

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Determinación de los efectos de la
temperatura de almacenamiento sobre el
título de anticuerpos y capacidad
neutralizante en las diferentes
presentaciones comerciales de antivenenos
polivalentes producidos en Colombia**

Paola Andrea Acero Triana

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología
Bogotá D.C., Colombia
2017

Determinación de los efectos de la temperatura de almacenamiento
sobre el título de anticuerpos y capacidad neutralizante en las
diferentes presentaciones comerciales de antivenenos polivalentes
producidos en Colombia

Paola Andrea Acero Triana

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Toxicología

Directora:

PhD. María Camila Renjifo Ibáñez

Codirector:

PhD. Vladimir Corredor Espinel

Codirectora:

PhD. Vitelbina Núñez

Línea de investigación:

Toxinología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá, Colombia

2017

“Las masas humanas más peligrosas son aquellas en cuyas venas ha sido inyectado el veneno del miedo... del miedo al cambio”.

Octavio Paz, Laberinto de la soledad. 1950.

Agradecimientos

A los azares de la vida, que me llevaron por el camino de la Toxinología y su locura, al incansable apoyo de mi madre, mi hermano y mis amigos quienes me animaron en los momentos de incertidumbre.

Al programa de Ofidismo y Escorpionismo de la Universidad de Antioquia, a su increíble personal docente y estudiantil, sin su apoyo esta tesis no habría sido posible y por su puesto a mi Directora, por su extraordinaria dedicación y paciencia.

Adicionalmente, quiero agradecer al grupo de la Consultoría Estadística del Departamento de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, quienes aportaron el soporte estadístico de este estudio.

Resumen

Antecedentes: En la literatura se encuentra escasa información sobre la termoestabilidad de Suero Antiofídico Polivalente (SAP) producido en Colombia, por lo cual se diseñó un estudio que respondiera a estas necesidades y que permitiera sugerir modificaciones sobre la distribución y fortalecimiento de la cadena de frío. **Métodos:** Se realizó un estudio exploratorio-experimental-prospectivo en el cual se adquirieron 6 ampollas comerciales de los SAP producidos en Colombia (Instituto Nacional de Salud o INS y Laboratorios Probiol®). Con el fin de homogenizar la comparación entre productos, se liofilizaron 3 ampollas del SAP producido por el INS (INS_L), posteriormente todas las ampollas se almacenaron a 3 temperaturas diferentes (4, 22 y 45°C) por períodos de 3 y 6 meses. Al concluir cada período de almacenamiento, se evaluó el bandedo electroforético de cada producto, así como su capacidad de neutralización *in vitro* para las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta del veneno de *Bothrops asper*. También se determinó el título frente a este veneno. **Resultados:** La forma de preservación que mostró un mejor comportamiento al evaluar la neutralización para las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper* fue la presentación comercial de INS, seguida por INS_L y Probiol; se observó que la mejor temperatura de almacenamiento fue de 4°C independientemente de la forma de preservación, sin embargo no se hallaron diferencias significativas entre las temperaturas de 4 y 22°C a los 6 meses de almacenamiento. En la determinación de títulos de anticuerpos INS mostró una mejor unión antígeno-anticuerpo para temperaturas entre 4 y 22°C seguido por INS_L y Probiol. Los hallazgos cualitativos de la electroforesis en gel de poliacrilamida evidenciaron que realizada a los 3 vs. 6 meses de almacenamiento, se observa una banda proteica a 150KDa correspondiente a la IgG para todos los SAP independiente del tiempo y la temperatura de almacenamiento. **Conclusiones:** a pesar de las modificaciones de temperatura, la forma de preservación comercial de INS mostró un mejor comportamiento al neutralizar las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper*. Sin embargo, en el análisis estadístico de la unión antígeno-anticuerpo se evidenció que la temperatura y el tiempo de almacenamiento sí influyen en esta. Por tal motivo es importante realizar estudios *in vivo* para corroborar estos hallazgos y así, promover estrategias que favorezcan el acceso de este medicamento a áreas rurales de difícil acceso y garantizar una cadena de frío estable, cuya población suele ser la más afectada por ser el hábitat de las serpientes.

Palabras clave: accidente ofídico, suero antiofídico, pruebas de neutralización.

Abstract

BACKGROUND: There is little information in the literature about the thermostability of Polyvalent Snake Antivenom (PSA) produced in Colombia. Therefore, this study was designed to respond to these needs and to suggest changes in the distribution and strengthening of the cold chain. **Methods:** An exploratory-prospective-experimental study was carried out in which 6 commercial ampoules of PSA's produced in Colombia (Instituto Nacional de Salud or INS and Laboratorios Probiol®) were acquired. In order to homogenize the comparison between products, 3 ampoules of the PSA produced by the INS (INS_L) were lyophilized, after which all vials were stored at 3 different temperatures (4, 22 and 45 °C) for periods of 3 and 6 months. At the end of each storage period, the electrophoretic profile of each product was evaluated, as well as their *in vitro* neutralization capacity for the proteolytic, coagulant and indirect haemolytic activities of the *Bothrops asper* venom. The titre was also determined against this venom. **RESULTS:** The preservation form showed a better performance when we were evaluating neutralization for the proteolytic, coagulant and indirect hemolytic activities against *B. asper* venom was the commercial presentation of INS, followed by INS_L and Probiol; It was observed that the best storage temperature was 4°C, regardless of the form of preservation, however, no significant differences were found between temperatures of 4 and 22°C after 6 months of storage. In the determination of INS antibody titers showed a better antigen-antibody binding at temperatures between 4 and 22°C, followed by INS_L and Probiol. The findings in the polyacrylamide gel electrophoresis showed that, obtained at 3 vs. 6 months of storage, a protein band at 150 KDa corresponding to the IgG for all SAP's is observed independent of time and storage temperature. **CONCLUSIONS:** Despite the changes in temperature, the commercial preservation form of INS showed a better performance by neutralizing the proteolytic, coagulant and hemolytic activities against *B. asper* venom. But in the statistical analysis of antigen-antibody binding it was evidenced that temperature and storage time don't influence this, therefore it is important to perform *in vivo* studies to corroborate these findings and thus, promote strategies that favor the access of this drug to rural areas of difficult access and ensure a stable chain cold, whose population usually be the most affected by the activity of snakes.

Keywords: Snake bites, Antivenins, test neutralization

Contenido

Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIII
Lista de imágenes.....	XV
Introducción.....	17
1 Problemática de investigación.....	22
1.1 Planteamiento del problema.....	22
1.2 Justificación.....	25
1.3 Pregunta de investigación.....	28
1.4 Hipótesis de investigación.....	28
1.5 Hipótesis alternativa.....	29
1.6 Objetivos.....	29
1.6.1 Objetivo general.....	29
1.6.2 Objetivos específicos.....	29
2 Marco Teórico.....	30
2.1 Definición de accidente ofídico.....	30
2.1.1 Comportamiento mundial del accidente ofídico.....	30
2.1.2 Comportamiento del accidente ofídico en Colombia.....	31
2.1.3 Generalidades sobre las especies causantes del accidente ofídico en Colombia.....	34
2.1.4 Clasificación del envenenamiento según el género de la serpiente.....	35
2.2 Generalidades sobre los venenos de serpientes.....	39
2.3 Definición de Inmunoterapia pasiva.....	44
2.4 Generalidades del suero antiofídico.....	46
2.4.1 Sostenibilidad de la producción del Suero Antiofídico.....	48
2.4.2 Producción y distribución del suero antiofídico colombiano.....	50

2.4.3	Evaluación de estabilidad de Antivenenos Antiofídicos	54
2.5	Proceso de liofilización	58
2.5.1	Fundamento de la técnica de liofilización por deshidrocongelación	59
2.5.2	Liofilización de los antivenenos antiofídicos	60
2.6	Técnicas para determinación de anticuerpos de antiveneno	61
2.6.1	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (E.L.I.S.A.).....	61
2.7	Técnicas para evaluación de ensayos de neutralización	63
2.7.1	Técnicas para evaluación de ensayos de neutralización <i>in vivo</i>	64
2.7.2	Técnicas para evaluación de ensayos de neutralización <i>in vitro</i>	64
3	Metodología	67
3.1	Tipo de estudio.....	67
3.1.1	Obtención del veneno de serpientes	67
3.1.2	Adquisición de antivenenos.....	68
3.2	Liofilización del antiveneno Líquido	69
3.3	Distribución de grupos y Almacenamiento del SAP	69
3.4	Reconstitución de los SAP Liofilizados (INS_L y Probiol)	71
3.5	Caracterización de los cambios físicos de los SAP's	71
3.6	Electroforesis en gel de poliacrilamida de los SAP's.....	71
3.7	Determinación de títulos de anticuerpos por el método de E.L.I.S.A	72
3.8	Ensayos de neutralización <i>in vitro</i>	72
3.8.1	Neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de <i>B. asper</i> 72	
3.8.2	Neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de <i>B. asper</i> 73	
3.8.3	Neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de <i>B. asper</i> 73	
3.9	Análisis estadístico.....	73
3.10	Definición operacional de las variables.....	78
4	Resultados	79

4.1	Comparación de la evaluación de cambios físicos de los antivenenos almacenados a diferentes temperaturas por 3 y 6 meses	79
4.1.1	Coloración.....	79
4.1.2	Turbidez.....	80
4.1.3	Precipitación.....	80
4.2	Tiempo de reconstitución de los SAP liofilizados a los 3 y 6 meses	83
4.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida de SAP almacenados a 3 y 6 meses	83
4.4	Determinación de títulos de anticuerpos por el método E.L.I.S.A para el veneno de <i>B. asper</i>	85
4.4.1	Análisis descriptivo.....	86
4.4.2	Análisis de Varianza Múltiple (MANOVA)	88
4.5	Neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de <i>B. asper</i>	89
4.5.1	Análisis descriptivo.....	89
4.5.2	Análisis estadístico mediante modelo de regresión <i>Beta</i>	93
4.6	Neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de <i>B. asper</i>	96
4.7	Neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de <i>B. asper</i>	101
4.7.1	Análisis descriptivo.....	101
4.7.2	Análisis estadístico mediante modelo lineal generalizado con respuesta <i>Gamma</i>	106
5	Discusión	111
6	Conclusiones.....	114
	Bibliografía	117
	Anexos	133
A.	Materiales.....	133
	Determinación de títulos de anticuerpos por el método de E.L.I.S.A	133
	Electroforesis en gel de poliacrilamida	134
	Neutralización actividad proteolítica	135
	Neutralización de la actividad coagulante.....	135

Neutralización de la actividad hemolítica indirecta.....	135
B. Informe estadístico	137
C. Aval Comité de Ética.....	171

Lista de figuras

- Figura 2-1. Consolidado de reporte de accidente ofídico en Colombia por SIVIGILA de los últimos 10 años. Pág. 32
- Figura 2-2. Número de casos de accidente ofídico en las diez entidades territoriales con mayor notificación en Colombia. Pág. 33.
- Figura 2-3. Identificación de la serpiente agresora por su nombre común en Colombia. Pág. 34.
- Figura 2-4. Ejemplo del aparato venenoso de las serpientes pertenecientes a la familia Viperidae. Pág. 40.
- Figura 2-5. Proteoma del veneno de *B. asper* comparando la composición química de 4 regiones geográficas. Pág. 42.
- Figura 2-6. Efecto de la inoculación del veneno. Pág. 43.
- Figura 2-7. Inmunoterapia pasiva. Pág. 45.
- Figura 2-8. Estructura de Inmunoglobulina G y sus fracciones. Pág. 48.
- Figura 2-9. Número de ampollitas de SAP importadas por año. Pág. 48.
- Figura 2-10. Número y porcentaje de ampollitas importadas según país de origen. Pág. 48.
- Figura 2-11. Fases de un ensayo E.L.I.S.A. Pág. 63.
- Figura 4-1. INS almacenado a 3 y 6 meses en las diferentes temperaturas. Pág. 81.
- Figura 4-2. INS_L almacenado a 3 y 6 meses en las diferentes temperaturas. Pág. 82.
- Figura 4-3. Probiol almacenado a 3 y 6 meses en las diferentes temperaturas. Pág. 82.
- Figura 4-4. Absorbancia y tratamientos con bloques por Títulos. Pág. 87.
- Figura 4-5. Comparación INS, INS_L y Probiol a todas las temperaturas vs. tiempo de preservación. Pág. 88
- Figura 4-6. Comparación del promedio de porcentajes de neutralización de la actividad proteolítica de *B. asper* a los 3 y 6 meses. Pág. 90.
- Figura 4-7. Comparación de la forma de preservación. Pág. 91.
- Figura 4-8. Comparación del tiempo de almacenamiento vs. Temperatura. Pág. 91.
- Figura 4-9. Comparación del tiempo de almacenamiento vs. forma de preservación. Pág. 92.
- Figura 4-10. Comparación de temperatura. Pág. 93.
- Figura 4-11. Gráficos de interacciones dobles de la neutralización de la actividad proteolítica para el veneno de *B. asper*. Pág. 94.
- Figura 4-12. Comparación del porcentaje de neutralización hemolítica promedio a los 3 y 6 meses de almacenamiento. Pág. 97.

Figura 4-13. Forma de preservación. Pág. 98.

Figura 4-14. Tiempo de almacenamiento vs. Temperatura. Pág. 98.

Figura 4-15. Tiempo de almacenamiento vs. forma de preservación Pág. 99.

Figura 4-16. Temperatura de almacenamiento. Pág. 100.

Figura 4-17. Gráficos de interacciones dobles de la Neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper*. Pág. 101.

Figura 4-18. Comparación de la neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de *B. asper* a los 3 y 6 meses. Pág. 102.

Figura 4-19. Forma de preservación Pág. 103.

Figura 4-20. Variable tiempo. Pág. 104.

Figura 4-21. Variable tiempo vs. forma de preservación. Pág. 104.

Figura 4-22. Variable temperatura. Pág. 105.

Figura 4-23. Gráficos de interacciones dobles. Pág. 108.

Lista de tablas

- Tabla 2-1. Incidencia de casos de accidente ofídico según región geográfica. Pág. 33.
- Tabla 2-2 Clasificación de severidad del Accidente Bothrópico. Pág. 36.
- Tabla 2-3. Manejo médico según clasificación de severidad del accidente Bothrópico. Pág. 37.
- Tabla 2-4. Clasificación de severidad del Accidente Lachésico. Pág. 38.
- Tabla 2-5. Clasificación de la severidad del accidente Crotálico. Pág. 39.
- Tabla 2-6. Manejo médico según clasificación de severidad del accidente Crotálico. Pág. 39.
- Tabla 2-7 Composición bioquímica del veneno de serpiente. Pág. 41.
- Tabla 2-8. Efectos fisiopatológicos del veneno. Pág. 43.
- Tabla 2-9. Lotes de SAP producidos y liberados en Colombia, período 2014-2016. Pág. 52.
- Tabla 2-10. Ventajas y desventajas de la Liofilización del SAP. Pág. 61.
- Tabla 3-1. Designación del nombre de los tratamientos. Pág. 67.
- Distribución de los grupos de tratamientos a las tres temperaturas para el Ensayo 1 y 2, respectivamente. Pág. 70.
- Tabla 3-3. Almacenamiento del SAP. Pág. 70.
- Tabla 3-4. Distribución de las observaciones para el potencial de neutralización de la actividad proteolítica del veneno de *B. asper*. Pág. 74.
- Tabla 3-5. Porcentajes de neutralización de las actividades proteolíticas contra el veneno de *B. asper* promedio estimadas. Pág. 75.
- Tabla 3-6. Distribución de las observaciones para el potencial de neutralización de la actividad coagulante del veneno de *B. asper*. Pág. 75.
- Tabla 3-7. Razón promedio esperada de neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de *B. asper* estimada por tratamiento. Pág. 76.
- Tabla 3-8. Distribución de las observaciones para el potencial de neutralización de la actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. asper*. Pág. 76.
- Tabla. 3-9. Ejemplificación de la distribución para una variable respuesta. Pág. 76.
- Tabla 4-1. Cambios de la coloración del SAP según temperatura y tiempo de almacenamiento. Pág. 80.
- Pág. 80.
- Tabla 4-3. Precipitación del SAP según temperatura y tiempo de almacenamiento. Pág. 81.
- Tabla 4-4. Tiempo de hidratación de los SAP liofilizados a los 3 y 6 meses. Pág. 83.
- Tabla 4-5. Test para construcción de MANOVA. Pág. 83.
- Tabla 4-6. Contraste SAP vs. tiempo de almacenamiento. Pág. 95.

Tabla 4-7. Contraste temperatura vs. tiempo de almacenamiento. Pág. 95.

Tabla 4-8. Contraste forma de preservación vs. tiempo de almacenamiento vs. Temperatura. Pág. 96.

Tabla 4-9. Contraste para cada SAP vs. Tiempo de almacenamiento Vs. Temperatura. Pág. 106.

Tabla 4-10. Contraste del efecto de la temperatura vs. Razón de neutralización coagulante contra el veneno de *B. asper*, para cada presentación de SAP. Pág. 109.

