al uso de estas metodologías. Se agradece, asimismo, a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y al programa CYTED (proyecto 206PI0281) por el apoyo económico.

Determinación de la actividad letal

Fundamento

La actividad letal es el efecto toxicológico que más frecuentemente se estudia al caracterizar un veneno. Este efecto es el resultado de la acción de diversos tipos de componentes. En el caso de venenos de la familia Elapidae, y de algunos venenos de la familia Viperidae, este efecto es el resultado de la acción de componentes neurotóxicos que interfieren con los procesos de la sinapsis neuromuscular. En el caso de la mayoría de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, la letalidad tiene una causalidad multifactorial, ya que intervienen diferentes componentes (metaloproteinasas, serina proteinasas, fosfolipasas A₂ y otros) que causan sangrado, coagulopatía y alteraciones hemodinámicas que provocan la muerte. Experimentalmente, este efecto se estudia mediante la inyección de diferentes dosis de veneno, generalmente por la vía intraperitoneal o por la vía intravenosa, observándose si los animales mueren o sobreviven al cabo de un período de tiempo.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 0.5 mL o de 1.0 mL.
- (2) Agujas calibre 27.
- (3) Ratones de 16 a 18 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (6) Sistema para restringir el movimiento de los ratones, que permita efectuar inyecciones intravenosas en la vena caudal.

Procedimiento

- (1) Preparar soluciones con diferentes concentraciones del veneno a probar, utilizando PBS como diluyente.
- (2) Inyectar 0.2 mL de las diferentes soluciones de veneno a grupos de 6 ratones, ya sea por la vía intraperitoneal o por la vía intravenosa, utilizando para este caso la vena caudal.
- (3) Al cabo de 48 horas (en el caso de la inyección intraperitoneal) o de 24 horas (en el caso de la inyección intravenosa), anotar el número de ratones muertos en cada dosis de veneno.
- (4) Utilizando programas de cómputo elaborados para este fin (ver comentarios), determinar la Dosis Letal 50% y los límites de confianza del 95%.

Comentarios

- (1) En algunas investigaciones se utilizan otras vías de inyección para estudiar la letalidad, tales como la vía subcutánea y la intracerebroventricular. Sin embargo, en general se prefiere utilizar las vías intraperitoneal o intravenosa.
- (2) Aunque tradicionalmente la vía más utilizada para determinar la letalidad de los venenos es la intravenosa, en el caso de venenos que tienen una acción coagulante, tales como la mayoría de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, se ha considerado que esta vía no es la más conveniente, ya que la acción coagulante predomina sobre otros efectos, y la fisiopatología del

envenenamiento por esta ruta de inyección no reproduce la fisiopatología característica de los envenenamientos por vipéridos en humanos. Desde esta perspectiva, la ruta intraperitoneal, aunque tampoco es la ruta natural de envenenamiento, genera un cuadro fisiopatológico que semeja más las características de estos envenenamientos. En el caso de venenos de acción neurotóxica, cualquiera de estas dos vías genera un cuadro de parálisis similar.

- (3) Existen diversos métodos para calcular la DL_{50} . Dos de los que más se utilizan actualmente, y para los cuales se han desarrollado programas de cómputo accesibles, son el método de probitos y el método de Spearman-Kärber (WHO, 1981).

Referencias bibliográficas

- (1) Bolaños, R. (1972) Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21, 360-363.
- (2) Theakston, R.D.G., Reid, H.A. (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of World Health Organization* 61, 949-956.
- (3) World Health Organization (1981) Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO Offset Publication No. 58. Geneva, World Health Organization.

Determinación de la neutralización de la actividad letal

Fundamento

La neutralización de la actividad letal de los venenos por antivenenos se determina mediante un ensayo en el que se incubaba una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y diversas diluciones del antiveneno. Posteriormente se evalúa la actividad letal de las mezclas en ratones utilizando las vías de inyección intravenosa o intraperitoneal.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 0.5 mL o de 1.0 mL.
- (2) Agujas calibre 27.
- (3) Ratones de 16 a 18 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Antiveneno a analizar.
- (6) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (7) Sistema para restringir el movimiento de los ratones, que permita efectuar inyecciones intravenosas en la vena caudal.
- (8) Baño de agua a 37 °C.

Procedimiento

- (1) Preparar mezclas que contengan una cantidad constante de veneno y varias diluciones del antiveneno, de tal manera que se obtenga una concentración de veneno correspondiente a 4 DL₅₀ en 0.2 mL de la mezcla. Se debe preparar diversas diluciones del antiveneno, utilizando PBS como diluyente, de manera que se obtengan las siguientes razones de μL de antiveneno / mg de veneno: 1000, 500, 250, 125 y 62.5. Completar el volumen de cada tubo con PBS. Preparar simultáneamente un control conteniendo el mismo volumen de la solución de veneno, pero sin antiveneno, y completando el volumen con PBS. Preparar también un control conteniendo la concentración más alta del antiveneno, pero sin veneno, y completando el volumen con PBS.
- (2) Incubar los tubos con las mezclas veneno-antiveneno por 30 minutos a 37 °C.
- (3) Inyectar 0.2 mL de cada mezcla a grupos de 6 ratones, utilizando la vía intraperitoneal o la vía intravenosa, utilizando para este caso la vena caudal.
- (4) Al cabo de 48 horas (en el caso de la inyección intraperitoneal) o de 24 horas (en el caso de la inyección intravenosa), anotar el número de ratones muertos en cada dosis de veneno.
- (5) Utilizando programas de cómputo elaborados para este fin, determinar la Dosis Eficaz 50% (DE₅₀) y los límites de confianza del 95%. La DE₅₀ corresponde a la razón μL antiveneno / mg veneno en la que muere el 50% de la población de ratones inyectados.