Tabla 4-11. Contraste del efecto del tiempo de almacenamiento vs. la razón de neutralización coagulante para cada SAP. Pág. 109.

Lista de imágenes

Imagen 4-1. SDS-PAGE de SAP almacenados a 3 meses. Pág. 84

Imagen 4-2. SDS-PAGE de SAP almacenado a 6 meses. Pág. 85

Lista de siglas y abreviaturas

1. SAP, Suero Antiofídico Polivalente
2. INS, Instituto Nacional de Salud
3. CID, Coagulación intravascular diseminada
4. SNC, Sistema Nervioso Central
5. TP, Tiempo de Protrombina
6. TTP, Tiempo Parcial de Tromboplastina
7. IgG, Inmunoglobulina G
8. μL , microlitro
9. μg , microgramo
10. s, segundo
11. SSN, solución salina normal (0.9%)
12. MANOVA, Análisis de Varianza Multivariado
13. kDa, kiloDaltons
14. EPSRC, United Kingdom's Engineering and Physical Sciences Research Council.
15. BBSRC, Biotechnology and Biological Sciences Research Council.
16. EDT, Enfermedades Tropicales Desatendidas
17. DL_{50} , Dosis Letal 50
18. DE_{50} , Dosis efectiva 50

Introducción

En las zonas rurales de América Latina, África subsahariana y Asia, el accidente ofídico es un problema de salud pública que afecta principalmente a poblaciones de bajos recursos económicos, que carecen de representatividad política y que además padecen otras problemáticas de carácter social y sanitario (1-8). Se estima que al año, aproximadamente 5.400.000 accidentes ofídicos tienen lugar en el mundo (1, 3, 9), de los cuales 95.000 corresponden a casos mortales y 300.000 a casos en los que las víctimas sobreviven con algún tipo de discapacidad permanente (10). En lo que respecta a América Latina, anualmente se presentan alrededor de 150.000 accidentes ofídicos, de los cuales cerca de 5.000 terminan en muerte debido a que suelen ocurrir en áreas rurales apartadas, sin acceso a servicios de salud o muy deficientes. Entre las principales causas de mortalidad en la región, se destacan el retraso en el tratamiento hospitalario, ya sea por problemas de transporte o por visitas prolongadas a curanderos tradicionales, dosificación inadecuada del suero antiofídico o con especificidad al veneno inapropiado (1, 11, 12).

En 2015, se reportaron 4.273 casos de accidentes ofídicos en Colombia, donde 31 fueron fatales (13). Sin embargo, se ha considerado que existe un sub-reporte de casos en el país, el cual está relacionado con las características de enfermedad tropical desatendida (10, 14)¹. Recientemente, se estimó un sub-registro promedio para Colombia del 44.5%, es decir, se calcularon 8.129 casos anuales no reportados (15), donde el envenenamiento Bothrópico en particular causa el 90-95% de la morbilidad en el país (16-18). Es importante mencionar que algunos autores han sugerido que en el mundo mueren anualmente más personas por accidente ofídico que por otras enfermedades tropicales desatendidas (19-21).

El único tratamiento efectivo para el envenenamiento por mordedura de serpiente es el suero antiofídico, que es un conjunto de anticuerpos o inmunoglobulinas G (IgG's) que se producen tras inmunizar animales tales como caballos y ovejas. Dichas especies son capaces de producir grandes volúmenes de suero (4), al inmunizarse con el veneno de una (monovalente) o varias (polivalente) especies de serpiente(s) (11, 22-27).

¹ Las Enfermedades Tropicales Desatendidas (EDT) son un grupo diverso de enfermedades transmisibles que prevalecen en zonas tropicales y subtropicales, que afectan principalmente a poblaciones que viven en la pobreza, concentradas en áreas rurales remotas y por causas de discapacidad o muerte prevenible (14). El accidente ofídico fue incluido en el listado de ETD en julio de 2017 (14).

Después de un proceso de purificación, las IgG's resultantes permiten el control de las manifestaciones clínicas sistémicas del envenenamiento (4, 28-31).

A pesar de la importancia de este medicamento vital, su producción ha estado en crisis durante un largo período, dado que con los protocolos actuales de producción, la elaboración de un antiveneno que sea altamente efectivo requiere de tiempo e inversión significativa de dinero (32). Otros agravantes asociados al costo de producción, que han impactado social y económicamente a la población, se describen a continuación:

- Escasez de los antivenenos producidos, su alto costo para el consumidor final y la dificultad en la distribución de éstos en las regiones más afectadas (3, 5, 9, 31).
- Incapacidad o dificultad para garantizar una cadena de frío estable en el traslado de antivenenos líquidos a las regiones geográficas con altas temperaturas ambientales (7).
- Falta de acceso a servicios de salud, que está relacionado con zonas rurales de difícil acceso geográfico, escasas de personal de salud cualificado, limitaciones económicas para la compra de antivenenos, ausencia de políticas públicas en salud que resuelvan las dificultades en investigación, producción, distribución y acceso (3, 5, 9, 31).
- La focalización de la población vulnerable, ya que se ha demostrado que los grupos poblacionales más frecuentes son niños, hombres y mujeres en edad productiva (en Colombia afecta a la población de 5 a 39 años, con edad media de 32,5 años (33)), es decir, que pueden ser comprometidos con secuelas físicas permanentes y/o secuelas psicológicas secundarias (3, 5, 9, 31).
- La estrecha relación existente entre el desarrollo de actividades como la agricultura, recolección de desechos o desplazamientos a diferentes zonas (caminatas) y el accidente ofídico (4, 19, 20, 33). Este fenómeno permite que se empiece a considerar el envenenamiento por la mordedura de serpientes como un accidente ocupacional (1, 9, 20, 34, 35).

El proceso de producción de un antiveneno consta de varias etapas, en el cual se puede requerir de ocho a diez semanas para obtener un suero hiperinmune con niveles

adecuados de IgG's contra el veneno (36)². Posterior a los procesos de purificación y fraccionamiento, se realiza la evaluación de la efectividad o potencia de neutralización mediante la Dosis Efectiva 50 (DE₅₀)³ (37). En conformidad con la guía para la producción, control y regulación de inmunoglobulinas del antivenenos de serpientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se ha sugerido que se realicen estudios de estabilidad térmica (38), evaluación de las características físicas del antiveneno, pruebas de solubilidad (para las preparaciones liofilizadas), SDS-PAGE (39) y finalmente neutralización de las actividades hemorrágica, necrotizante, procoagulante, defibrinante, miotóxica y neurotóxica del veneno (37).

En Colombia, la producción de Suero Antiofídico Polivalente (SAP) es realizada por el Instituto Nacional de Salud (INS) y por Laboratorios Probiol[®], quienes son de carácter público y privado, respectivamente. Estas dos instituciones producen diferentes formas farmacéuticas de los productos, el SAP producido por INS tiene una formulación líquida, con requerimiento de cadena de frío (40); mientras que Laboratorios Probiol[®] lo fabrica liofilizado y sin requerir temperaturas bajas para su preservación (41). De acuerdo a la información que suministra cada entidad, el SAP de INS contiene inmunoglobulinas de origen equino efectivas contra el envenenamiento por serpientes del género *Bothrops*⁴ y *Crotalus* (Cascabel), capaces de neutralizar 70mg y 10mg de veneno, respectivamente (40). Por otro lado, Laboratorios Probiol[®] contiene inmunoglobulinas de origen equino capaces de neutralizar la actividad letal de 25 mg de veneno contra *Bothrops (asper y atrox)*, 10 mg contra *Lachesis muta* y 5 mg contra *Crotalus durissus cumanensis* (41). Estas diferencias en la capacidad neutralizante de la letalidad, han sido ampliamente reportadas en la literatura (16), ya que la cantidad de ampollitas requeridas para neutralizar cierta cantidad de veneno varía de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes (18). Por ejemplo, de acuerdo a los reportes, para el tratamiento de un accidente ofídico bothrópico clasificado como severo, en el cual se debe neutralizar al menos 300mg de veneno, se pueden requerir 6 ampollitas de INS y 12 ampollitas de Laboratorios Probiol[®] (42).

² La OMS sugiere que los estudios de letalidad, sean realizados mínimo entre los 3 y 6 meses (37).

³ DE50 es una medida de la dosis de antiveneno capaz de neutralizar la actividad letal de un veneno, para prevenir la muerte, en una población seleccionada de animales de experimentación, usualmente ratones (37).

⁴ En el instructivo del SAP de INS nominan los venenos de serpiente usados por sus nombres comunes como: Taya equis, Mapaná, Cuatronarices, Patoco, Cabeza de candado, Boquidorá, Mapanare, Granadilla, Venticuatro, Barba amarilla, Patoco, Patoquilla, Rabo de chucha, Montuna, Jergón, Pudridora, Víbora de pestañas, Lora, Terciopelo.

A pesar de contar con dos entidades productoras de antiveneno en Colombia, la producción es insuficiente para satisfacer la demanda (abastecimiento mínimo requerido), calculada con base en el número de víctimas al año. Es por esto que desde el año 2004 hasta la fecha, Colombia se ha declarado en emergencia sanitaria por desabastecimiento de este preciado medicamento. Ésta fue estipulada en la Resolución 002934 de 2004 y ha sido prorrogada o modificada por otras resoluciones hasta la fecha, la última de ellas, fue la Resolución 1478 de 2016 (43-45). Por ejemplo, para Colombia en el año 2015 se reportaron 4.273 casos (13) y la producción de SAP para ese mismo año fue de 13.644 y 14.089 ampollas de INS y de Laboratorios Probiol[®], respectivamente (46). Haciendo el cálculo del número mínimo de ampollas requeridas para el tratamiento de casos por accidente Bothrópico, asumiendo que todos los casos fuesen severos⁵, se hubieran requerido 25.638 ampollas de INS o 51.276 de Laboratorios Probiol[®]. En el país, se ha recurrido a importar antivenenos de países como México, Costa Rica y Brasil (47), con el propósito de aminorar la escasez. No obstante, estos no son producidos con serpientes autóctonas, lo cual podría disminuir la efectividad para neutralizar los venenos locales.

Sumado al problema de producción insuficiente, existe desabastecimiento por distribución, debido a las condiciones geográficas de Colombia, los precarios medios de acceso a zonas rurales (48, 49), la dificultad en garantizar la cadena de frío durante el transporte y el almacenamiento, así como la carencia de una cadena de distribución estatal que asegure que un evento de alta importancia en salud pública sea tratado oportunamente. En Colombia, la adquisición y distribución de los medicamentos incluidos en el Plan de Beneficios de Salud está a cargo de las Entidades Promotoras de Salud, quienes lo proveen de acuerdo a la demanda registrada por el SIVIGILA (50), pero no ha sido tenido en cuenta el sub-registro de este evento (15).

Dado lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los SAP producidos en Colombia, con el propósito de determinar si el título de anticuerpos y la capacidad neutralizante de las actividades hemolítica, coagulante y proteolítica del veneno de *B. asper*, se ven afectados en las distintas formas de presentación comercial (líquido y liofilizado). Es importante establecer que por la situación crítica de este medicamento, este es un estudio exploratorio y de carácter experimental, en el cual solo se usan técnicas *in vitro*.

⁵ El número de ampollas requeridas para tratar un caso de envenenamiento, oscila entre 2 a 6 ampollas de SAP producido por INS y 4 a 12 ampollas producidas por Laboratorios Probiol[®]

Este documento se irá desarrollando en los siguientes capítulos:

1. Problemática de investigación: se planteará el problema, la pregunta e hipótesis de investigación; se propondrán los objetivos a cumplir y se justificará el tema de estudio.
2. Marco teórico: se describirá a profundidad el accidente ofídico, la problemática epidemiológica, las generalidades de las especies de serpientes causantes del problema en salud, las generalidades sobre los venenos, la clasificación clínica del envenenamiento; las generalidades sobre la producción, distribución, costos y estudios de estabilidad del SAP y la descripción general de las técnicas utilizadas para el desarrollo metodológico del presente estudio.
3. Metodología: en este capítulo se encontrará la descripción metodológica desarrollada.
4. Resultados: se describirán y analizarán los resultados obtenidos durante el desarrollo metodológico.
5. Discusión: en este apartado se realizará un contraste entre lo hallado en la literatura y los resultados obtenidos en el estudio, con el propósito de proponer posibles acercamientos sobre la cadena de frío de los SAP.
6. Conclusiones.
7. Anexos: se encontrarán los materiales usados para el desarrollo metodológico, el Informe estadístico desarrollado por el Departamento de Estadística de la Universidad Nacional de Colombia y el aval del Comité de Ética de la Facultad de Medicina.

1 Problemática de investigación

1.1 Planteamiento del problema

En la actualidad, la administración de suero antiofídico es la única terapia efectiva para el tratamiento de las manifestaciones clínicas del accidente ofídico (4, 28-30). La epidemiología de este evento en salud, describe que los casos se presentan en áreas rurales pobres y alejadas (4, 20, 51), con escaso acceso a servicios de salud (1, 11, 12), en climas con temperaturas variables que suelen exigir cadena de frío, no siempre disponible. Esto ha favorecido que múltiples autores hayan investigado formas efectivas de disminuir la morbi-mortalidad mediante el acceso a antivenenos termoestables, a través de la liofilización de estos o el uso de estabilizantes y, de esta manera, conservar las propiedades de los antivenenos a través de la cadena de distribución (4, 7, 52-55).

La fabricación de los antivenenos debe orientarse según la epidemiología del accidente ofídico de la región geográfica afectada, usando poblaciones de serpientes autóctonas (56), dado que la morbi-mortalidad de la población humana afectada está asociada directamente con la toxicidad de los venenos locales. Para Colombia, el accidente ofídico epidemiológicamente más frecuente, es el accidente Bothrópico, causante de la mayor morbilidad; dadas sus características toxicodinámicas producen serios daños locales secundarios y las posteriores secuelas (16-18).

La producción de un antiveneno⁶ se inicia con la inmunización de animales capaces de producir grandes volúmenes de suero, tales como caballos, ovejas, camellos, entre otros. Para la inmunización se usan dosis sub-letales de veneno de una (monovalente) o varias (polivalente) especies de serpientes para producir sueros hiperinmunes, que son posteriormente purificados (22, 57) para obtener IgG's. En algunos casos, las inmunoglobulinas son fraccionadas por un proceso de digestión enzimática (22, 57-59) con el fin de disminuir los efectos adversos (reacciones alérgicas, choque anafiláctico y enfermedad del suero) (4, 55, 60, 61).

Durante el proceso de producción, los fabricantes del antiveneno utilizan medidas indirectas para inferir la toxicidad de los venenos de serpiente en humanos, mediante

⁶ En este documento se utilizarán los términos suero antiofídico o antiveneno como sinónimos.

la determinación de dosis letales en animales de experimentación (Dosis Letal 50 - DL₅₀)⁷. La potencia del antiveneno, es a su vez, determinada a través de su capacidad de neutralizar la actividad letal de los venenos (Dosis Efectiva 50 - DE₅₀) (37, 39). Sin embargo, no suele evaluarse la actividad neutralizante del antiveneno con respecto a actividades tóxicas que no necesariamente son letales. Para el caso del veneno Bothrópico, las actividades específicas más relevantes de éste, son la actividad hemolítica indirecta, proteolítica y coagulante, las cuales, si bien pueden aportar al efecto letal, contribuyen de manera importante en la producción de manifestaciones locales (necrosis y hemorragia, causantes de las secuelas posteriores) causantes de la morbilidad (11, 17, 62).

Esto significa que hay un desconocimiento del efecto de los antivenenos sobre el control de la morbilidad y las secuelas producidas por el envenenamiento Bothrópico, lo que a su vez implica que existe una debilidad en la medición de rutina de la capacidad neutralizante del SAP contra las actividades específicas de este veneno. Por esta razón, es necesario optimizar la evaluación de la capacidad neutralizante de los SAP's contra las actividades tóxicas específicas del veneno de *B. asper* en sus diferentes formas farmacéuticas, acercándolos a las temperaturas reales a las que se expondrían en las regiones en las que ocurre el accidente ofídico.

Luego de realizar la producción de los sueros hiperinmunes, la purificación y determinación de la potencia de neutralización (DE₅₀) al suero antiofídico se le puede modificar su forma farmacéutica (liofilización o secado por calor) con el fin de preservar las IgG's dado que históricamente se ha considerado que los antivenenos líquidos pueden verse afectados al exponerse a cambios de temperatura (63). En consecuencia, la liofilización tiene como ventaja no requerir cadena de frío (4, 7, 55, 60, 61) y como desventaja que las inmunoglobulinas, durante el proceso, pueden desnaturalizarse y perder parcialmente la potencia de neutralización del veneno (7, 61, 63). Se han investigado métodos más efectivos de conservación de las IgG's, tales como la liofilización por dehidrocongelación y estabilización de proteínas mediante la adición de azúcares, sin que se vean afectadas por condiciones físicas (temperatura, pH, etc.) o químicas durante el procesamiento o ante la exposición ambiental (7, 25, 52, 58, 64-66). Estas investigaciones están orientadas a resolver la dificultad para

⁷ DL₅₀ es una medida de la capacidad de los venenos de causar la muerte en una población seleccionada de animales de experimentación, usualmente ratones (37, 39).

garantizar la cadena de frío y por ende la distribución del antiveneno a áreas rurales alejadas, que geográficamente presentan climas con temperaturas extremas.