Comentarios

- (1) La dosis de reto para la prueba de neutralización del efecto letal varía de acuerdo a los laboratorios. En Costa Rica, por ejemplo, se utiliza una dosis de reto correspondiente a 4 DL₅₀s, en tanto en Brasil se emplea una dosis de reto de 5 DL₅₀s. La potencia neutralizante de un determinado antiveneno varía de acuerdo a la dosis de reto que se emplee; en general, entre mayor sea el número de DL₅₀s que se utilicen, menor será la potencia neutralizante de un antiveneno (Bogarín et al., 2000).
- (2) En diversos laboratorios de control de calidad, la DE₅₀ se expresa no en términos de µL antiveneno / mg veneno, sino en términos de mg de veneno / mL de antiveneno (ver por ejemplo Rojas et al., 2005). Ambas formas de expresar la neutralización del efecto letal se pueden obtener del mismo ensayo.

Referencias bibliográficas

- (1) Bogarín, G., Morais, J.F., Yamaguchi, I.K., Stephano, M.A., Marcelino, J.R., Nishikawa, A.K., Guidolin, R., Rojas, G., Higashi, H.G., Gutiérrez, J.M. (2000) Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 38, 1429-1441.
- (2) Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. (2005) Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* 93, 85-95.

Determinación de la actividad hemorrágica

Fundamento

La actividad hemorrágica resulta de la acción de metaloproteinasas de los venenos en la membrana basal de capilares y vénulas, lo que ocasiona la ruptura de la integridad de estos microvasos sanguíneos y la consecuente extravasación; este efecto es característico de venenos de serpientes de la familia Viperidae. La actividad hemorrágica se determina en piel de roedores, generalmente ratones, inyectados con soluciones de veneno por la vía intradérmica. Luego de un período de tiempo, se sacrifican los ratones, se remueve su piel y se mide el área hemorrágica en la superficie interna de la piel. La actividad se expresa como la Dosis Hemorrágica Mínima, que corresponde a la cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro dos horas después de la inyección.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 0.5 mL o de 1.0 mL.
- (2) Agujas calibre 27.
- (3) Ratones de 18 a 20 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (6) Cámara de CO₂.
- (7) Equipo de disección (tijeras y pinzas).

Procedimiento

- (1) Preparar soluciones con diferentes concentraciones del veneno a probar, utilizando PBS como diluyente. Inicialmente se recomienda trabajar con concentraciones en el ámbito entre 1 µg/mL y 200 µg/mL.
- (2) Inyectar 0.1 mL de cada solución por la vía intradérmica, en la región abdominal, a grupos de 4 ratones. Un grupo adicional de 4 ratones se inyecta con 0.1 mL de PBS sin veneno (grupo control).
- (3) Sacrificar los ratones mediante inhalación de CO₂ dos horas después de la inyección.
- (4) Remover la piel y medir el área hemorrágica en la superficie interna. Los ratones control inyectados con PBS no deben presentar lesión hemorrágica.
- (5) Determinar el diámetro de la lesión hemorrágica mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Diámetro} = 2 \times (\sqrt{\text{área hemorrágica} / \pi})$$

- (6) Preparar una curva dosis-respuesta (µg de veneno en el eje de las abscisas (x) vs mm diámetro de lesión hemorrágica, en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el diámetro de la lesión. Determinar la dosis de veneno que corresponde a un diámetro de 10 mm, la cual corresponde a la Dosis Hemorrágica Mínima.

Comentarios

(1) Por su sencillez y reproducibilidad, este procedimiento es el más empleado en la determinación de la actividad hemorrágica de venenos. No obstante, presenta el problema de que no evalúa la intensidad de la lesión hemorrágica, sino únicamente su extensión. Ello abre la posibilidad de que se le de el mismo valor a lesiones hemorrágicas que, presentando la misma área, tengan diferencias importantes en la intensidad de la extravasación. Esta deficiencia se puede corregir mediante una continuación del procedimiento descrito, basada en la extracción de la hemoglobina presente en el área hemorrágica y su cuantificación mediante la lectura de la absorbancia a 540 nm.

Referencias bibliográficas

- (1) Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, Y., Murata, R., Ohsaka, A. (1960) Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 13, 43-51.
- (2) Theakston, R.D.G., Reid, H.A. (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of World Health Organization* 61, 949-956.
- (3) Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Rojas, G., Cerdas, L. (1985) Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 887-893.
- (4) Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C. (2005) Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.

Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica

Fundamento

La neutralización de la actividad hemorrágica de los venenos por antivenenos se determina mediante un ensayo en el que se incuba una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y diversas diluciones del antiveneno. Posteriormente se evalúa la actividad hemorrágica de las mezclas utilizando el procedimiento en piel de ratones.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 0.5 mL o de 1.0 mL.
- (2) Agujas calibre 27.
- (3) Ratones de 18 a 20 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Antiveneno a analizar.
- (6) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (7) Cámara de CO₂.
- (8) Equipo de disección (tijeras y pinzas).
- (9) Baño de agua a 37 °C.

Procedimiento

- (1) Preparar mezclas que contengan una cantidad constante de veneno y varias diluciones del antiveneno, en un volumen final de 1.0 mL, de tal manera que se obtenga una concentración de veneno correspondiente a 10 Dosis Hemorrágicas Mínimas en 0.1 mL de la mezcla. Se debe preparar diversas diluciones del antiveneno, utilizando PBS como diluyente, de manera que se obtengan las siguientes razones de μL de antiveneno / mg de veneno: 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25. Completar el volumen de 1.0 mL de cada tubo agregando PBS. Preparar simultáneamente un control conteniendo el mismo volumen de la solución de veneno, pero sin antiveneno, y completando el volumen de 1.0 mL con PBS. Preparar también un control conteniendo la concentración más alta del antiveneno, pero sin veneno, y completando el volumen de 1.0 mL con PBS.

Ejemplo: Si la Dosis Hemorrágica Mínima de un veneno es de 1 $\mu\text{g}/0.1$ mL, se requiere una dosis de reto de veneno de 10 $\mu\text{g}/0.1$ mL (correspondiente a 10 DHM). Para preparar una mezcla de veneno y antiveneno con una razón de 1000 μL antiveneno/mg veneno, se debe agregar los siguientes volúmenes a un tubo de ensayo:

100 μL de una solución de veneno de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 100 μL de antiveneno
 800 μL de PBS

Para preparar una mezcla con una razón de 500 μL antiveneno/mg veneno:

100 μL de una solución de veneno de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 100 μL de una dilución 1:2 de antiveneno
 800 μL de PBS

Proceder de manera similar, utilizando diversas diluciones del antiveneno, para obtener las otras razones antiveneno/veneno.

Para preparar el tubo control de veneno, agregar:

100 μL de una solución de veneno de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

900 μL de PBS

Para preparar el tubo control de antiveneno, agregar:

100 μL de antiveneno

900 μL de PBS

- (2) Incubar los tubos con las mezclas veneno-antiveneno por 30 minutos a 37°C.
- (3) Inocular grupos de 4 ratones con 0.1 mL de las mezclas y de los controles, por la vía intradérmica en la región abdominal.
- (4) Sacrificar los ratones mediante inhalación de CO_2 dos horas después de la inyección.
- (5) Remover la piel y medir el área hemorrágica en la superficie interna. Los ratones control inyectados con solo antiveneno no deben presentar lesión hemorrágica.
- (6) Determinar el diámetro de la lesión hemorrágica mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Diámetro} = 2 \times (\sqrt{\text{área hemorrágica} / \pi})$$

- (7) Preparar una curva dosis-respuesta (razón μL antiveneno/mg veneno en el eje de las abscisas (x) vs mm diámetro de lesión hemorrágica en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la razón antiveneno/veneno y una escala milimétrica para el diámetro de la lesión. Tomando como punto de referencia (100 %) el valor del diámetro de la lesión hemorrágica en los ratones inyectados con la solución control de veneno sin antiveneno, estimar la Dosis Eficaz 50%, correspondiente a la razón μL antiveneno/mg veneno en la que el diámetro de la lesión hemorrágica corresponde al 50% del diámetro de la lesión inducida por la solución control de veneno.

Referencia bibliográfica

- (1) Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Rojas, G., Cerdas, L. (1985) Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 887-893.

Determinación de la actividad miotóxica

Fundamento

La actividad miotóxica se determina mediante la cuantificación de la actividad de la enzima creatina kinasa (CK) en el plasma de ratones. La CK es una enzima que se encuentra en altas concentraciones en el citoplasma de las células musculares, liberándose al fluido extracelular y a la sangre luego de lesión celular. Para la mayoría de los venenos de serpientes, los niveles de CK se determinan tres horas después de la inyección, que es cuando se llega a los niveles mayores de esta enzima en plasma.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 0.5 mL o de 1.0 mL.
- (2) Aguja calibre 27.
- (3) Ratones de 18 a 20 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (6) Reactivos diagnósticos para cuantificación de la actividad creatina kinasa. Se recomiendan los *kits* basados en un método cinético.
- (7) Ketamina (solución de 50 mg/mL).
- (8) Xilacina (solución de 20 mg/mL).
- (9) Tubos capilares heparinizados.
- (10) Sistema para restringir el movimiento de los ratones, que permita obtener muestras de sangre de la cola. Se puede utilizar los sistemas de restricción de movimiento empleados para efectuar inyecciones intravenosas.
- (11) Espectrofotómetro. Para los métodos que utilizan un procedimiento cinético se requiere un espectrofotómetro con fuente de luz ultravioleta y un sistema que permita controlar la temperatura de las muestras.

Procedimiento

- (1) Preparar soluciones con diferentes concentraciones del veneno a probar, utilizando PBS como diluyente. Inicialmente se recomienda trabajar en un ámbito de concentraciones entre 100 µg/mL y 1000 µg/mL.
- (2) Inyectar 0.1 mL de cada solución, por la vía intramuscular, en el gastronemio derecho, a grupos de 4 ratones. Un grupo adicional de 4 ratones debe ser inyectado con 0.1 mL de PBS por la misma vía.
- (3) Tres horas después de la inyección, anestesiarse los ratones mediante inyección intramuscular, en el muslo de la pata contralateral a la inyectada con veneno, de una solución de ketamina (1.5 mg) y xilacina (1 mg).
- (4) Obtener una muestra de aproximadamente 25 µL de sangre de la cola, utilizando capilares heparinizados. Para ello, se debe colocar al ratón en el sistema de restricción de movimiento y, con una hoja de bisturí, cortar el extremo de la cola. Alternativamente, la sangre puede colectarse del plexo venoso ocular. Los tubos capilares heparinizados con la sangre se sellan en un extremo con plasticina.