Se han realizado estudios para evaluar la estabilidad de los sueros antiofídicos polivalentes en algunos países como Brasil y Costa Rica, la mayoría de ellos, buscando mejorar la termoestabilidad y la preservación de las IgG's presentes en el antiveneno por medio del uso de azúcares, calcio, aluminio o la modificación de las técnicas de liofilización, entre otros. Los resultados muestran algo en común, y es que al exponer los antivenenos a altas temperaturas, se desarrolla una turbidez por la formación de agregados proteínicos de pesos moleculares elevados; sin embargo, la capacidad de neutralizar las actividades letales de los venenos no presenta diferencias estadísticas significativas entre los antivenenos conservados a temperaturas recomendadas por el productor vs aquellos sometidos a temperaturas extremas (52, 54, 67-69).

Para el caso de Colombia, se realizaron dos estudios, en 1994, Ramírez, et al. determinaron la capacidad neutralizante de la actividad letal (DE_{50}) de una mezcla de venenos de *B. asper-atrox* y en 1995, para una mezcla de venenos de *Crotalus durissus cumanensis*. En ambos estudios se documentó que el Suero Antiofídico Polivalente líquido (SAP) del Instituto Nacional de Salud (INS) sólo disminuye su potencia de neutralización a una temperatura máxima de 16°C, durante un periodo de almacenamiento mayor o igual a tres años (70, 71). No obstante, en estos estudios no se tuvieron en cuenta actividades específicas de los venenos, como por ejemplo la actividad hemolítica indirecta, coagulante o proteolítica. Tampoco fueron consideradas las temperaturas promedio del país (T° media: 22,85°C y la T° máxima de 36,3°C (72))⁸, las temperaturas elevadas extremas o los cambios fisicoquímicos durante el almacenamiento que representan condiciones de exposición que potencialmente pueden ocurrir una vez el producto sale de la planta de producción. Adicionalmente, no se evaluaron intervalos de tiempo de almacenamiento más cortos, teniendo en cuenta que la fecha de expiración para el SAP líquido, se establece a los 3 años de producido⁹ (38). En el caso de Laboratorios Probiol®, se desconocen los estudios de termoestabilidad del mismo.

⁸ El estudio realizado por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) para el período de 1971-2010, analizó el comportamiento promedio y las tendencias de largo plazo de la temperatura máxima media para las regiones hidroclimáticas de Colombia, arrojando como resultado que la temperatura media fue de 22,85°C y la máxima de 36,3°C (72)

⁹ La OMS estipuló que los antivenenos líquidos tienen una expiración a los tres años y los liofilizados a los cinco años (38). Múltiples autores han descrito que dependiendo de la forma farmacéutica y la forma de almacenamiento del antiveneno hay una tasa de degradación de las IgG's posterior a estos intervalos de tiempo.

Por otro lado, la reglamentación colombiana relacionada a la estabilidad de medicamentos biológicos se implementó a través de la Resolución 2514 de 1995 la cual fue posteriormente actualizada mediante la Resolución 3690 de agosto de 2016, en la que se describen los tipos de estudios de estabilidad a los cuales se debe someter este tipo de productos y los requisitos que deben presentar los fabricantes para obtener el registro INVIMA. Los productores de los antivenenos se deben basar en los resultados de los estudios de estabilidad natural, por un período de doce meses. Para aquellos productos que deben ser almacenados en refrigerador, se deben evaluar a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y para aquellos que no requieren refrigeración, se deben analizar a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. No obstante, no se exige la realización de estudios de estabilidad acelerada en las que se retan los medicamentos a temperaturas extremas o fuera de las condiciones de almacenamiento. La resolución hace referencia exclusivamente a pruebas de termoestabilidad para las vacunas y no hace mención a los antivenenos (73).

Esta tesis se propone evaluar los efectos producidos por las variaciones de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la características físico-químicas, el título de IgG's y la capacidad neutralizante de los SAP's producidos en Colombia, de las actividades hemolítica indirecta, coagulante y proteolítica del veneno de *B. asper*, con el fin de hacer una aproximación a las condiciones reales de almacenamiento en el país, sugerir formas óptimas de preservación de este medicamento y así ofrecer recomendaciones para mejorar el acceso a quienes más lo necesitan.

1.2 Justificación

En el contexto de la Maestría en Toxicología, de la Universidad Nacional de Colombia, esta investigación responde a cuatro argumentos específicos, en las que se fundamenta su pertinencia. En adelante, se expondrán estos argumentos, teniendo en cuenta la necesidad imperiosa de ofrecer recomendaciones a mediano y largo plazo relacionadas con mejoras en la cadena de frío y, por ende, en la distribución del SAP.

En primera instancia, es necesario resaltar que el único tratamiento efectivo para el accidente ofídico es el uso del antiveneno (4, 28-30). Por lo tanto, se espera que este producto cuente con los más altos estándares de calidad y producción de acuerdo a las características epidemiológicas, geográficas y socioeconómicas de cada país. Esto se logra mediante procesos validados científicamente por cada fabricante, avalados y

supervisados por instituciones nacionales de vigilancia, en el caso de Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos (INVIMA). Los estándares de calidad establecidos, exigen que se evalúe la dosis de neutralización de la letalidad efectiva (DE_{50}) (74, 75), lo que se traduce en la evaluación de la efectividad del antiveneno para disminuir la mortalidad en los individuos afectados. Sin embargo, la toxicidad de los venenos de serpientes no solo puede causar mortalidad en la población, sino que además causa manifestaciones locales que posteriormente dejan secuelas, es decir, causan altas tasas de morbilidad¹⁰ (10).

Las medidas de la DL_{50} y la DE_{50} , específicamente para los antivenenos, son medidas que infieren indirectamente la capacidad letal de los venenos y la capacidad de neutralización del antiveneno en los humanos (74). No obstante, están dirigidas a evaluar la mortalidad, por esta razón es fundamental ampliar el conocimiento sobre la capacidad de neutralización de actividades específicas de los venenos relacionadas con la fisiopatología de las manifestaciones locales. Así, se podría aminorar la morbilidad en los individuos.

En Colombia, el género de serpientes que produce mayor envenenamiento es *Bothrops*, principalmente la especie *B. asper*, la cual causa una mortalidad que epidemiológicamente no refleja la gravedad de este evento¹¹, pero sí una gran morbilidad en la población (16-18, 76). Por este motivo, evaluar la capacidad de neutralización de actividades específicas de este veneno (hemolítica indirecta, coagulante y proteolítica) en el SAP producido en el país, aporta conocimiento invaluable sobre la neutralización de las actividades del veneno causantes de la morbilidad y las secuelas posteriores.

En segunda instancia, es fundamental ampliar el conocimiento de la estabilidad térmica de los SAP's en un país como Colombia, donde existen dificultades en el acceso a servicios de salud y garantía del suministro ininterrumpido de energía eléctrica que impiden una cadena de frío estable. Así mismo, se suman factores orográficos y ambientales (pisos térmicos y variabilidad climática (72)) que pueden afectar la conservación de este medicamento. En consecuencia, los antivenenos producidos en este país deben contar con estudios de termoestabilidad en condiciones adversas o no

¹⁰ Se estima que 1.8-2.7 millones de personas al año desarrollan enfermedad clínica grave (envenenamiento) después de la mordedura de serpiente (10).

¹¹ En el año 2016 se presentaron 4.636 casos de accidente ofídico, de los cuales 3.022,6 (65,2%) casos corresponden al género *Bothrops*. La mortalidad por accidente ofídico fue de 31 y 19 casos, respectivamente (76).

ideales que aporten información detallada sobre las variaciones de su composición con respecto a la temperatura de almacenamiento. Sin embargo, hay muy poca información sobre la ejecución de estudios de esta índole y no hay registros sobre estudios de termoestabilidad acelerada. Adicionalmente, es pertinente mencionar que la reglamentación colombiana para la fabricación y registro INVIMA no exige estudios de estabilidad acelerada, en los que se expone a estos medicamentos a condiciones extremas o fuera de sus rangos de temperaturas para su almacenamiento (75, 77).

En tercera instancia, la metodología de esta investigación empleó estudios *in vitro*, debido a que es necesario medir, en una fase inicial, el comportamiento de la neutralización de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante de los SAP's a temperaturas extremas. De esta manera se evitó el uso de animales de laboratorio, siguiendo además la tendencia científica internacional que busca disminuir el uso y maltrato de animales de experimentación. El diseño de esta investigación se orientó en las recomendaciones de los principios de las 3R's (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) (74, 78)¹² antes de realizar estudios *in vivo*. Posteriormente, se podría ampliar en una segunda versión, estudios que incluyan dosis de neutralización de letalidad.

Por último, se utilizó un lote para cada forma farmacéutica de los SAP's producidos en Colombia, teniendo los siguientes puntos a consideración:

1. Las instituciones que producen antivenenos, por ejemplo INS, cuentan con un suero hiperinmune que fabrican a partir de una semilla de venenos que, dentro de los procesos de calidad interna, garantizan un perfil estándar en los pools utilizados para las inmunizaciones. Si bien esta semilla hace parte del secreto industrial del producto, es un estándar que garantiza que las diferencias entre lotes sean las mínimas posibles y bioequivalencia del perfil inmunológico y neutralizante de la actividad letal, según declaró Carlina Castillo, INS¹³.

¹² Se ha replanteado la necesidad de utilizar animales de experimentación en la evaluación de los antivenenos, sobre todo la necesidad de reducir tanto el número de animales utilizados, dado el sufrimiento inherente causado por los venenos, la toxicidad y los procesos de neutralización de las mismas (74, 78). OMS ha indicado algunas pautas en relación a los ensayos de neutralización *in vivo* e *in vitro*, que ponen especial énfasis en promover el principio de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) en el desarrollo de antivenenos y control de calidad.

¹³ (Castillo, M.C. [Comunicación personal]. 6 de septiembre de 2017.

2. Los SAP's son medicamentos que han sido catalogados por el INVIMA como medicamento vital no disponible (79)¹⁴, lo que está vinculado al estado de emergencia sanitaria presente en el país (durante la cual se desarrolló esta investigación), así como la difícil consecución de varios lotes, dado que la producción de lotes no es constante, y una vez se liberan los viales, son distribuidos por las Entidades Promotoras de Salud (EPS) a las Instituciones Prestadoras de Salud (IPS) que requieren un stock permanente del SAP (50).

Cabe señalar que esta investigación aporta estudios que permiten evaluar la efectividad de los antivenenos expuestos a temperaturas de almacenamiento que se asemejan a las observadas en las zonas rurales colombianas, donde ocurre el accidente ofídico. De esta manera se podrían proyectar posibles soluciones que permitan sortear las dificultades que se presentan en el tratamiento de esta enfermedad. Además, esta investigación aporta a la comunidad académica y científica una perspectiva tangible de la situación actual de este medicamento, ofrece avances importantes en el conocimiento de la neutralización de actividades específicas del veneno de *B. asper*, proyectando una aproximación sobre el control de la fisiopatología local del envenenamiento y las posibles secuelas, lo cual hace parte de las demandas urgentes en las agendas de indagación en Toxinología y Salud Pública en la actualidad del país.

1.3 Pregunta de investigación

¿Los SAP's producidos en Colombia mantienen sus características fisicoquímicas, los títulos de IgG y capacidad de neutralización para las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante del veneno de *B. asper*, al modificar su temperatura de almacenamiento por períodos de 3 y 6 meses?

1.4 Hipótesis de investigación

La variación en la temperatura de almacenamiento del SAP no afecta la capacidad de neutralización de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante del veneno de *B. asper*, los títulos de IgG, ni sus características fisicoquímicas por períodos de 3 y 6 meses.

¹⁴ "Es un medicamento indispensable e irremplazable para salvaguardar la vida o aliviar el sufrimiento de un paciente o un grupo de pacientes y que por condiciones de baja rentabilidad en su comercialización, no se encuentra disponible en el país o las cantidades no son suficientes". Decreto 481, artículo 2.

1.5 Hipótesis alternativa

La variación en la temperatura de almacenamiento del SAP afecta la capacidad de neutralización de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante del veneno de *B. asper*, los títulos de IgG, ni sus características fisicoquímicas por períodos de 3 y 6 meses

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la variación en la temperatura de almacenamiento sobre las características físicas, el título de anticuerpos y la capacidad neutralizante de las dos presentaciones comerciales de los antivenenos polivalentes producidos en Colombia, como resultado del almacenamiento durante periodos de 3 y 6 meses sobre de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante del veneno de *Bothrops asper*.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar las características físico-químicas al modificar, mediante liofilización, la forma farmacéutica comercial líquida del antiveneno polivalente producido por el INS.
2. Caracterizar los cambios fisicoquímicos de las presentaciones comerciales de los antivenenos polivalentes producidos en Colombia, como resultado del almacenamiento a diferentes temperaturas (4°C, 22°C y 45°C), por períodos de 3 y 6 meses.
3. Determinar la capacidad neutralizante de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante, del veneno de *Bothrops asper*, de las presentaciones comerciales de los antivenenos polivalentes producidos en Colombia, como resultado del almacenamiento a diferentes temperaturas (4°C, 22°C y 45°C), por períodos de 3 y 6 meses.
4. Determinar el efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas (4°C, 22°C y 45°C) por períodos de 3 y 6 meses, de las presentaciones comerciales de antivenenos polivalentes producidos en Colombia, en el título de anticuerpos neutralizantes para el veneno de *Bothrops asper*.

2 Marco Teórico

2.1 Definición de accidente ofídico

El accidente ofídico u ofidiotoxicosis se define como la lesión causada por la mordedura de serpientes que inoculan a la víctima diferentes toxinas, las cuales son potencialmente capaces de causar un cuadro clínico de alteraciones fisiopatológicas locales y/o sistémicas (80-82).

2.1.1 Comportamiento mundial del accidente ofídico

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública común pero desatendido, especialmente en las regiones rurales más pobres de África subsahariana, Asia y América Latina, que genera una importante morbilidad y mortalidad asociada (4, 6, 28, 83-86). Chippaux, en 1998, estimó que ocurren alrededor de 5'400.000 mordeduras anuales en el mundo, de las que aproximadamente 2'500.000 presentan envenenamiento y 125.000 mueren (1, 11). Kasturiratne et. al., en 2008, estimaron que el número de envenenamientos anuales en el mundo oscilan entre 421.000 a 1'841.000, y las muertes entre 20.000 a 94.000 (1, 85). Adicionalmente, se estima que se han presentado hasta 400.000 amputaciones como secuelas de éstos (6, 20). Para América Latina, según el estudio de Kasturiratne et. al. se estiman desde 80.329 hasta 129.084 casos anuales de envenenamiento, y la muerte de 540 a 2.298 personas por esta causa (85).

Cabe mencionar que estos datos pueden ser inexactos, pues existe un sub-registro de los datos recolectados en las regiones afectadas, dado por las características económicas y sociales de estos países: pobreza, escaso acceso a servicios de salud, ineficacia de los gobiernos para tener sistemas de reporte eficientes, entre otros (87). Estudios realizados en zonas rurales de Bangladesh afirman que sólo el 3% de las víctimas por mordedura de serpiente asisten a centros de salud (87, 88), mientras que en Nigeria y Kenia asisten el 8,5% y el 27%, respectivamente (87, 89, 90). Es común ver, entonces, que las víctimas generalmente optan por los tratamientos tradicionales (según las creencias populares locales) aumentando la morbi-mortalidad (87). Pero esta situación se asocia a que los servicios de salud no suelen ser cercanos a las áreas rurales.

El comportamiento epidemiológico que se ha descrito internacionalmente, y en especial para América Latina, explica que entre un 10 al 20% de las mordeduras ocurren dentro o en las proximidades del domicilio, asociándose principalmente a las actividades agrícolas (85-90% de los casos) (5, 42, 91). El accidente ofídico afecta a adultos jóvenes entre los 15 a 45 años de edad, siendo el 54% de los casos, específicamente a los hombres (76%). Pero existe un número significativo de los casos que ocurren en los niños (30%). En cuanto a la región anatómica de las mordeduras, el 70% de los casos ocurren en las extremidades inferiores (3, 5, 42).

Es importante mencionar que, en América Latina, se ha observado un comportamiento particular relacionado a las fluctuaciones de la temperatura y las precipitaciones, ya que un número inusualmente alto de mordeduras de serpiente ocurre durante las fases frías y calientes del Fenómeno del Niño – Oscilación del Sur (El Niño - Southern Oscillation, en sus siglas del inglés ENSO). En un estudio realizado en Costa Rica, se encontró que los accidentes ofídicos se agrupan en las zonas de tierras bajas más húmedas, los que están ligados a las zonas de población con mayor pobreza (92). Además hay una correlación directa entre la etología de las serpientes y el cambio de temperatura que se expresa, durante la fase caliente, con un aumento de la incidencia de mordeduras como resultado de mayor actividad de ellas, asociada al forrajeo¹⁵ (93-95) y al período de reproductividad de las mismas (92, 96). Sin embargo, durante la fase fría, las mordeduras de serpiente podrían acrecentarse debido a una serie de factores que afectan su comportamiento, a saber: el alimento de las presas de los ofidios aumenta derivado de los cambios climáticos, haciendo que se incremente el número de éstas. Además, tanto las serpientes como las presas se desplazan a lugares que conservan mayor calor, específicamente a las zonas de alimentación, para resguardarse, provocando un contacto cercano con los lugares que habita el ser humano (92, 97, 98).

2.1.2 Comportamiento del accidente ofídico en Colombia

En Colombia, el comportamiento epidemiológico se notifica a través del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), el cual se implementó en el 2004 mediante la Circular 092 del Ministerio de la Protección Social (18). Dado que la

¹⁵ Forrajeo en Biología se define como la forma en que un organismo se alimenta. Incluye las características de lo que come, el tiempo y la forma, así como las actividades relacionadas con la obtención del alimento y como es afectada su actividad alimenticia por condiciones del medio ambiente y/o por otros organismos (93-95).

implementación de este sistema ha sido progresiva, se considera que el aumento de casos visualizado en la figura 2-1 se relaciona con un reporte más adecuado del evento y no con una disminución en el sub-registro de los datos (99).

Figura 2-1. Consolidado de reporte de accidente ofídico en Colombia por SIVIGILA de los últimos 10 años.

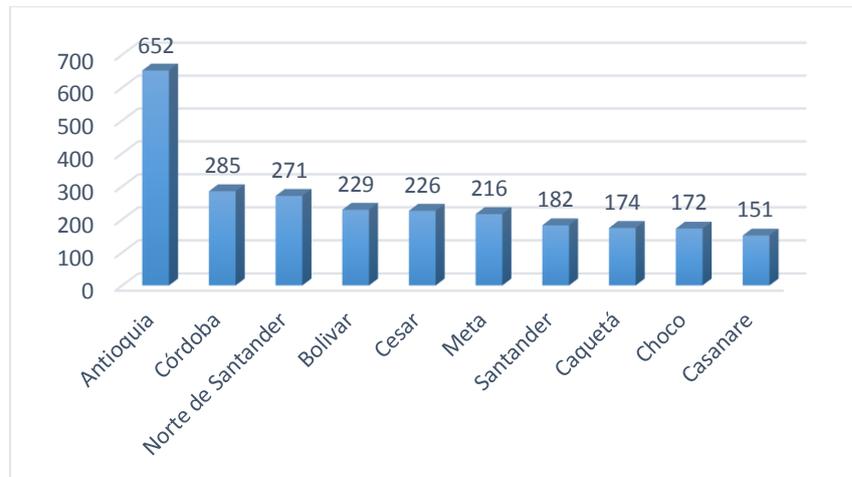


Fuente: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud, Colombia (100). Elaboración propia.

En el año 2016, se notificaron 4.636 casos de los que 31 fueron fatales, con una incidencia nacional de 8,7 casos por 100.000 habitantes. Se presentaron con mayor frecuencia en hombres (72,9 %), principalmente en áreas rurales (77,2%), lo cual se ha relacionado con las actividades ocupacionales de la población afectada (76). La edad media fue de 33,3 años, la mediana 30 años y la moda es 16 años, el 10,1% de los casos se presentaron en personas menores de 10 años y los grupos poblacionales más afectados fueron los de 15 a 24 años. La actividad más frecuente al momento del accidente es la agricultura (42,5%), oficios domésticos (15,6%) y caminar por senderos abiertos (14,7%) o por trocha (7,3%) (76).

Durante este mismo año, los diez departamentos que notificaron un mayor número de casos reportados (60,1%) fueron: Antioquia, Córdoba, Norte de Santander, Bolívar, Cesar, Meta, Santander, Caquetá Chocó, y Casanare, como se muestra en la figura 2-2 (76).

Figura 2-2. Número de casos de accidente ofídico en las diez entidades territoriales con mayor notificación en Colombia



Fuente: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2016 (76). Elaboración propia.

En la tabla 2-1 se observa que las regiones con mayor incidencia por 100.000 habitantes corresponde a la zona de Amazonía, Orinoquía y la Costa Atlántica, que corresponde a las zonas del país donde anualmente se evidencia aumento de la temperatura entre 0,23°C hasta 3,8°C/100 años (72) y que se ha correlacionado con los cambios de la temperatura causados por el ENSO (92, 96).

Tabla 2-1. Incidencia de casos de accidente ofídico según región geográfica.

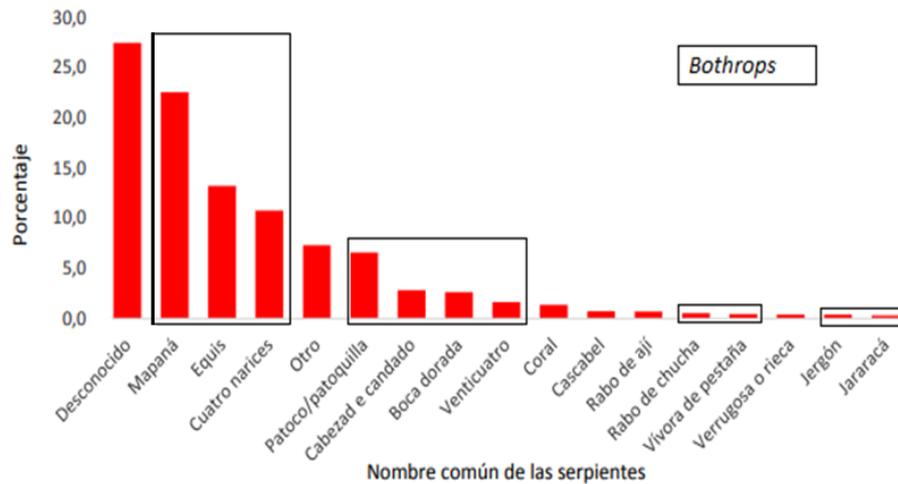
Casos, incidencias y riesgos relativos de los accidentes ofídicos notificados por región de procedencia, Colombia, semanas epidemiológicas 01-48, 2016

Región	Casos	Porcentaje	Incidencia x 100000 hab.	RR	LI IC 95%	LS IC 95%
Central	1046	24,6	4,7	Referencia		
Costa pacífica	499	11,8	6,0	1,3	1,2	1,6
Oriental	518	12,2	11,0	2,3	1,9	2,5
Costa Atlántica	1247	29,4	11,8	2,5	2,1	2,7
Orinoquía	531	12,5	31,6	6,7	5,2	7,3
Amazonía	404	9,5	36,4	7,8	6,9	8,3
Total	4245		8,7			

Tomado de: León LJ. Informe del evento accidente ofídico hasta el periodo epidemiológico XIII Colombia, 2016. Instituto Nacional de Salud, 2016 (76).

La identificación del género de las serpientes agresoras reportado en el informe del evento accidente ofídico, fue del 65,2% para el género *Bothrops*, el 26,4% sin identificar y 3,6% corresponde a Otro, el 68 % de los casos reportados fueron causados por vipéridos. Adicionalmente la identificación de las serpientes pudo hacerse mediante el nombre común, de las cuales, las más frecuentes son Mapaná, Equis y Cuatro narices (género *Bothrops*) (76).

Figura 2-3. Identificación de la serpiente agresora por su nombre común en Colombia



Fuente: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2016 (76). Elaboración propia.

2.1.3 Generalidades sobre las especies causantes del accidente ofídico en Colombia

Los ofidios son reptiles de cuerpo alargado, sin miembros locomotores, carecen de párpados y oídos, pertenecen al orden *Ophidia* (del griego *ophis* - *opheos* (ὄφις, ὄφεως) cuyo sinónimo en latín es *Serpentum* (de *serpens* – *serpentis* = serpiente). Las serpientes pertenecen al suborden *Serpentes*, clase *Reptilia* (101), las cuales tienen la capacidad de habitar en diferentes ecosistemas, exceptuando los polos terrestres y en las regiones de nieves perpetuas (3, 102, 103). En el mundo existen aproximadamente 3.000 especies de serpientes distribuidas en aproximadamente 465 géneros (104).

En Colombia se encuentran alrededor de 272 especies, de las que aproximadamente 49 de ellas son potencialmente peligrosas para el ser humano. Éstas pertenecen a cuatro familias (*Viperidae*, *Elapidae*, *Colubridae* y *Dipsadidae* (105)), nueve géneros, y se encuentran desde los 0 hasta los 3000 msnm. Están ampliamente distribuidas en el territorio nacional. Usualmente los accidentes de importancia clínica epidemiológica se presentan por debajo de los 1300 msnm.(106, 107).

Las especies de serpientes de importancia médica en Colombia están agrupadas en 4 familias, mencionadas anteriormente (105). De éstas, las familias *Colubridae* y *Dipsadidae* presentan algunos reportes de caso por su toxicidad, pero se considera que no representan un real peligro para el ser humano, excepto por *Philodryas viridissima*

(Lora) (108) de hábitat delimitado en la Amazonía, y cuyo accidente sí podría generar envenenamiento. La familia Viperidae ha sido reportada como la más significativa desde el punto de vista médico en Colombia. Se ha descrito que el género *Bothrops* es el responsable del 90-95% de los accidentes ofídicos, siendo *Bothrops asper*, 70%, *Bothriechis schlegelii*, 11% (109) y *Porthidium nasutum*, 10%. En términos geográficos, *Bothrops asper* ocasiona más del 80% de las mordeduras en el noroccidente del país; Mientras que *Bothrops atrox* causa la mayoría de accidentes en el suroriente del país (16, 110).

La familia *Elapidae* está representada por los géneros *Micrurus* e *Hydrophis* (105) que en Colombia también son causantes de envenenamiento, se han reportado 1,2% y 0.1%, respectivamente (13).

2.1.4 Clasificación del envenenamiento según el género de la serpiente

2.1.4.1 Envenenamiento Bothrópico

El 90 a 95% de los accidentes ofídicos en Colombia son producidos por el género *Bothrops*, principalmente por las especies *B. atrox*, *B. asper* y *B. punctatus* pero también se han evidenciado accidentes por *Porthidium nasatum*, *P. lansbergii* y *Bothriechis schlegelii* (16-18).

En el veneno de serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, generalmente se encuentran hemorraginas, miotoxinas, proteasas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, kalicreína, metaloproteinasas y Fosfolipasa A₂. Las cuales favorecerán cuadros hemorrágicos, edematizantes y de daño tisular severo (11, 17, 62, 111, 112).

Los envenenamientos por *Bothrops* se caracterizan por alteraciones en la coagulación mediada por enzimas coagulantes y procoagulantes, tales como serina-proteinasas tipo trombina y metaloproteinasas que activan los factores II y X de la cascada de coagulación. Éstas dos tienen una fuerte acción coagulante que consume el fibrinógeno, favoreciendo la desfibrinación y coagulación intravascular diseminada (CID) (91, 113). También se ha descrito que las metaloproteinasas tienen mecanismos de daño contra la microvasculatura, ya que su blanco de acción son los componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular (114).

Se ha descrito que la trombocitopenia está mediada por botrocetina y la aspercetina que se unen al factor de von Willebrand e inducen agregación plaquetaria, produciendo, *in vivo*, un cuadro de trombocitopenia trombótica (91, 113, 115-118).

Otro efecto del envenenamiento por *Bothrops* es la miotoxicidad. Ésta se encuentra principalmente mediada por las Fosfolipasas A_2 , que inducen daño al afectar la integridad de la membrana plasmática del músculo esquelético, a través de la hidrólisis de fosfolípidos, lo que promueve el flujo de calcio hacia el medio extracelular, llevando al músculo a la apoptosis celular (62, 91, 119, 120).

Las manifestaciones clínicas del accidente Bothrópico pueden clasificarse en leve, moderado o severo (17, 18, 42).

Tabla 2-2 Clasificación de severidad del Accidente Bothrópico

Clasificación	Local	Sistémico
Leve	Edema: 1 a 2 segmentos de la extremidad, sin compromiso del tronco. Diferencia del diámetro menor o igual a 4cm. No necrosis. Flictenas escasas o ausentes. Sangrado local escaso o ausente	NO: sangrado, ni compromiso hemodinámico, ni complicaciones. Valor de TP, TTP normal o prolongado.
Moderado	Edema: 2 a 3 o más segmentos corporales, sin compromiso del tronco. Diferencia del diámetro mayor a 4cm. Hemorragia local activa Flictenas hemorrágicas No necrosis	Gingivorragia, epistaxis, hematuria, u otro orificio corporal. No compromiso hemodinámico ni de otros órganos. TP, TTP prolongado
Severo	Edema de 3 o más segmentos con compromiso del tronco. Mordedura de cara o cuello Necrosis Ofidio mayor a 1metro (tamaño del animal agresor)	Compromiso hemodinámico Complicaciones como CID, injuria renal aguda, sangrado del SNC. TP, TTP prolongado

Fuentes: Peña, L.M. Accidente Ofídico Bothrópico y Lachésico En: Peña, L.M, Zuluaga A.F., editores. Protocolos de manejo del paciente intoxicado. Primera ed. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; 2012: 226-33. Y de Walteros D, Paredes A. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Accidente ofídico. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis; 2012: 1-28. Elaboración propia.

El tratamiento del accidente ofídico será según la clasificación de severidad del envenenamiento:

Tabla 2-3. Manejo médico según clasificación de severidad del accidente Bothrópico

Número de ampollitas de antiveneno según el grado de envenenamiento y la casa productora		
Leve	Moderado	Severo
2 ampollitas de SAP del INS o 4 ampollitas de SAP de Probiol, Bioclón, o del Instituto Clodomiro Picado	4 ampollitas de SAP del INS o 8 ampollitas de SAP de Probiol, Bioclón, o del Instituto Clodomiro Picado	6 ampollitas de SAP del INS o 12 ampollitas de SAP de Probiol, Bioclón, o del Instituto Clodomiro Picado

Tomado de Peña, L.M. Accidente Ofídico Bothrópico y Lachésico En: Peña, L.M, Zuluaga A.F., editores. Protocolos de manejo del paciente intoxicado. Primera ed. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; 2012. p. 226-33.

2.1.4.2 Envenenamiento Lachésico

En Colombia, el accidente ofídico causado por este género representa el 2% y las especies que se encuentran en el país son *Lachesis muta* y *Lachesis acrochorda*. Su veneno presenta mecanismos fisiopatológicos similares al veneno Bothrópico (necrolítico, edematoso, anticoagulante, hemorrágico) y además posee actividad neurotóxica debida a una quinogenasa, que produce activación del sistema nervioso autónomo parasimpático, ocasionando un síndrome de excitación vagal (17, 18, 91, 121).

Este veneno, además, produce de manera indirecta kalicreína y prekalicreína (Factor de Fletcher), que provocan aumento del peristaltismo y, de manera directa, producen bradiquininas, que son, también, responsables de la hipotensión, diarrea y bradicardia. Por ser un ofidio muy grande (hasta 4 metros un ejemplar adulto) se considera siempre un caso grave (17, 91, 121, 122).

Tabla 2-4. Clasificación de severidad del Accidente Lachésico

Clasificación	Local	Sistémico
Todos los accidentes por <i>Lachesis muta</i> son clasificados como SEVEROS	Edema de 3 o más segmentos con compromiso del tronco. Mordedura de cara o cuello Necrosis Ofidio mayor a 1 metro (tamaño del animal agresor) Pueden presentar adicionalmente síntomas neurológicos como: <i>Fascies miasténicas como ptosis palpebral uni o bilateral, flacidez muscular de la cara, oftalmoplegia, parálisis velopalatina, disfagia, así como síntomas parasimpático-mimética como náuseas, bradicardia y dolor abdominal.</i>	Compromiso hemodinámico Complicaciones como CID, injuria renal aguda, sangrado del SNC. Cardiotoxicidad TP, TTP prolongado

Tomado de Peña, L.M. Accidente Ofídico Bothrópico y Lachésico. En: Peña, L.M, Zuluaga A.F., editores. Protocolos de manejo del paciente intoxicado. Primera ed. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; 2012. p. 226-33. Y de Walteros D, Paredes A. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Accidente ofídico. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis; 2012. p. 1-28.

2.1.4.3 Envenenamiento Crotálico

En Colombia los casos de ofidismo que involucran serpientes de cascabel comprenden el 1% de los casos y son producidos por *Crotalus durissus spp* (123). El veneno de la cascabel sudamericana, posee una acción fundamentalmente neuro-miotóxica, originando cuadros clínicos frecuentemente severos, que están mediados principalmente por la Crototóxina, la cual es un complejo bimolecular formado por una fosfolipasa A₂ y por una proteína no tóxica denominada crotapotina (91, 112, 124, 125). El mecanismo tóxico de la Crototóxina está mediado por su habilidad de unirse a la membrana plasmática de la terminal axonal presináptica y a la membrana de las células musculares, provocando la parálisis flácida (112, 125).