- (5) Centrifugar los tubos capilares en una centrífuga para tubos de microhematocrito y obtener el plasma de cada tubo.
- (6) Determinar la actividad de CK del plasma utilizando el *kit* comercial. El volumen de plasma que se utiliza para esta determinación no necesariamente corresponde al que se recomienda en el instructivo del *kit*, ya que por la alta actividad de CK que se observa en las muestras de plasma de ratones envenenados, se debe usar un volumen menor. Esto debe determinarse para cada ensayo. La actividad de CK se expresa en unidades internacionales por litro (UI/L). La actividad CK en plasma de ratones control inyectados con PBS oscila entre 150 y 250 UI/L.
- (7) Preparar una curva dosis-respuesta (μg de veneno en el eje de las abscisas (x) vs actividad CK en plasma en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para la actividad CK. Determinar la dosis de veneno en la que la actividad CK plasmática corresponde a 4 veces la actividad CK del plasma de los ratones inyectados con PBS. Esa dosis de veneno corresponde a la Dosis Miotóxica Mínima.

Comentarios

- (1) Existen niveles elevados de CK en otros tejidos, tales como músculo cardíaco y tejido nervioso. Para diferenciar el origen de la CK en plasma, se puede utilizar el patrón de isoenzimas de CK, ya que la isoenzima CK-MM proviene de músculo esquelético, en tanto la CK-MB se encuentra en músculo cardíaco y la CK-BB en cerebro. Sin embargo, los estudios que se han efectuado con venenos indican que cuando éstos son inyectados por la vía intramuscular, más del 95% de la elevación de CK en plasma corresponde a la isoenzima CK-MM, por lo que no es indispensable efectuar el análisis electroforético de las isoenzimas una vez que se ha demostrado que la mayoría de la elevación corresponde a la isoenzima muscular.
- (2) La forma más rigurosa de evaluar miotoxicidad se basa en el análisis histológico del tejido, en la cual se efectúan cortes transversales del músculo gastronemio. La observación microscópica del tejido permite cuantificar el número de células musculares necróticas y el número de células musculares totales, con lo cual se estima el 'índice mionecrótico', que corresponde a la razón del número de células necróticas sobre el número de células totales. De esta forma se puede obtener la dosis miotóxica 50%, que corresponde a la dosis de veneno que induce un índice mionecrótico de 0.5. Sin embargo, los procedimientos histológicos son muy lentos y requieren de facilidades de laboratorio para el trabajo de histología. La buena correlación que se ha observado en diversos estudios entre la valoración histológica y la actividad de CK plasmática permiten utilizar la determinación de la actividad CK como un procedimiento confiable en la determinación de la actividad miotóxica de los venenos.

Referencias bibliográficas

- (1) Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Bolaños, R. (1980) Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18, 603-610.

- (2) Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. (2003) Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipase A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931.
- (3) Nakada, K., Nakada, F, Ito, E., Inoue, F. (1984) Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. *Toxicon* 22, 921-930.

Determinación de la neutralización de la actividad miotóxica

Fundamento

La neutralización de la actividad miotóxica de venenos por antivenenos se determina mediante experimentos en los que se incubaba una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno. Posteriormente se evalúa la actividad miotóxica en ratones mediante la determinación de la actividad de la enzima creatina kinasa (CK) en el plasma.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 0.5 mL o de 1.0 mL.
- (2) Agujas calibre 27.
- (3) Ratones de 18 a 20 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Antiveneno a analizar.
- (6) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (7) Reactivos diagnósticos para cuantificación de la actividad creatina kinasa. Se recomiendan los *kits* basados en un método cinético.
- (8) Ketamina (solución de 50 mg/mL).
- (9) Xilacina (solución de 20 mg/mL).
- (10) Tubos capilares heparinizados.
- (11) Sistema para restringir el movimiento de los ratones, que permita obtener muestras de sangre de la cola. Se puede utilizar los sistemas de restricción de movimiento empleados para efectuar inyecciones intravenosas.
- (12) Espectrofotómetro. Para los métodos que utilizan un procedimiento cinético se requiere un espectrofotómetro con fuente de luz ultravioleta y un sistema que permita controlar la temperatura de las muestras.
- (13) Baño de agua a 37 °C.

Procedimiento

- (1) Preparar mezclas que contengan una cantidad constante de veneno y varias diluciones del antiveneno, de tal manera que se obtenga una concentración de veneno correspondiente a 3 veces la Dosis Miotóxica Mínima. Esa cantidad de veneno se debe mezclar con diversas diluciones del antiveneno, de manera que se obtengan las siguientes razones μL de antiveneno / mg de veneno: 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.2. Completar los volúmenes correspondientes con PBS para obtener la concentración de veneno requerida, de manera que 0.1 mL de la mezcla contengan la dosis de reto de veneno (3 Dosis Miotóxicas Mínimas). Preparar tubos control que contengan veneno y PBS, sin antiveneno, así como otros que contengan la dosis más alta de antiveneno a utilizar, junto con PBS, pero sin antiveneno. Un ejemplo de cómo calcular estas concentraciones y volúmenes se puede encontrar en el procedimiento para la 'Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica', en este mismo Manual.
- (2) Incubar los tubos con las mezclas veneno-antiveneno por 30 minutos a 37°C.
- (3) Inocular grupos de 4 ratones con 0.1 mL de las mezclas y de los controles, por la vía intramuscular en el gastronemio derecho.