Tabla 2-5. Clasificación de la severidad del accidente Crotálico

Clasificación	Local	Sistémico
Leve	Dolor, edema y escaso sangrado en el sitio de inoculación. Lipotimias, mareos, visión borrosa, fotofobia. Orina ligeramente colúrica.	NO: sangrado, ni compromiso hemodinámico, ni complicaciones.
Moderado	Dolor, edema moderados en el miembro herido	Midriasis paralítica, diplopía, ptosis palpebral, disartria, fasciculaciones musculares, debilidad muscular,

Severo	Dolor, edema moderado en el miembro herido.	Parálisis flácida generalizada, oftalmoplegia grave, ptosis palpebral grave, ptosis mandibular, fascies inexpresiva (fascies neurotóxica de Rosenfeld) por parálisis de los músculos faciales, mialgias graves generalizadas. Dificultad para la deglución, sialorrea, afonía, insuficiencia respiratoria, falla renal aguda por mioglobinuria orina oscura (mioglobinuria)
--------	---	---

Fuentes: Ayérbe S, Rodríguez JR. Accidentes por animales venenosos y plantas tóxicas, Accidente ofídico Crotálico. En: Correa LF, Berdejo JP, Mora VH, Sánchez DM, Gutiérrez M, editores. Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas Grupo de Atención de Emergencias y Desastres. Bogotá D. C., Colombia: Imprenta Nacional de Colombia; 2008: 284-6. Y de Walteros D, Paredes A. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Accidente ofídico. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis; 2012: 1-28. Elaboración propia.

El manejo del accidente Crotálico se debe suministrar de acuerdo a clasificación de severidad:

Tabla 2-6. Manejo médico según clasificación de severidad del accidente Crotálico

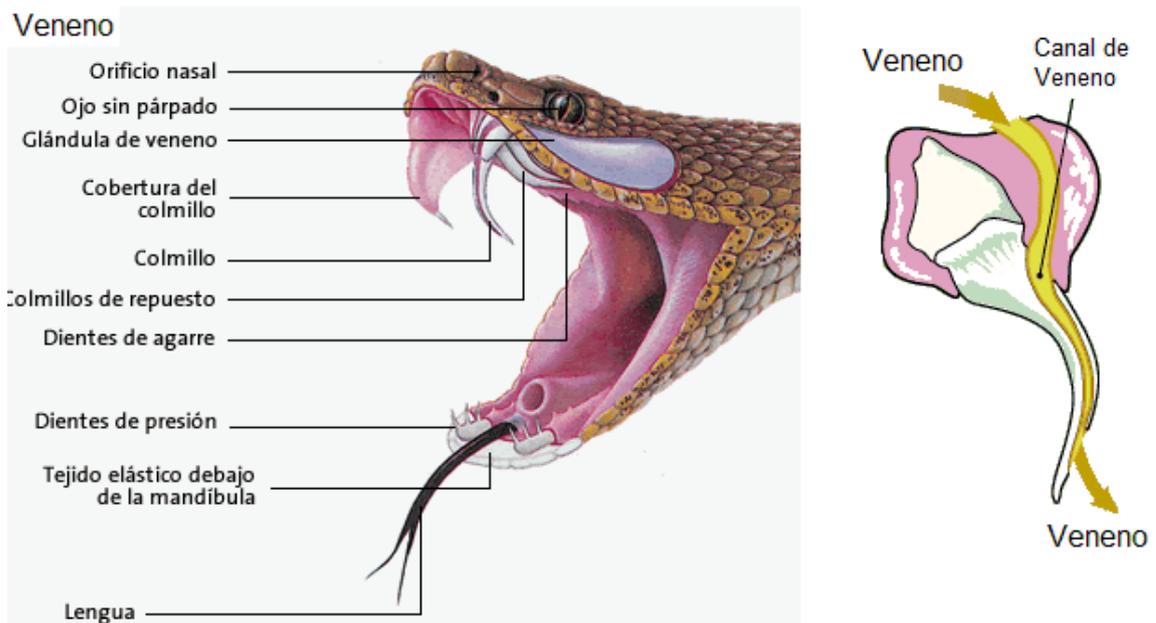
Número de ampollitas de antiveneno según el grado de envenenamiento y la casa productora		
Leve	Moderado	Severo
6 ampollitas de SAP del INS o 12 ampollitas de SAP de Probiol.	8 ampollitas de SAP del INS o 16 ampollitas de SAP de Probiol.	10 ampollitas de SAP del INS o 20 ampollitas de SAP de Probiol.

Tomado de Peña, L.M. Accidente Ofídico Crotálico En: Peña, L.M, Zuluaga A.F., editores. Protocolos de manejo del paciente intoxicado. Primera ed. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; 2012: 240-42 (126).

2.2 Generalidades sobre los venenos de serpientes

El veneno de serpiente es una secreción compuesta por proteínas enzimáticas y tóxicos, que tiene como fin biológico inmovilizar a la presa y facilitar su digestión (35, 127-131). Éste es sintetizado y almacenado en las glándulas de veneno de la serpiente, las cuales se encuentran cubiertas por un músculo que se activa cuando el animal inyecta el veneno en la presa (23).

Figura 2-4. Ejemplo del aparato venenoso de las serpientes pertenecientes a la familia Viperidae



Modificado de EcologiaHoy. Serpientes venenosas. Publicado en EcologiaHoy.com, 2013 [citado 30 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.ecologiahoy.com/serpientes-venenosas> y de Ali J. Modern Aspects of Snake Venom. Publicado en LinkedIn SlideShare. 2015 [citado 2016 30/03]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/alijishan786/modern-aspects-of-snake-venom> (132, 133).

El veneno representa una innovación fundamental en la evolución de los ofidios, ya que manifiesta un rasgo de adaptación trófica (131) crucial para el éxito de forrajeo (93-95). Sin embargo, se ha considerado que las causas evolutivas para que ocurra la variabilidad en la composición del veneno son muy variadas. Por ejemplo, la composición del veneno se modifica en todos los niveles taxonómicos, entre las diferentes familias, debido a evolución molecular acelerada que pueden incluso ocurrir en un solo individuo (134, 135). Hay algunos estudios que apoyan firmemente la idea de que la variación de la composición del veneno refleja la adaptación local (geográfica) para alimentarse de diferentes presas (61, 131, 134, 136-138). En consecuencia, la variabilidad del veneno exige que los antivenenos producidos, sean específicos de la zona geográfica en la que ocurren los accidentes ofídicos (22, 61, 134, 139, 140). También hay estudios que han mostrado que el contenido y la capacidad de daño del veneno, según la edad de la víbora, es variable. Se observó que los especímenes jóvenes pueden producir cantidades más pequeñas pero más potentes o, también, que el veneno de viboreznos puede tener un mecanismo de acción tóxico que difiere al evidenciado en el de la serpiente adulta (91, 138, 141, 142).

Se ha descrito que puede haber variabilidad del veneno según el sexo del animal. En el estudio de Menezes, M.C., se tomó una camada de 18 viboreznos nacida y criada

de *B. jararaca* en cautiverio, al veneno de éstos se les realizaron técnicas electroforéticas y evaluación de la actividad proteolítica. Obteniendo resultados mediante SDS-PAGE en la que se evidenciaban regiones con variabilidad específicas del sexo. Con relación a la actividad, los venenos de las hembras eran más activos que los venenos de sexo de los machos en la degradación de fibrinógeno en fibrina, sin embargo, no hubo diferencias significativas (143).

Expuesto lo anterior, la variabilidad, calidad y cantidad de los componentes del veneno, dependen directamente de la especie, su localización geográfica, edad, sexo, la dieta, las influencias ambientales (períodos de lluvias y sequía) e incluso si el animal es silvestre o vive en cautiverio (91, 127, 131, 134, 136, 137, 141-143).

2.2.1.1 Composición

La composición química del veneno de serpiente contiene aproximadamente 90-95% de proteínas (12, 35, 130) que se clasificarán en enzimas, polipéptidos, glicoproteínas, y componentes de bajo peso molecular (35). Esto se ilustra en la tabla 2-2.

Tabla 2-7 Composición bioquímica del veneno de serpiente

Componentes presentes en el veneno de serpiente	
Enzimas	fosfolipasa A ₂ (lecitinasa), 5c-nucleotidasa, colagenasa, L-amino acidoxidasa, proteinasas, hialuronidasa, acetilcolinesterasa ^a , fosfolipasa B ^a , endopeptidasa ^b , cininogenasa ^b , factor X ^b , enzima activadora de protrombina ^b
Polipéptidos No enzimáticos	neurotoxina post-sináptica A (α - bungarotoxina y cobrotoxina), neurotoxina presináptica B (β - bungarotoxina, crottoxina, y taipoxina) cardiotoxina, crotamina
Péptidos	Piroglutamilpeptido
Nucleósidos	adenosina, guanosina, inosina
Lípidos	fosfolípidos, colesterol
Aminas	histamina, serotonina, espermina
Metales	cobre, zinc, sodio, magnesio

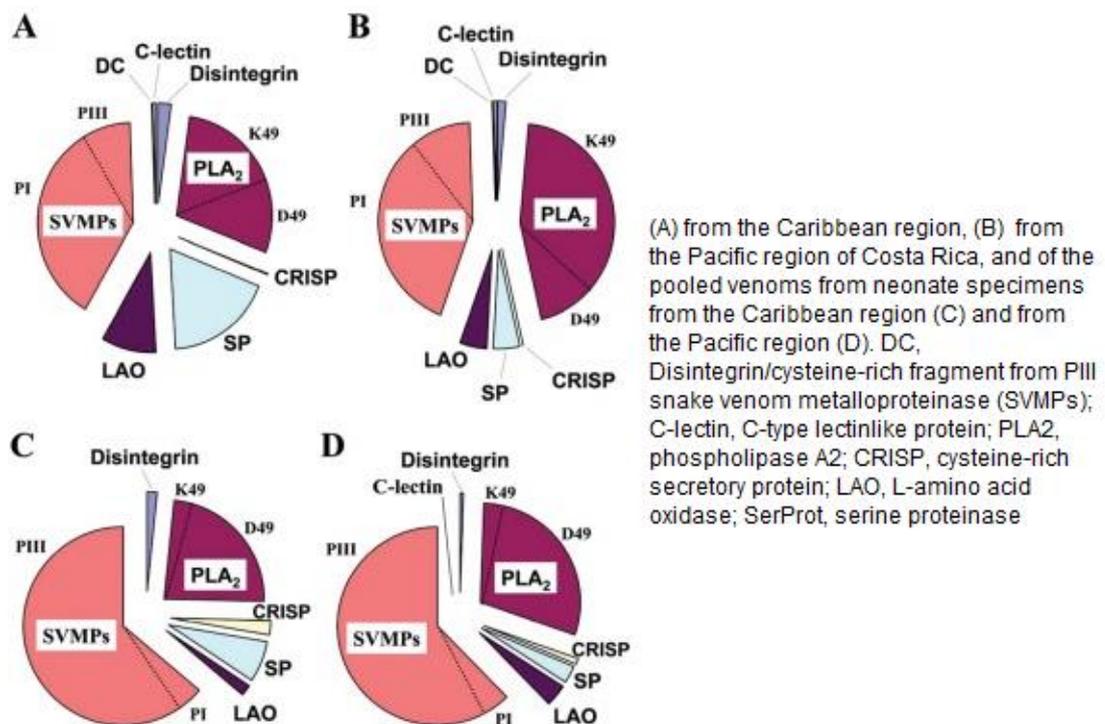
^a en Elápidos, ^b en Vipéridos

Modificado de León G, Sánchez L, Hernández A, et. al. Immune response towards snake venoms. Inflammation & allergy drug targets. 2011; 10(5):381-98. Y de Ahmed SM, Ahmed M, Nadeem A, et. al. Emergency treatment of a snake bite: Pearls from literature. Journal of Emergencies, Trauma and Shock. 2008; 1(2):97-105.

Cada familia de proteínas tiene características estructurales específicas, es decir, de masa molecular, conformación estructural (terciaria y cuaternaria), grado de glicosilación, que determinarán su inmunogenicidad o capacidad de producir respuesta inmunogénica. Además, estas familias de proteínas están presentes en concentraciones variables en los venenos, un factor que también influye en su inmunogenicidad (130, 140, 144-146).

Por ejemplo en la figura 2-5 se observa la distribución de las toxinas presentes en el veneno de *B. asper*, y las variaciones entre venenos de serpientes adultas y neonatos, de acuerdo a la región Caribe y Pacífica de Costa Rica.

Figura 2-5. Proteoma del veneno de *B. asper* comparando la composición química de 4 regiones geográficas



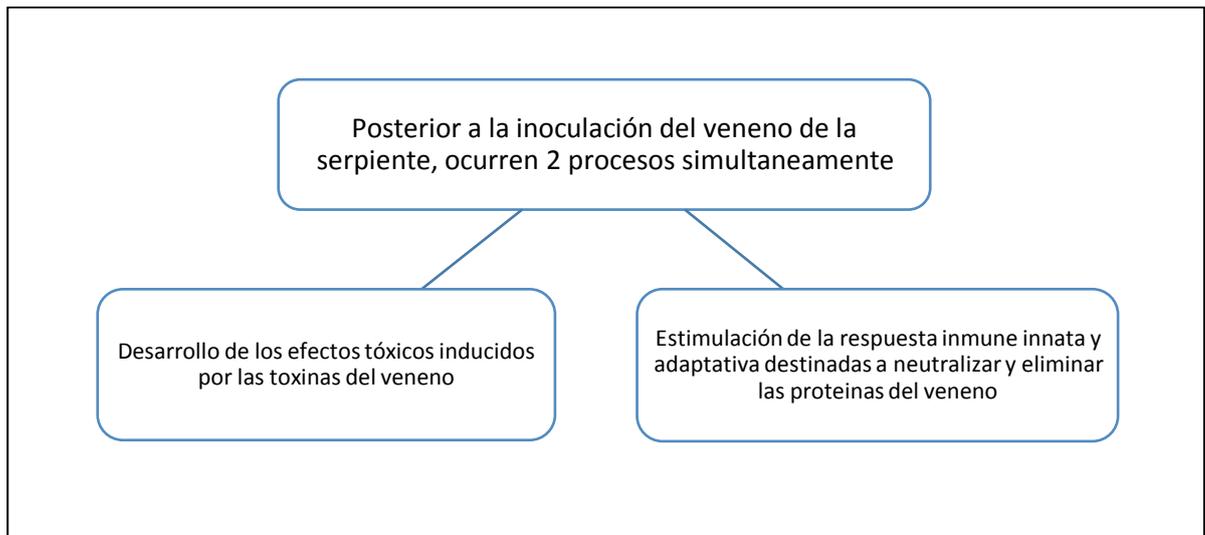
Tomado de Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, et. al. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of proteome research*. 2008;7(8):3556-71 (140).

2.2.1.2 Efecto fisiopatológico

Los síntomas de envenenamiento por mordedura de serpiente son extremadamente variables en función de la familia causante. Por ejemplo, la familia Viperidae, en este caso las serpientes del género *Bothrops* y *Crotalus*, causan un daño tisular masivo o alteraciones irreversibles en el sistema de coagulación de la sangre (11). Mientras que

la familia Elapidae, causan parálisis o efectos principalmente neurotóxicos, pues su veneno contiene péptidos específicos para esta actividad (11, 147-149). Es por esto, que cuando la capacidad para generar daño local y sistémico, del veneno de la serpiente, excede la capacidad del animal para asimilar y responder a la agresión, ocurre el envenenamiento (130).

Figura 2-6. Efecto de la inoculación del veneno



Fuente: León G, Sánchez L, Hernández A, Villalta M, Herrera M, Segura A, et. al. Immune response towards snake venoms. *Inflammation & allergy drug targets*. 2011; 10(5):381-98. Elaboración propia.

Los venenos de serpientes pueden clasificarse según su efecto fisiopatológico:

Tabla 2-8. Efectos fisiopatológicos del veneno

Familias de ofidios	Efecto Fisiopatológico	Actividad de la toxina	Efectos clínicos
Elapidae	Neurotóxico	Neurotoxina paralizante <ul style="list-style-type: none"> • Presináptica • Postináptica • Anticolinesterasa 	Parálisis flácida
Viperidae, <i>Crotalus</i>		Neurotoxina estimulante	Fasciculación muscular Estimulación masiva del sistema nervioso autónomo que se comporta como una tormenta de catecolaminas (diaforesis, diarrea, taquicardia, broncorrea, flush facial, entre otros).
Viperidae	Proteolítico	Fosfolipasa A ₂ Serin-proteasas Metaloproteinasas Necrotoxinas	Daño directo del tejido que puede ser evidenciado como necrosis del sitio de la lesión, que puede extenderse

Viperidae Elapidae	Miotóxica	Miotoxina	Daño del sistema musculoesquelético que se evidencia como mialgias generalizadas y del área de inoculación
Viperidae	Alteración del sistema hemostático	<ul style="list-style-type: none"> • Procoagulantes y Anticoagulantes • Hemorraginas 	<ul style="list-style-type: none"> • Interfieren con el sistema hemostático, favoreciendo: trombosis y/o hemorragia • Ruptura de las paredes vasculares, causando hemorragia
Viperidae	Hemolítico		Favorece la ruptura de los glóbulos rojos
Viperidae	Nefrotóxico	Nefrotoxinas	Daño renal directo
Viperidae	Cardiotóxico	Cardiotoxinas	Favorece alteraciones arritmogénicas, lesión celular.

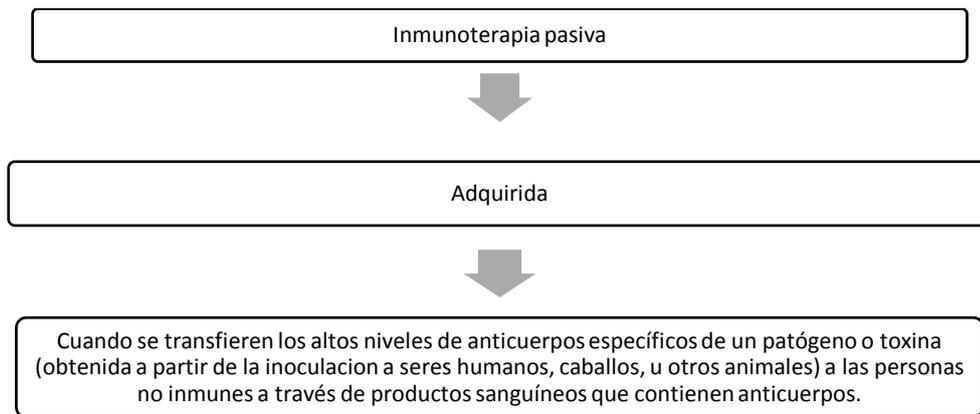
Modificado de White J. Venomous animals: clinical toxicology. En: Luch A, editor. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 2: Clinical Toxicology. Basel: Birkhäuser Basel; 2010: 233-91 (150).

2.3 Definición de Inmunoterapia pasiva

La inmunoterapia pasiva es la transferencia de cualquier agente inmunológicamente activo, el cual es producido externamente al huésped inoculado y que no depende del sistema inmunológico del individuo para funcionar (151, 152). El objetivo de la inmunoterapia es establecer, reparar o aumentar la respuesta inmune frente a una enfermedad (153).

Históricamente, el concepto de la inmunoterapia se desarrolló al observar los pacientes que habían sufrido y sobrevivido a ciertos tipos de enfermedades, quienes permanecían protegidos contra la enfermedad. Y que era posible la transferencia de esta protección pasiva a otros pacientes que tenían la enfermedad o no tenían todavía (152, 154, 155).

Figura 2-7. Inmunoterapia pasiva.



Fuente: Shahani L, Singh S, Khardori NM. Immunotherapy in Clinical Medicine: Historical Perspective and Current Status. *Medical Clinics of North America*. 2012; 96(3):421-31. Elaboración

La inmunoterapia pasiva se utiliza cuando existe un alto riesgo de infección y tiempo insuficiente para que el cuerpo desarrolle su propia respuesta inmune, o para reducir los síntomas de las enfermedades en curso (152, 154).

El suero antiofídico es un conjunto de inmunoglobulinas G o partes de inmunoglobulinas, que son producidas por el sistema inmunológico del animal que ha sido expuesto al veneno de una o varias serpientes, mediante un proceso de inoculación controlado (4). Éste al ser administrado parenteralmente a la víctima con ofidiotoxicosis, tendrá la capacidad de brindar protección inmediata al individuo contra una o varias toxinas del veneno de la serpiente (26, 27). Es importante recalcar que, la efectividad del antiveneno antiofídico dependerá de la potencia de neutralización y la especificidad contra el veneno de la especie de serpiente causante (30).

Esta potencia o capacidad de neutralización del antiveneno antiofídico depende de los venenos utilizados en su fabricación, los cuales deben contener los perfiles de las toxinas propias de la especie de serpiente que se pretende neutralizar. Y para esto, es una exigencia que las especies de serpientes escogidas para la producción del antiveneno sean geográficamente representativas, de acuerdo a la epidemiología local, teniendo en cuenta los datos taxonómicos y proteómicos de éstas (4).

2.4 Generalidades del suero antiofídico

A finales del siglo XIX, se inició la producción de antivenenos en el Instituto Pasteur, por el científico Albert Calmette (11, 12), quien aportó el primer protocolo de inmunización pasiva contra el veneno de la Cobra India, abriendo así la puerta para la producción del tratamiento a gran escala. Este protocolo fue usado por el estadounidense McFarland, en 1899, y por Tidwell en Australia (1902). Posteriormente en 1905, se produjo el primer antiveneno polivalente, diseñado para las especies de importancia clínica de Centro y Suramérica, por Vital Brazil, y, en 1907, por Ishizaka en Japón (11, 22, 27).

Los antivenenos antiofídicos se clasifican según el número de venenos de diferentes géneros de serpientes que pueden contrarrestar, siendo monovalentes, aquellos que solo son efectivos para neutralizar el veneno de un género específico de serpiente (11, 22-25), por ejemplo antibothrópico o anticrotálico.

Los antivenenos polivalentes son aquellos que se obtienen por fraccionamiento del plasma del animal inmunizado con mezcla de 2 o más venenos de diferentes géneros de serpientes y que tiene la capacidad de neutralizarlas. También se les da el nombre de antivenenos poliespecíficos (11, 22-25).

El proceso de producción del antiveneno inicia con la inoculación del veneno al animal productor del plasma, se considera que el veneno crudo inoculado proporciona más altos y mejores títulos de anticuerpos, pero, dado el animal, puede cursar con envenenamiento. Es por esto que se usan dosis sub-letales de veneno mezclados con un adyuvante para facilitar o controlar su liberación del veneno en el torrente sanguíneo y así estimular la respuesta inmunológica (22, 27, 139).

El modelo animal (caballos, ovejas, monos, conejos o cabras) escogido para la inmunización y producción en masa del tratamiento, se realiza de acuerdo a la calidad de la respuesta inmunológica, la cantidad de volumen de plasma que se pueda obtener por exsanguinación, las enfermedades prevalentes a nivel local, la disponibilidad en la región, adaptación al ambiente, y el costo de mantenimiento del animal. Para la producción comercial, se suele escoger caballos, dado que es fácil su manipulación, se adaptan bien a los diferentes climas y pueden donar grandes volúmenes de plasma sin afectar su estabilidad hemodinámica (22, 139).

La inmunización de los modelos animales, sugerida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), propone que éstos deben pasar por un período de cuarentena entre 3 a 6 semanas antes de suministrar el veneno, evaluación veterinaria estricta, desparasitación del animal y tamizaje de enfermedades específicas para la especie escogida; una vez pasan este proceso, se puede iniciar la inmunización. Se administran dosis subcutáneas repetidas de veneno (o la mezcla de varios venenos), en promedio 50-200 μ L, en las áreas más cercanas a los ganglios linfáticos para aumentar la interacción entre las células presentadoras de antígeno y la respuesta inmunológica (156).

Finalizada la administración del veneno, se da un plazo de tiempo para esperar la respuesta inmunológica, se pueden tomar muestras sanguíneas para confirmar los títulos de inmunoglobulinas circulantes. Posteriormente, se puede iniciar la exsanguinación controlada y aséptica, teniendo en cuenta el volumen de sangre que se retira (que se determina según el peso del animal) (36).

Luego se procede a almacenar en bolsas o botellas refrigeradas, con el fin de realizar la separación del plasma y los glóbulos rojos. El plasma que contiene los anticuerpos, se llevará a purificación y fraccionamiento de los mismos, y así se convierte en medicamento biológico. Los eritrocitos son devueltos al animal para prevenir la anemización (157).

Una vez obtenido el suero crudo, este debe ser almacenado entre 2-8°C bajo condiciones estériles y sanitarias apropiadas, adicionándole preservativos para prevenir la contaminación bacteriana y la desnaturalización de las proteínas plasmáticas (157).

En la actualidad, se utilizan dos métodos de purificación de anticuerpos por precipitación diferencial de proteínas plasmáticas no inmunoglobulínicas, mediante el agregado de ácidos grasos de cadena corta como el Ácido caprílico o con sulfato de amonio. Es decir, lograr la eliminación de albúmina, globulinas no inmunes y otras proteínas del suero, quedando así, como agente terapéutico: la molécula de inmunoglobulina G (IgG) purificada (158). Este proceso se realiza a partir de plasmas equinos hiperinmunes para la producción de antivenenos a nivel industrial, obteniéndose preparaciones enriquecidas en moléculas de inmunoglobulinas G (57, 139, 159, 160). Adicionalmente, se usa la digestión enzimática con pepsina o papaína

que se incluye en varios protocolos con el fin de obtener divalentes o monovalentes de inmunoglobulina, es decir, fragmentos $F(ab')_2$ y Fab (58, 59).

Es importante resaltar que la composición del antiveneno, según si contiene Inmunoglobulina G completa (139) o fracciones de Inmunoglobulina G; Fab (unión monomérico) o $F(ab')_2$ (unión dimérica) (11, 139) (en la figura 2-6 se muestra la estructura de la IgG y sus fracciones), tendrá implicaciones clínicas en la cantidad de ampollitas requeridas para lograr el mismo efecto de neutralización. Pues los procesos de purificación, fraccionamiento y modificación de la forma farmacéutica de los antivenenos, pueden favorecer la desnaturalización proteica (52, 61, 161, 162).

Sin embargo, estos procesos se realizan con el propósito de disminuir el riesgo de sufrir eventos adversos asociados al uso del antiveneno tales como: reacciones de hipersensibilidad inmediata (anafilaxia) e hipersensibilidad tardía (enfermedad del suero), debido a la alta concentración de proteínas heterólogas (57, 139, 163).

Figura 2-8. Estructura de Inmunoglobulina G y sus fracciones



Adaptado de: Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. *Journal of proteomics*. 2009; 72(2):183-99.

2.4.1 Sostenibilidad de la producción del Suero Antiofídico

A pesar de que el antiveneno es el único tratamiento reconocido y eficaz para dar tratamiento al envenenamiento causado por la mordedura de serpientes, la disponibilidad de estos medicamentos esenciales para salvar vidas lleva mucho tiempo en crisis, principalmente por los siguientes motivos (22):

- Alto costo productivo, dado que implica técnicas especializadas de producción, mantenimiento de los animales (caballos como especie inoculada y productores de las inmunoglobulinas; serpientes de interés epidemiológico; y, ratones para alimentación de las serpientes en cautiverio, para los estudios de seguridad, termoestabilidad y efectividad) (22).
- Personal para el manejo y cuidado de los animales, para la producción, evaluación de seguridad, efectividad, termoestabilidad y microbiológico de los antivenenos(22).
- Dificultad para mantener las especies de serpientes de interés clínico en cautiverio, ya que son animales que requieren ambientes controlados (temperatura, humedad, hábitat, entre otros) (22),
- Prolongado tiempo de producción, pues los animales, de acuerdo al protocolo de inoculación de venenos, pueden tardar entre 3 a 8 semanas en presentar títulos de anticuerpos (22).

Es por esto que se han buscado técnicas de manufactura innovadoras para reducir costos. Por ejemplo, United Kingdom's Engineering and Physical Sciences Research Council (EPSRC) y Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) trabajaron en conjunto para diseñar "Técnicas e instalaciones para la manufactura de antivenenos efectivos y baratos" (164), con el apoyo de la OMS y del Ministerio de Salud de Nigeria, produjeron un antiveneno contra la Víbora de Alfombra del occidente africano (*E. ocellatus*) a un costo de 40 USD por paciente (31).

Algunos investigadores han propuesto que una forma de demostrar la costo-efectividad del antiveneno y la carga económica que constituye una víctima con secuelas discapacitantes, puede realizarse mediante el cálculo de años de vida ajustados por discapacidad AVAD (del inglés, DALY disability adjusted life year) (31).

En el estudio anterior se utilizaron los datos publicados para el envenenamiento por *E. ocellatus* (víbora alfombra del occidente africano) en zonas rurales de Nigeria, tomaron una edad promedio de la víctima de 15 años y calcularon un promedio de vida de 47 años, ponderando una discapacidad conservadora de 0,102, una tasa de mortalidad del 20% y una tasa de morbilidad del 40% (165-167). El resultado obtenido fue que el costo DALY evitado, con el uso de antiveneno, es inferior a 10 USD, que es mucho más bajo que el costo causado por la discapacidad de un individuo. Al comparar el manejo farmacológico del accidente ofídico vs. el tratamiento del VIH (y sus complicaciones),

resulta ser mayor costo efectivo el primero. Por lo que se concluye que el DALY evitado por el uso del antiveneno reduce los costos a largo plazo para los sistemas de salud, mejora la calidad de vida del individuo afectado y su entorno (31).

2.4.2 Producción y distribución del suero antiofídico colombiano

En Colombia existen en la actualidad, dos laboratorios productores de antiveneno: el Instituto Nacional de Salud (INS) y Laboratorios Probiol[®], cuyas formas de preservación son líquida y liofilizada, respectivamente. (168, 169)

En la página web del INS se encuentra información sobre la producción del antiveneno, en la que explican que la polivalencia del antiveneno se fundamenta en la inmunización de caballos con venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* provenientes de diferentes regiones del país. Utilizan plasmas hiperinmunes fraccionados y purificados mediante la técnica de precipitación con sulfato de amonio (170). Mientras que el Suero Antiofídico Polivalente de Probiol es efectivo en el caso de envenenamiento ofídico por serpientes de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. Pero sus protocolos de producción son confidenciales, dado es una organización privada que se puede reservar las técnicas de producción.

El proceso de fraccionamiento y purificación de los plasmas hiperinmunes de origen equino, deben cumplir con los lineamientos y requerimientos autorizados por el Instituto Nacional de Vigilancia y control de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), haciendo un estricto control de calidad durante el proceso y al producto terminado (170).

La reglamentación sobre la adquisición de antivenenos y su distribución en Colombia se inició en el año 2004, cuando se consideró el accidente ofídico como de interés epidemiológico, por lo cual se introdujo en el país la notificación obligatoria del envenenamiento por serpientes y se le dio el carácter de problema de salud pública en el país mediante la Circular 092 del Ministerio de la Protección Social (18, 33).

La notificación obligatoria permite el registro de eventos ocurridos por año y de allí su valor, puesto que al registrar concienzudamente los datos asociados al accidente ofídico, fortalece el análisis epidemiológico y la salud pública, ya que facilita la identificación de las regiones geográficas y las poblaciones en riesgo, evaluando los patrones de distribución y los modelos de actividad de ofidios. Esto facilita la realización

de intervenciones en salud, priorizando las regiones afectadas, generando políticas de prevención y descentralización de la provisión de antivenenos (108).

Sin embargo, en Colombia, aún hay mucho camino por recorrer, ya que si bien se han dado pasos importantes para mejorar la notificación del accidente ofídico, todavía se evidencia un sub-registro (15). Por lo tanto, es muy difícil enfocar una producción de suero antiofídico nacional basada en la prevalencia de este evento, pues al no tener claridad sobre la distribución epidemiológica exacta, esto afectará el abastecimiento y disposición de los antivenenos.

Desde 2004, se declaró el estado de emergencia por desabastecimiento de suero antiofídico, la cual fue estipulada en la Resolución 002934 de 2004. En ese momento el INVIMA realizó pruebas biológicas y físico-químicas a unos lotes importantes de sueros antiofídicos que no cumplían con las normas de calidad en cuanto a potencia e inocuidad (43), esto se asoció a una temporada invernal. Se ha documentado en la literatura que durante los períodos invernales existe un aumento de los casos de accidente ofídico (92).

Posteriormente esta resolución fue prorrogada o modificada por otras resoluciones como: la Resolución 000613 y 005078 de 2005; 002325 de 2006; 002198 de 2007; 002413 de 2008 y 002206 de 2009; en las cuales se buscaba ampliar el período de vigencia (semestral o anual) del estado de emergencia, hasta llegar a diciembre de 2010. Por cuanto no se habían modificado las condiciones que dieron origen a la misma, y aún persistían las dificultades de adecuada producción nacional (dado por insuficiente producción o calidad inadecuada) (44).

En la Resolución 002934 de 2004, se consideró que según la información disponible, en ese momento, sobre la incidencia de accidentes ofídicos, las necesidades de antiveneno para su tratamiento, eran del orden de 30.000 ampollas por año, teniendo en cuenta que para un envenenamiento se usan entre 2 y 10 ampolletas por individuo (43). Es decir, que una cantidad de producción menor a ésta será comprendida como producción insuficiente. Dado el inicio de la notificación obligatoria, se pudo mejorar el registro de los eventos, por lo tanto el número de casos registrados puede incrementarse debido a la curva de aprendizaje para documentarlos (período del 2004 al 2011) (108). Por lo tanto, el requerimiento del número de ampollas necesarias para su tratamiento también aumenta, siguiendo la proporción.