- (4) Tres horas después de la inyección, anestésiar los ratones mediante inyección intramuscular, en el muslo de la pata contralateral a la inyectada con veneno, de una solución de ketamina (1.5 mg) y xilacina (1 mg).
- (5) Obtener una muestra de aproximadamente 25 μ L de sangre de la cola, utilizando capilares heparinizados. Para ello, se debe colocar al ratón en el sistema de restricción de movimiento y, con una hoja de bisturí, se corta el extremo de la cola. Alternativamente, la sangre puede colectarse del plexo venoso ocular. Los tubos capilares heparinizados con la sangre se sellan en un extremo con plasticina.
- (6) Centrifugar los tubos capilares en una centrífuga para tubos de microhematocrito y obtener el plasma de cada tubo.
- (7) Determinar la actividad de CK del plasma utilizando el *kit* comercial. El volumen de plasma que se utiliza para esta determinación no necesariamente corresponde al que se recomienda en el instructivo del *kit*, ya que por la alta actividad de CK que se observa en las muestras de plasma de ratones envenenados, se debe usar un volumen menor. Esto debe determinarse para cada ensayo. La actividad de CK se expresa en unidades internacionales por litro (UI/L).
- (8) Preparar una curva dosis-respuesta (razón μ L antiveneno/mg veneno en el eje de las abscisas (x) vs actividad CK plasmática en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la razón antiveneno/veneno y una escala milimétrica para la actividad CK. Tomando como punto de referencia (100 %) el valor de la actividad CK en los ratones inyectados con la solución control de veneno sin antiveneno, estimar la Dosis Eficaz 50%, correspondiente a la razón μ L antiveneno/mg veneno en la que la actividad CK plasmática corresponde al 50% de la actividad correspondiente a los ratones inyectados con la solución control de veneno.

Referencias bibliográficas

- (1) Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla, E. (1981) Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19, 493-500.
- (2) Saravia, P., Rojas, E., Escalante, T., Arce, V., Chaves, E., Velásquez, R., Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. (2001) The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 39, 401-405.
- (3) Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. (2005) Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* 93, 85-95.

Determinación de la actividad edematizante

Fundamento

La actividad edematizante se determina en la almohadilla plantar de ratones o ratas inyectados con soluciones de veneno por la vía subcutánea. El edema, o aumento de volumen de líquido en el espacio intersticial, se cuantifica mediante la medición del grosor de la pata inyectada con veneno, con relación a la otra pata que es inyectada con PBS.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 1 mL o, preferiblemente, de 0.5 mL.
- (2) Aguja calibre 27.
- (3) Ratones de 18-20 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (6) Calíper de baja presión para medir el grosor de la pata.

Procedimiento

- (1) Preparar soluciones con diferentes concentraciones de veneno a probar, utilizando PBS como diluyente. Inicialmente se recomienda trabajar en un ámbito entre 2 µg /mL y 200 µg/mL.
- (2) Inyectar 50 µL de cada solución, por la vía subcutánea, en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha a grupos de 4 ratones. La almohadilla plantar de la pata izquierda se inyecta con 50 µL de PBS en idénticas condiciones.
- (3) Utilizando el calíper, medir el grosor de las dos patas una hora después de las inyecciones, garantizándose que la medición se efectúe en el mismo sitio anatómico, que corresponde a la región inyectada.
- (4) Estimar la magnitud del edema (como porcentaje de aumento del grosor de la pata), de la siguiente manera:

$$[(\text{Grosor de la pata derecha} / \text{grosor de la pata izquierda}) \times 100] - 100$$

- (5) Preparar una curva dosis-respuesta (µg de veneno en el eje de las abscisas (x) vs % de edema en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el edema. Determinar la dosis de veneno que induce un edema del 30%, la cual corresponde a la Dosis Edematizante Mínima.

Comentarios

- (1) El edema puede determinarse mediante otros procedimientos. Uno de ellos se basa en el aumento del peso de la pata inyectada con veneno con relación a la pata inyectada con PBS (Yamakawa et al., 1976). Otro se basa en la determinación del incremento de volumen en la pata envenenada, mediante el uso de un pletismómetro; este procedimiento es frecuentemente empleado en

ratas (Trebien y Calixto, 1989), aunque también se puede utilizar en ratones (Chaves et al., 1995).

- (2) En algunos de los primeros trabajos en los que se cuantificó el edema, las mediciones se efectuaron 6 horas después de la inyección (por ejemplo Gutiérrez et al., 1986). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el pico máximo de edema se observa en las primeras horas luego de la inyección, por lo que es más recomendable utilizar un tiempo de una hora para cuantificar este efecto.

Referencias bibliográficas

- (1) Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J.M. (1995) Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33, 31-39.
- (2) Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.Å. (1993) Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93-105.
- (3) Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A., Cerdas, L. (1986) Comparative study of edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85C, 171-175.
- (4) Trebien, H.A., Calixto, J.B. (1989) Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents & Actions* 26, 292-300.
- (5) Yamakawa, M., Nozaki, M., Hokama, Z. (1976) Fractionation of Sakishima habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: Ohsaka, A., Hayashi, K., Sawai, Y. (Eds.), *Toxins: Animal, Plant and Microbial*. New York, Plenum Press.