Posteriormente en 2014 aparece la Resolución 1300, donde persiste la emergencia sanitaria, dado que el INS era el único productor nacional con registro sanitario vigente, puesto que el otro productor colombiano fue cerrado por no contar con Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), y la producción de INS no alcanza a cubrir las necesidades de antivenenos antiofídicos para el país (45). A esta resolución, se le amplió el período de vigencia en el decreto 0868 de 2015 por 12 meses (171) y fue prorrogada una vez más mediante la Resolución 1478 de 2016 por un período similar (172).

En la tabla 2-9 se visualiza el número de lotes producidos y liberados en Colombia en el período de 2014 hasta 2016, por cada una de las Instituciones productoras en el país. En la que se nota como la producción ha ido aumentando con el paso de los años, no obstante, aún el número de ampollas producidas no logran cubrir las necesidades para tratar el accidente ofídico.

Tabla 2-9. Lotes de SAP producidos y liberados en Colombia, período 2014-2016

Lotes de SAP producidos y liberados desde 2014 hasta 2016							
Institución productora	2014		2015		2016		2014-2016
	Número de Lotes	Número de amp.	Número de Lotes	Número de amp.	Número de Lotes	Número de amp.	
INS	1	3000	2	13644	2	26698	43342
PROBIOL	3	3511	9	14089	10	10470	28070

Fuente: Laboratorio y liberación de lotes (vacunas, hemoderivados y sueros de origen animal) Bogotá: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA); 2014 [consultado 7 de junio 2017]. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/vacunas/337-vacunas/laboratorios/3458-laboratorio-y-liberacion-de-lotes-vacunas-hemoderivados-y-sueros-de-origen-animal.html> \ "año-2016 (46).

Elaboración propia.

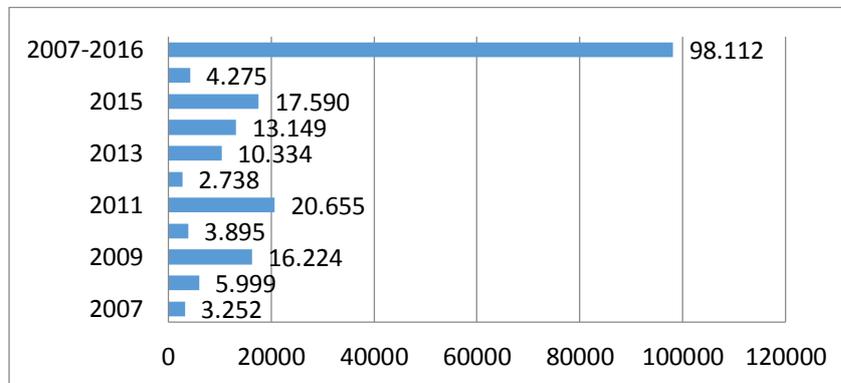
Este evidente problema de desabastecimiento de antiveneno, ha llevado al Ministerio de Salud a importar antivenenos antiofídicos producidos por otras farmacéuticas de origen mexicano, brasilero y costarricense, según la base de datos BACEX¹⁶ del Ministerio de Comercio Industria y Turismo. En Colombia, desde el 2007 hasta la fecha, se han importado aproximadamente 98.112 ampollas¹⁷, los países exportadores fueron México, Costa Rica, Brasil y Paraguay, siendo México el mayor exportador. Asimismo, se obtuvo el costo de importación en dólares que en los últimos 9 años fue de 2.252.541 USD (COP 4.936.487.522) (47).

¹⁶ Para este caso, se ha consultado esta base de datos en las instalaciones de PROCOLOMBIA, la cual tiene una plataforma virtual que requiere usuario y contraseña. que solo son de consulta interna, administradas por el personal de esta institución y por lo tanto no es de dominio público.

¹⁷ Dato calculado teniendo como referencia el peso de 1 ampollita según el fabricante.

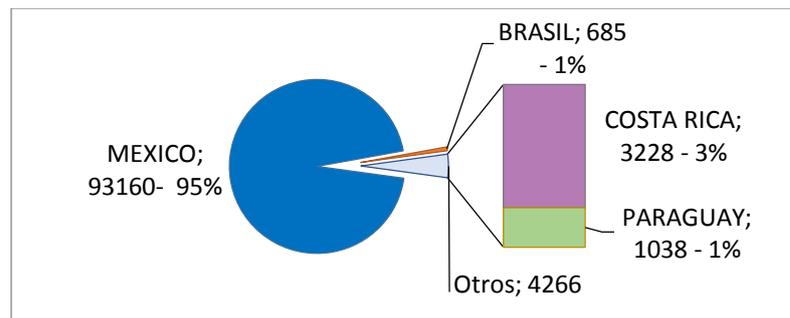
En la figuras 2-9 y 2-10 se muestra desglosado el número de ampollas importadas/año y el número de ampollas importadas de acuerdo al país de origen.

Figura 2-9. Número de ampollas de SAP importadas por año



Fuente: BACEX [Internet]. Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. Diseño y Desarrollo: Oficina de Sistemas de Información. 2013 [citado: 6 de octubre de 2016]. Disponible en: http://bacex.mincit.gov.co/di_002_sa.asp?subp=3002101100&button=Continuar. Elaboración propia.

Figura 2-10. Número y porcentaje de ampollas importadas según país de origen



Fuente: BACEX [Internet]. Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. Diseño y Desarrollo: Oficina de Sistemas de Información. 2013 [citado: 6 de octubre de 2016]. Disponible en: http://bacex.mincit.gov.co/di_002_sa.asp?subp=3002101100&button=Continuar. Elaboración propia.

Por otro lado, la distribución de antivenenos antiofídicos se produce por dos mecanismos principales: el primero, las Empresas Prestadoras de Salud (EPS), responsables de garantizar la dotación de éstos a sus usuarios de acuerdo con el perfil epidemiológico de las distintas regiones del país; y, el segundo, el Ministerio de Salud, que tiene reservas de antiveneno para satisfacer las necesidades en las situaciones de emergencia y desastres naturales. Asimismo, el Ministerio adquiere antivenenos que no se producen en el país, por ejemplo, el antiveneno para serpientes de la familia *Elapidae*, género *Micrurus* (29, 108, 173).

2.4.3 Evaluación de estabilidad de Antivenenos Antiofídicos

La acción farmacológica de un medicamento, bien sea alopático o biológico, debe estar encaminado a la terapéutica de los individuos. Por tal motivo, conocer los aspectos farmacodinámicos, farmacocinéticos y los potenciales efectos toxicocinéticos, así como de las propiedades fisicoquímicas y de la configuración espacial de la molécula química. Esta acción, se encuentra estrechamente ligada con las características de la forma farmacéutica (174, 175), que se puede ver afectada por condiciones de almacenamiento, humedad, temperatura, cambios de pH, exposición a la luz, entre otros (175).

En términos generales, los estudios de estabilidad de un medicamento alopático o biológico se definen como aquellas actividades experimentales, que permiten la creación de la información necesaria y suficiente para sustentar la vida útil de los medicamentos. Éstas deben establecer la fecha de expiración de los lotes fabricados, así como garantizar la biodisponibilidad y bioequivalencia de éstos. Los estudios de estabilidad están diseñados para evaluar las condiciones de almacenamiento ideal y de estrés de un medicamento, en relación a las condiciones de almacenamiento, humedad, temperatura, cambios de pH, exposición a la luz, etc. (176, 177).

Desde este punto de vista, los estudios de estabilidad se pueden clasificar así:

- Estudios de estabilidad de Preformulación y Desarrollo de Producto: están encaminados al diseño del medicamento, establecer la forma farmacéutica los métodos de producción y las condiciones bajo las que se garantiza la estabilidad del medicamento (177).
- Estudios de estabilidad para Registro Sanitario y autorización de comercialización: pueden comprender estudios de estabilidad al natural¹⁸ o acelerados¹⁹. Los cuales están dispuestos a establecer la degradación absoluta y provisional, respectivamente (177).

¹⁸ Estudios de estabilidad al natural, también llamados de largo plazo: se realizan mediante la exposición de los medicamentos, a las condiciones de almacenamiento ideal o definitivas, teniendo en cuenta las variables de temperatura de almacenamiento (según si requieren refrigeración o no), exposición a la luz, humedad, esterilidad, etc. En estos estudios se garantiza que los medicamentos son biodisponibles bajo esas condiciones específicas. Se realizan por un periodo de tiempo establecido entre 6 a 12 meses. Estos estudios son obligatorios para la aprobación del registro INVIMA, para Colombia (177).

¹⁹ Estudios de estabilidad acelerados: son aquellos en los que se expone a un medicamento a condiciones extremas o de estrés, con el fin de evaluar su degradación provisional. Así como su biodisponibilidad a condiciones de almacenamiento extremas o no esperadas. En Colombia, estos estudios son opcionales y no se requieren para la aprobación del registro INVIMA (177).

- Estudios de estabilidad en la etapa de Postmercadeo: permiten evaluar los efectos existentes sobre un medicamento (composición de la formulación y/o proceso productivo) o de su envase primario, asociados a variaciones de estos, que se reflejen en la calidad del producto (177).

Un estudio de degradación forzada o acelerada es un paso esencial en el diseño de un programa de estabilidad para sustancias y productos farmacéuticos, éste se formalizó como requisito en la Guía ICH de 1993. No obstante, es importante aclarar que los estudios de estabilidad pueden variar de acuerdo al tipo de medicamento evaluado, alopático o biológico, dado que requerirán especificaciones diferentes. La realización de estos estudios implica someter a los medicamentos y/o los envases que los contienen, a condiciones más severas, factores externos e internos catalíticos, tales como calor, humedad, pH, oxidantes y exposición a la luz. Puesto que las principales preocupaciones que se dan durante la prueba de estabilidad y el almacenamiento se presentan en la distribución de un producto farmacéutico, pues pueden ocurrir cambios físicos y químicos (expresados en biodisponibilidad, efectividad y efectos adversos); los estudios de degradación forzada proporcionan información muy valiosa con respecto a la estabilidad de las formulaciones de fármacos en su ciclo de vida. Algunos autores han sugerido que estos estudios deben incluirse en el diseño y licencia de distribución, según la reglamentación para cada país (175, 178).

Para el caso de los medicamentos biológicos, los estudios en condiciones de estrés acelerado pueden ser útiles para determinar si las exposiciones accidentales a condiciones distintas de las propuestas (por ejemplo, durante el transporte) son perjudiciales para el producto y, también, para determinar qué parámetros analíticos pueden ser los mejores indicadores de la estabilidad de éste. Algunos autores sugieren que las condiciones deben seleccionarse cuidadosamente caso por caso (175, 178).

Existen antecedentes de estudios de estabilidad de los SAP a nivel internacional, en Costa Rica, donde G. Rojas et. al., evaluaron el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad del antiveneno polivalente líquido antiofídico del Instituto Clodomiro Picado. En el estudio se realizó el almacenamiento durante un período de doce meses, a temperaturas de 4, 23, 30 y 37°C, para determinar, en un período de un mes, variables como: potencia de neutralización frente a la actividad letal de veneno de *Bothrops asper*, concentraciones de proteínas y fenol; pH; turbiedad; seguridad; y esterilidad (67).

En esa investigación se evidenció que no se produjo variaciones significativas en la potencia, las concentraciones de proteína y fenol, el pH, la esterilidad o la seguridad, en cualquiera de las temperaturas de almacenamiento durante el período de estudio. Pero sí se encontró alteraciones de la turbidez, dado por la formación de agregados proteínicos heterogéneos de alto peso molecular. Por lo cual, se recomendó que para prevenir esto, se continúe usando la cadena de frío y así garantizar la integridad del antiveneno polivalente líquido antiofídico (67).

En Brasil se realizó un estudio de termoestabilidad de antivenenos antiofídicos contra *Bothrops* spp. y *Crotalus durissus*, los cuales se fraccionaron con sulfato de amonio y digestión con pepsina para obtener solo fragmentos F(ab'2), producidos por la Fundación Ezequiel Dias (FUNED); se adicionó fenol, sorbitol y glicerol a diferentes concentraciones molares, y, posteriormente, se les expuso a temperaturas mediante incubación (56, 60, 62, 64, 66, 68, 70 y 72°C) durante un período de 40 minutos hasta 2 horas. Se observó que el sorbitol fue capaz de inhibir la formación de agregados proteínicos en aquellos antivenenos incubados hasta 70°C por 90 minutos; mientras que aquellos que contenían fenol y glicerol no inhibieron. Lo anterior se asoció a las propiedades lipofílicas y desnaturizantes de estos dos últimos (69).

En Colombia hay solo 2 estudios realizados y publicados por el Instituto Nacional de Salud (INS), el primero de ellos se llevó a cabo en 1994 por Ramírez, J. et. al., quienes determinaron la actividad neutralizante de la letalidad de 19 lotes de SAP en presentación líquida, producidos por este instituto. Éstos fueron almacenados en completa oscuridad a 4 y 16°C (el período de almacenamiento fue variable en las diferentes muestras de antiveneno, entre 3 y 5 años), contra una mezcla de veneno de *Bothrops asper - atrox*. Lamentablemente, este estudio presenta inconsistencias metodológicas, dado que en ningún caso se pudo hacer el seguimiento durante 5 años consecutivos. Los propios autores refieren que hubo diferencias entre el año de producción (1983-89) y los años en los que se hicieron las pruebas (1987-89), así como en unos pocos casos no se pudieron realizar las respectivas pruebas en los períodos de tiempo estipulados (70).

Los resultados de ese estudio, evidencian que hay una relación inversamente proporcional conforme aumenta el período de almacenamiento, se disminuye el potencial de neutralización letal, donde el SAP almacenado a 4°C a los 3 años neutraliza aproximadamente un 80%, y el que fue almacenado a 16°C solo un 60%

(70). Sin embargo, no se hizo referencia alguna del porqué debe mantenerse la cadena de frío, a pesar de los resultados.

El segundo estudio, realizado en 1995, usó una metodología similar al anterior, donde se determinó la capacidad neutralizante de la letalidad de varios lotes de SAP líquido, producidos por el INS, los cuales fueron retados contra una mezcla de venenos de *Crotalus durissus cumanensis*. Compararon la capacidad de los diferentes lotes almacenados en oscuridad a las temperaturas de 4 y 16°C y probaron que la termoestabilidad muestra un comportamiento similar al primer estudio; no obstante, se concluye que es más rápida la disminución de la capacidad neutralizante del SAP en la línea de tiempo (71). En la búsqueda de investigación sobre los SAP producidos por Laboratorio Probiol, no se encontraron documentos que abordaran la termoestabilidad de éstos.

La reglamentación para el desarrollo y aprobación de un producto farmacéutico biológico, en Colombia, se implementó en julio de 1995²⁰ y posteriormente se actualizó en agosto de 2016, mediante la Resolución 3690, en la cual se tuvieron en cuenta los siguientes documentos "*WHO Technical Report Series 962. Annex 3: Guidelines on stability evaluation of vaccines*" de la Organización Mundial de la Salud (OMS); y "*Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products*" de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH). En ésta se establece que los medicamentos, incluidos los biológicos, resultan sensibles a los factores ambientales, tales como cambios de temperatura, humedad y luz, los cuales pueden llegar a modificar las características del medicamento y, por lo tanto, es necesario establecer las condiciones para asegurar la conservación de la actividad biológica y evitar la degradación del producto (73).

Igualmente ésta aplica para los interesados en obtener o renovar el registro sanitario de medicamentos biológicos o modificar el registro por aspectos de estabilidad y a los titulares, fabricantes e importadores de medicamentos biológicos (73).

La resolución explica los tipos de estudios de estabilidad a los que se debe someter un medicamento biológico y los requisitos que deben presentar los fabricantes para obtener el registro INVIMA. Este instituto debe basarse en los resultados de los estudios

²⁰ Resolución 2514 de 1995 y Decreto 677 de 1995. Para términos prácticos de este documento se utilizará la reglamentación más reciente.

de estabilidad natural, realizados por los fabricantes. El estudio de estabilidad natural debe hacerse en un período de 12 meses, teniendo en cuenta que los medicamentos biológicos que requieren cadena frío, se deben evaluar a temperaturas entre $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$; mientras que aquellos que no requieren refrigeración, se deben evaluar a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pero la normatividad no exige que se realicen estudios de estabilidad acelerada en las que se reten a los medicamentos a temperaturas extremas o fuera de las condiciones de almacenamiento. Además, la resolución hace referencia, exclusivamente, a la realización pruebas de termoestabilidad para las vacunas, no se hace mención frente a los antivenenos (73).

2.5 Proceso de liofilización

La liofilización es un proceso que ha sido utilizado, en la industria alimentaria para la conservación de los alimentos, y en la farmacéutica para los medicamentos. Es una técnica bastante costosa y lenta si se la compara con los métodos tradicionales de secado, pero genera productos de una mayor calidad, ya que, al no emplear calor, evita en gran medida las pérdidas nutricionales y organolépticas, tanto en alimentos como en medicamentos (179, 180).

Uno de los problemas que siempre ha preocupado a los investigadores y científicos, es la pérdida de las propiedades nutricionales y farmacológicas que contienen gran número de productos biológicos, químicos y alimenticios que, al exponerse a variables ambientales no controladas se desnaturalizan fácilmente, impidiendo su conservación. A principios del siglo XX, los científicos franceses Bordas y D'Arsonval, y el americano Shackell, descubrieron la aplicación del principio físico de la sublimación, construyendo así el primer aparato de liofilización (179).