Determinación de la neutralización de la actividad edematizante

Fundamento

La neutralización de la actividad edematizante de los venenos por antivenenos se determina mediante experimentos en los que se incubaba una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno. Posteriormente, se evalúa la actividad edematizante de las mezclas utilizando la técnica basada en la medición del grosor de las patas inyectadas.

Materiales y reactivos

- (1) Jeringas de vidrio o plástico de 1 mL o, preferiblemente, de 0.5 mL.
- (2) Agujas calibre 27.
- (3) Ratones de 18-20 gramos de peso.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Antiveneno a analizar.
- (6) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (7) Calíper de baja presión para medir el grosor de la pata.
- (8) Baño de agua a 37 °C.

Procedimiento

- (1) Preparar mezclas que contengan una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno, de manera que se obtenga una concentración de veneno correspondiente a 6 Dosis Edematizantes Mínimas en 50 μ L de la mezcla. A cada tubo se debe agregar un volumen de diversas diluciones del antiveneno, de manera que se obtengan las siguientes razones μ L de antiveneno / mg de veneno: 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.2, completando los volúmenes correspondientes con PBS para obtener la concentración de veneno requerida. Se debe preparar un control conteniendo la misma cantidad de veneno pero sin antiveneno, así como un control conteniendo el antiveneno pero sin veneno. Un ejemplo de cómo calcular estas concentraciones y volúmenes se puede encontrar en el procedimiento para la 'Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica', en este mismo Manual.
- (2) Incubar los tubos en baño de agua a 37 °C durante 30 minutos.
- (3) Inyectar 50 μ L de cada mezcla, por la vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha, a grupos de 4 ratones. La almohadilla plantar de la pata izquierda se inyecta con 50 μ L de PBS en idénticas condiciones.
- (4) Utilizando el calíper, medir el grosor de las dos patas una hora después de las inyecciones, garantizándose que la medición se efectúe en el mismo sitio anatómico, que corresponde a la región inyectada.
- (5) Estimar la magnitud del edema (como porcentaje de aumento del grosor de la pata), de la siguiente manera:

$$[(\text{Grosor de la pata derecha} / \text{grosor de la pata izquierda}) \times 100] - 100$$

- (6) Preparar una curva dosis-respuesta (razón μL antiveneno/mg veneno en el eje de las abscisas (x) vs % de edema en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la razón antiveneno/veneno y una escala milimétrica para el % de edema. Tomando como punto de referencia (100 % de actividad) el % de edema observado en los ratones inyectados con la solución control de veneno sin antiveneno, estimar la Dosis Eficaz 50%, correspondiente a la razón μL antiveneno/mg veneno en la que la actividad edematizante corresponde al 50% de la actividad correspondiente a los ratones inyectados con la solución control de veneno.

Comentarios

(1) Con algunos antivenenos constituidos por moléculas completas de IgG purificadas mediante precipitación con sulfato de amonio se ha observado un fenómeno de incremento del edema conforme se aumenta la concentración del antiveneno en las mezclas (Gutiérrez et al., 1986; Rojas et al., 2005). Este hallazgo se debe probablemente a la presencia de proteínas no inmunoglobulinas en el antiveneno, a partir de las cuales se liberan péptidos farmacológicamente activos como consecuencia de la acción proteolítica de enzimas del veneno. En estos casos, la única forma de evaluar la neutralización del edema por el antiveneno es purificando los anticuerpos del antiveneno, por ejemplo mediante precipitación con ácido caprílico (Rojas et al., 1994). Alternativamente, en algunos estudios este problema se ha enfrentado efectuando experimentos en los que se evita la incubación del veneno y el antiveneno. En estos casos, se administran diferentes diluciones del antiveneno por la vía intravenosa y cinco minutos después se inyecta la dosis de reto del veneno por la vía subcutánea como se ha descrito (Gutiérrez et al., 1986).

Referencias bibliográficas

- (1) Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A., Cerdas, L. (1986) Comparative study of edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85C, 171-175.
- (2) 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, 351-363.
- (3) Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., Rojas, G., Gutierrez, J.M. (2005) Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* 93, 85-95.

Determinación de la actividad coagulante

Fundamento

La actividad coagulante de los venenos se puede determinar sobre plasma o sobre una solución de fibrinógeno. Esta actividad se estudia en el laboratorio agregando diversas cantidades de veneno a alícuotas de plasma humano citratado o de una solución de fibrinógeno. Muchos venenos de serpientes contienen enzimas que actúan directamente sobre el fibrinógeno (serina proteinasas 'tipo trombina'), o sobre el factor X (metaloproteinasa) o sobre la protrombina (serina proteinasas o metaloproteinasa). El resultado de la acción de estas enzimas es la coagulación del plasma o, en el caso de las enzimas 'tipo trombina', la coagulación tanto del plasma como de las soluciones de fibrinógeno. La actividad se determina midiendo los tiempos de coagulación del plasma o del fibrinógeno luego de agregar diversas concentraciones de veneno. La Dosis Coagulante Mínima sobre plasma (DCM-P) o sobre fibrinógeno (DCM-F) corresponde a la concentración de veneno que induce la coagulación en 60 segundos.

Materiales y reactivos

- (1) Tubos de vidrio.
- (2) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (3) Plasma humano anticoagulado con solución de citrato de sodio 3.8 g/dL. Se emplea una parte de la solución anticoagulante para 9 partes de sangre venosa. Una vez obtenida la sangre, se mezcla con el anticoagulante y se centrifuga a 2000 x g durante 10 minutos y se colecta el plasma.
- (4) Solución de fibrinógeno de 4 g/L, preparada utilizando como solvente PBS.
- (5) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (6) Baño de agua a 37 °C.
- (7) Cronómetro.

Procedimiento

- (1) Agregar 0.2 mL de plasma citratado, o de solución de fibrinógeno, a tubos de vidrio e incubar durante 3-5 minutos en baño de agua a 37 °C.
- (2) Agregar a cada tubo 0.1 mL de soluciones conteniendo diferentes concentraciones de veneno disueltas en PBS. Para cada concentración de veneno se debe trabajar por triplicado. Como controles negativos, agregar 0.1 mL de PBS al plasma o al fibrinógeno. Como control positivo se puede emplear una solución de trombina.
- (3) Determinar el tiempo de coagulación con un cronómetro. El plasma o fibrinógeno a los cuales se les agrega únicamente PBS no deben coagular. Por el contrario, los tubos a los que se agrega trombina deben coagular.
- (4) Preparar una curva dosis-respuesta (μg de veneno en el eje de las abscisas (x) vs tiempo de coagulación en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el tiempo de coagulación. Determinar las dosis de veneno que induce coagulación del plasma o del fibrinógeno en 60 segundos, las cuales corresponden a la Dosis Coagulante Mínima-Plasma (DCM-P) y Dosis Coagulante Mínima-Fibrinógeno (DCM-F), respectivamente.

Comentarios

(1) La Dosis Coagulante Mínima puede expresarse como cantidad absoluta de veneno, o bien como concentración de veneno una vez agregado al plasma o al fibrinógeno. Se debe tener presente que la actividad coagulante de los venenos varía de acuerdo a la especie de origen del plasma. Por su relevancia clínica, se recomienda utilizar plasma humano. Dicho plasma, si se obtiene de un Banco de Sangre, puede dividirse en alícuotas y congelarse a -20 °C, lo que permite almacenarlo durante varias semanas. De todas formas, es siempre conveniente correr en cada determinación un control positivo con trombina, lo que permite controlar la calidad del plasma.

Referencias bibliográficas

- (1) Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. (1989) Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.
- (2) Theakston, R.D.G., Reid, H.A. (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization* 61, 949-956.

Determinación de la neutralización de la actividad coagulante

Fundamento

La neutralización de la actividad coagulante de venenos por antivenenos se determina mediante experimentos en los que se incubaba una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno. Posteriormente se determinan los tiempos de coagulación al agregar alícuotas de estas mezclas a plasma citratado o a una solución de fibrinógeno.

Materiales y reactivos

- (1) Tubos de vidrio.
- (2) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (3) Antiveneno a analizar
- (4) Plasma humano anticoagulado con solución de citrato de sodio 3.8 g/dL. Se emplea una parte de la solución anticoagulante para 9 partes de sangre venosa. Una vez obtenida la sangre, se mezcla con el anticoagulante y se centrifuga a 2000 x g durante 10 minutos y se colecta el plasma.
- (5) Solución de fibrinógeno de 4 g/L, preparada utilizando PBS como solvente.
- (6) Solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.2 (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.
- (7) Baño de agua a 37 °C.
- (8) Cronómetro.

Procedimiento

- (1) Preparar mezclas que contengan una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno, de manera que se obtenga una concentración de veneno correspondiente a 2 Dosis Coagulantes Mínimas en 0.1 mL de la mezcla. A cada tubo se debe agregar un volumen de diversas diluciones del antiveneno, de manera que se obtengan las siguientes razones μL de antiveneno / mg de veneno: 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.2, completando los volúmenes correspondientes con PBS para obtener la concentración de veneno requerida. Se debe preparar un control conteniendo la misma cantidad de veneno pero sin antiveneno, así como un control conteniendo el antiveneno pero sin veneno. Un ejemplo de cómo calcular estas concentraciones y volúmenes se puede encontrar en el procedimiento para la 'Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica', en este mismo Manual.
- (2) Incubar los tubos en baño de agua a 37 °C durante 30 minutos.
- (3) Agregar 0.2 mL de plasma citratado, o de solución de fibrinógeno, a tubos de vidrio e incubar durante 3-5 minutos en baño de agua a 37 °C, justo antes de agregar las mezclas de veneno y antiveneno.
- (4) Agregar a los tubos conteniendo plasma o fibrinógeno 0.1 mL de cada una de las mezclas, trabajando por triplicado.
- (5) Determinar el tiempo de coagulación con un cronómetro. El plasma o fibrinógeno a los cuales se les agrega únicamente PBS o antiveneno sin veneno no deben coagular.

- (6) Preparar una curva dosis-respuesta (razón μL antiveneno/mg veneno en el eje de las abscisas (x) vs tiempo de coagulación en el eje de las ordenadas (y)), empleando una escala logarítmica para la razón antiveneno/veneno y una escala milimétrica para tiempo de coagulación. Tomando como punto de referencia el tiempo de coagulación observado en los ratones inyectados con la solución control de veneno sin antiveneno, estimar la Dosis Eficaz (DE), que es la razón μL antiveneno/mg veneno en la que el tiempo de coagulación corresponde a 3 veces el tiempo de coagulación del plasma al que se le agregó veneno sin antiveneno.

Referencias bibliográficas

- (1) Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. (1989) Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.

Determinación de la actividad desfibrinante

Fundamento

La actividad desfibrinante, o desfibrin(ogen)ante, de los venenos es consecuencia de la acción de sus componentes procoagulantes, tales como las serino proteinasas 'tipo-trombina', las metaloproteiniasas activadoras del factor X, y las serina proteinasas y metaloproteiniasas activadoras de la protrombina. Cuando venenos con actividad coagulante se administran a animales de laboratorio por la vía intravenosa, se produce un consumo del fibrinógeno y se prolongan los tiempos de coagulación como consecuencia de la desfibrin(ogen)ación. Esta actividad se puede estudiar mediante la cuantificación de los niveles de fibrinógeno o, más fácilmente, mediante la observación de la coagulabilidad o incoagulabilidad de la sangre.

Materiales y reactivos

- (1) Tubos de vidrio.
- (2) Jeringas de plástico o vidrio de 1.0 mL.
- (3) Agujas calibre 27.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Ratones de 18-20 gramos de peso.
- (6) Ketamina (solución de 50 mg/mL).
- (7) Xilacina (solución de 20 mg/mL).
- (8) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.

Procedimiento

- (1) Preparar soluciones de veneno con diferentes concentraciones, utilizando PBS como diluyente. Inicialmente se puede trabajar con soluciones en un ámbito entre 5 µg/mL y 200 µg/mL.
- (2) Inyectar 0.2 mL de cada solución, por la vía intravenosa en la vena caudal, a grupos de 4 ratones. Un grupo adicional de 4 ratones debe ser inyectado con 0.2 mL de PBS.
- (3) Una hora después de las inyecciones, anestesiarse los ratones mediante inyección intramuscular, en el muslo, de una solución de ketamina (1.5 mg) y xilacina (1 mg).
- (4) Mediante punción cardiaca, obtener aproximadamente 0.2 mL de sangre. La sangre se puede obtener también del plexo venoso ocular, utilizando capilares no heparinizados.
- (5) Colocar la sangre en los tubos de ensayo e incubar los tubos a temperatura ambiente, evitando moverlos.
- (6) Después de 2 horas de incubación, inclinar los tubos cuidadosamente y observar si se ha formado un coágulo o si, por el contrario, la sangre permanece incoagulada.
- (7) Determinar la Dosis Desfibrinante Mínima, que corresponde a la dosis de veneno que induce incoagulabilidad en los 4 ratones inyectados. Todas las

muestras de sangre obtenidas de ratones inyectados con PBS deben estar coaguladas.

Referencias bibliográficas

- (1) Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. (1989) Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.
- (2) Theakston, R.D.G., Reid, H.A. (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization* 61, 949-956.

Determinación de la neutralización de la actividad desfibrinante

Fundamento

La neutralización de la actividad desfibrinante de venenos por antivenenos se determina mediante experimentos en los que se incubaba una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno. Posteriormente se inyectan las mezclas por la vía intravenosa en ratones y se determina si se genera o no desfibrinación en los animales.

Materiales y reactivos

- (1) Tubos de vidrio.
- (2) Jeringas de plástico o vidrio de 1.0 mL.
- (3) Agujas calibre 27.
- (4) Veneno a analizar. Se recomienda que sea liofilizado.
- (5) Antiveneno a analizar.
- (6) Ratones de 18-20 gramos de peso.
- (7) Ketamina (solución de 50 mg/mL).
- (8) Xilacina (solución de 20 mg/mL).
- (9) Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS): 0.14 M NaCl, 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2.

Procedimiento

- (1) Preparar mezclas que contengan una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno, de manera que se obtenga una concentración de veneno correspondiente a 2 Dosis Desfibrinantes Mínimas en 0.2 mL de la mezcla. A cada tubo se debe agregar un volumen de diversas diluciones del antiveneno, de manera que se obtengan las siguientes razones μL de antiveneno / mg de veneno: 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.2, completando los volúmenes correspondientes con PBS para obtener la concentración de veneno requerida. Se debe preparar un control conteniendo la misma cantidad de veneno pero sin antiveneno, así como un control conteniendo el antiveneno pero sin veneno. Un ejemplo de cómo calcular estas concentraciones y volúmenes se puede encontrar en el procedimiento para la 'Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica', en este mismo Manual.
- (2) Inyectar 0.2 mL de cada solución, por la vía intravenosa en la vena caudal, a grupos de 4 ratones. Un grupo adicional de 4 ratones debe ser inyectado con 0.2 mL de PBS.
- (3) Una hora después de las inyecciones, anestesiarse los ratones mediante inyección intramuscular, en el muslo, de una solución de ketamina (1.5 mg) y xilacina (1 mg).
- (4) Mediante punción cardíaca, obtener aproximadamente 0.2 mL de sangre. La sangre se puede obtener también del plexo venoso ocular, utilizando capilares no heparinizados.
- (5) Colocar la sangre en los tubos de ensayo e incubar los tubos a temperatura ambiente, evitando moverlos.

- (6) Después de 2 horas de incubación, inclinar los tubos cuidadosamente y observar si se ha formado un coágulo o si, por el contrario, la sangre permanece incoagulada.
- (7) Determinar la Dosis Eficaz (DE), que corresponde a la menor razón μL de antiveneno / mg de veneno en la que se neutralizó la actividad desfibrinante en los 4 ratones, o sea, en la que las sangres de los cuatro ratones estaba coagulada al cabo de las dos horas de incubación. Los controles inyectados con la solución de veneno sin antiveneno deben mostrar incoagulabilidad en los 4 ratones, en tanto los controles inyectados con PBS o con antiveneno sin veneno deben mostrar coagulación.

Referencias bibliográficas

- (1) Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. (1989) Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.