Los primeros en liofilizar productos para uso clínico en gran escala, principalmente antivenenos y plasma humano, fueron E.W Flosdonf y S. Murdd, mientras trabajaban en la escuela de Medicina de la Universidad de Pensilvania (179).

Durante la Segunda Guerra Mundial, los bancos de sangre norteamericanos, iniciaron la producción industrial de plasma humano liofilizado para el ejército, el cual mostró buenos resultados para conservarse, permitiendo que esta técnica fuera rápidamente aplicada a medicamentos, como la penicilina, que cambiaron la historia de las enfermedades infecciosas y la mortalidad de los soldados heridos. Posteriormente, la

técnica de liofilización por desecación se aplicó a diversos antibióticos, enzimas, sueros y vacunas con fines de prolongar su actividad terapéutica (179).

La liofilización se ha usado para lograr el secado de las formulaciones líquidas que contienen materiales proteicos termolábiles, con el propósito de brindarles estabilidad a largo plazo. Este proceso se ha realizado a través de técnicas de secado y de congelación, aunque esta última ha sido un poco ignorada. No obstante, las técnicas de liofilización por congelación son relevantes, ya que no afectan el rendimiento del proceso y la calidad del medicamento o producto (180).

La liofilización tradicional es un proceso que consta de tres pasos:

1. Congelación: es un proceso en la que la formulación líquida se enfría hasta que se inicie la nucleación del agua en hielo, permitiendo la formación de cristales de éste, favoreciendo la separación de la mayor parte del agua a partir de una matriz de solutos vítreos y/o cristalinos (180).
2. Secado primario: en esta fase, los cristales de hielo formados durante la congelación son eliminados por sublimación. Esto se realiza al exponer el producto a una presión, generada por el equipo liofilizador, que se encuentra por debajo de la presión de vapor del hielo, elevando la temperatura de éste. Se ha calculado que en promedio, al finalizar este proceso, que el producto aún puede contener de 15 a 20% de agua sin congelar, que se eliminará en la siguiente fase (180).
3. Secado secundario: es la fase en la que se elimina el agua restante, mediante la exposición del producto a una temperatura elevada –que no supere la temperatura a la que ocurre la desnaturalización– y baja presión, y, así, lograr el bajo contenido de humedad (180).

2.5.1 Fundamento de la técnica de liofilización por deshidrocongelación

La liofilización por deshidrocongelación o criodesecación, es aquel en el que se congela el suero (u otro medicamento) y, posteriormente, se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación (181). De esta manera, se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente, sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso, se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada. Entonces,

se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad y siendo fácilmente reconstituida en agua (179, 182).

2.5.2 Liofilización de los antivenenos antiofídicos

La liofilización de los antivenenos, es un proceso usado para mejorar la estabilidad de las inmunoglobulinas, la cual confiere a estas una mejor estabilidad en comparación con formulaciones líquidas, especialmente en regiones tropicales donde altas temperaturas pueden afectar la actividad de las inmunoglobulinas. Actualmente, el conocimiento sobre las condiciones del proceso de liofilización para los antivenenos antiofídicos es muy limitado. Son escasos los trabajos científicos sobre este tema, y algunos investigadores informaron tiempos de reconstitución de hasta 90 minutos para estas preparaciones (7, 183, 184), lo que podría implicar un retraso en el inicio de la terapia de antiveneno en el contexto clínico (7, 28, 185).

Los períodos prolongados de reconstitución pueden reflejar un proceso de liofilización inadecuado que puede favorecer la desnaturalización de anticuerpos y pérdida de actividad neutralizante (7, 186). No obstante, otros estudios mostraron que es posible producir antivenenos liofilizados de rápida reconstitución (7, 52) o acortar el tiempo de reconstitución, utilizando un método de reconstitución modificado (7, 187). Por lo tanto, hay una preocupación razonable acerca de si los antivenenos liofilizados exhiben los atributos deseados para las IgG (7).

Sin embargo, durante la liofilización, los anticuerpos pueden experimentar modificaciones físicas y químicas, que pueden causar cambios irreversibles y tener un impacto negativo en la actividad y agregación de proteínas, así como en la rehidratación del producto (7, 161, 162). La agregación es la principal evidencia de la degradación de anticuerpos (7, 188), que podría afectar la eficacia y seguridad de estas proteínas. Sin embargo, se sabe que este efecto podría evitarse durante la liofilización mediante la adición de excipientes como azúcares y polioles (7, 52, 53). Por lo descrito anteriormente, es fundamental escoger el proceso de liofilización y la formulación adecuada, así como incluir técnicas estandarizadas para formulaciones sólidas, tales como, la humedad residual y el tiempo de reconstitución (22).

En el estudio de Herrera et. al. se realizó una caracterización térmica y se evaluó la estabilidad de diferentes antivenenos liofilizados, formulados con sorbitol, sacarosa o

manitol, en la cual se vislumbró que los anticuerpos de los antivenenos conservaban su potencia neutralizante, pero la mayoría de las formulaciones presentaban desestabilización cuando se incubaban a 40 ° C durante seis meses, lo que exhorta la necesidad de formulaciones térmicas más estables (7, 52).

A continuación, en la tabla 2-10, se describen las ventajas y desventajas de la liofilización de los antivenenos, lo cual permite contemplar las posibilidades a futuro de este medicamento vital.

Tabla 2-10. Ventajas y desventajas de la Liofilización del SAP

Ventajas de la técnica de liofilización	Desventajas de la liofilización
<ul style="list-style-type: none"> • La temperatura a la que son sometidos los medicamentos, están por debajo de la temperatura que genera desnaturalización de la proteína. Favoreciendo estabilidad y conservación de las cualidades terapéuticas del mismo. • Se previene la pérdida de sustrato activo, dado que se disminuye el riesgo de volatilización • Se reducen los factores de riesgo de contaminación microbiana. • Se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y envasa a alto vacío. • La reconstitución por la adición de agua o del solvente adecuado suele ser sencilla. • El producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo productos de larga estabilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es un proceso costoso, dado que requiere equipos sofisticados, y personal entrenado para su uso. • Pueden presentarse factores de estrés al realizar la congelación, que pueden afectar la estabilidad de las proteínas como: desnaturalización fría, la formación de hielo y pérdida de la concentración deseada.

Adaptado de Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011; 78(2011):248-63.
Elaboración propia.

2.6 Técnicas para determinación de anticuerpos de antiveneno

2.6.1 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (E.L.I.S.A.)

El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas es un método analítico (cualitativo o cuantitativo) de inmunoensayo que depende de la unión Antígeno – Anticuerpo, que permite realizar la determinación de los mismos. Al inmovilizar el antígeno en una fase sólida y poniéndolo en contacto con el anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable (marcación), a través de un cambio de color, por ejemplo (sustrato en presencia de un cromógeno), éste puede ser detectado visualmente o mediante el uso de un espectrofotómetro (189, 190).

Existen diferentes tipos de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (E.L.I.S.A.) que se clasifican en (190):

- Directos
- Indirectos

Pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, según se requiera o no, la separación de las fracciones libres o ligadas para realizar la determinación de su actividad (189, 190).

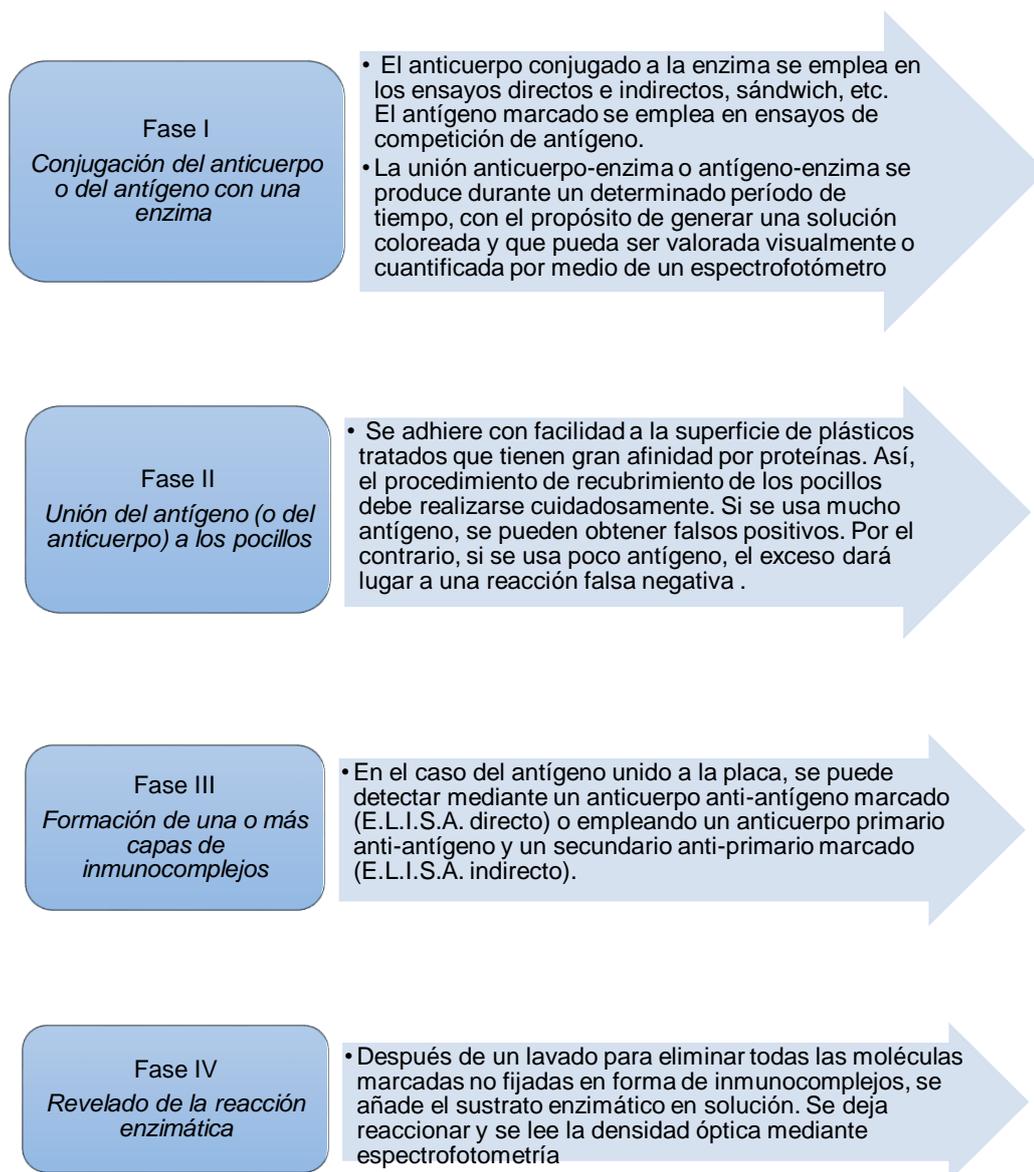
Sus principales ventajas, al ser seleccionado para la realización de ensayos *in vitro*, son su sensibilidad y detectabilidad, caracterizándose por su exactitud y precisión, lo que permite que puedan procesarse un número grande o pequeño de muestras manteniendo estándares de reproductibilidad y calidad (190).

2.6.1.1 Dispositivos empleados en E.L.I.S.A.

Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes hasta las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado, para aumentar su capacidad de adsorción (en su superficie) de moléculas, y con fondos de pocillo ópticamente claros que permitan realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores E.L.I.S.A. (189).

Los lectores E.L.I.S.A. son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa E.L.I.S.A. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores E.L.I.S.A. disponen de sistemas de filtros que solo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda, las que corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados. En la figura 2-11 se observan sus fases (189).

Figura 2-11. Fases de un ensayo E.L.I.S.A.



Fuente: Sino Biological Inc. Sándwich ELISA, Highly Sensitive ELISA Enciclopedia. 2014 [citado 2015].

Disponible en: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>.

Elaboración propia.

2.7 Técnicas para evaluación de ensayos de neutralización

Existen diferentes técnicas para evaluar la neutralización de la actividad toxica de un veneno, aquellas realizadas *in vivo*, que estudian la neutralización de los efectos sistémicos del veneno en el individuo, dirigidas a establecer la letalidad, y, aquellas realizadas *in vitro*, que analizan la neutralización de los efectos locales del veneno.

A continuación se describen las generalidades de estos dos tipos de técnicas, con el propósito de aproximar la intención del presente estudio y dará soporte para las bases del diseño y desarrollo metodológico.

2.7.1 Técnicas para evaluación de ensayos de neutralización *in vivo*

2.7.1.1 Dosis letal media o dosis letal 50%

La dosis letal 50% (DL₅₀) corresponde a una técnica, en la que se evalúa la cantidad de veneno requerido para producir la muerte del 50% de los animales de experimentación, después de un periodo de 24 a 48 horas (37). Esta técnica se realiza por inoculación intraperitoneal de dosis variables de cada veneno, diluido en 0.5 ml de solución salina en Buffer de fosfatos (PBS), pH 7.2, a un grupo seleccionado de ratones/dosis. La DL₅₀ se calcula por el método de Spearman-Kärber (14, 16, 191)

2.7.1.2 Dosis efectiva media o dosis efectiva 50%

La dosis efectiva media (DE₅₀) es una técnica en la que se evalúa la cantidad de antiveneno capaz de proteger o prevenir el envenenamiento, al 50% de los animales de experimentación, inyectados con una dosis letal 50% (37, 39). Esta técnica más frecuentemente utilizada por las instituciones productoras de antiveneno, para garantizar su efectividad²¹.

2.7.2 Técnicas para evaluación de ensayos de neutralización *in vitro*

2.7.2.1 Neutralización de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica del veneno está mediada principalmente por metaloproteinasas (192) y desintegrinas, que degradan los componentes proteicos de la membrana basal de la microvasculatura y, secundariamente, producen disrupción de células endoteliales favoreciendo la actividad hemorrágica (91, 114).

²¹ Existen otras técnicas sobre neutralización de las actividades específicas del veneno a estudiar, pero que para este documento no se tuvieron en cuenta. Se menciona la más importante.

El ensayo modificado de Wang evalúa la capacidad del antiveneno por neutralizar la actividad proteolítica que tiene el veneno. Este ensayo se define como la actividad proteolítica que se expresa en el cambio de absorbancia a 450 nm/90 minutos de incubación ($\Delta 450/90$ min). El sustrato para establecer la actividad proteolítica es la Azocaseína (193, 194).

2.7.2.2 Neutralización de la actividad coagulante

La actividad coagulante se lleva a cabo por serina-proteinasas tipo trombina y metaloproteinasas que activan los factores X y II de la cascada de coagulación (vía extrínseca). Éstas tienen una fuerte acción coagulante que consume el fibrinógeno y favorece la desfibrinación (91, 113). La neutralización de la actividad coagulante de los venenos es un método que pretende evaluar *in vitro* la degradación de los factores de coagulación (22), que se verá reflejado como la prolongación del tiempo de coagulación, ya que el veneno es incapaz de producir su actividad coagulante sobre una muestra de plasma fresco.

Es una técnica muy sencilla, que no requiere ser realizado por un experto, económica, precisa y da resultados muy similares a los obtenidos en ensayos *in vivo* (195). Éstos pueden realizarse para cuantificar la actividad del veneno sobre la trombina usando, como sustratos, el fibrinógeno bovino o el plasma humano (196).

La Dosis Mínima Coagulante (MCD) de un veneno, se define como la menor cantidad de veneno (en peso seco mg/L de solución de ensayo o $\mu\text{g/ml}$) que coagula o bien una solución de fibrinógeno bovino (2 g/l) en 60 s a 37° C (MCD-F) y/o una solución estándar de plasma humano con citrato (contenido de fibrinógeno 2,8 g/l), en las mismas condiciones (MCD-P) (22).

Con el propósito de estimar la capacidad del antiveneno para neutralizar la actividad coagulante de veneno, se prepara una dosis de reto de veneno, así como mezclas de una concentración fija de veneno y diversas diluciones de antiveneno. Las dosis de ambos son incubadas a 37°C durante 30 minutos, se le añaden alícuotas de solución de fibrinógeno o plasma y se observa si ocurre la formación o no de coágulos en un período máximo de 30 minutos. El volumen mínimo de antiveneno que impide completamente la coagulación se estima y corresponde a la dosis MCD-efectiva (22).

2.7.2.3 Neutralización de la actividad hemolítica indirecta

La actividad hemolítica está directamente relacionada con actividad enzimática de la fosfolipasa A2 (PLA2), dado que ésta puede generar la disrupción de las membranas de los glóbulos rojos. Al evaluar la capacidad de neutralización hemolítica indirecta, se puede observar si hay ruptura de eritrocitos. La prueba se define como la Dosis Hemolítica Indirecta Mínima (DHmi) del veneno de serpiente, que genera un halo de hemólisis de 20 mm de diámetro, después de 20 horas de incubación en una muestra de agarosa-yema de huevo-eritrocitos (68, 197).

Finalmente, una vez se ha abordado la causa del problema de investigación y los soportes que permiten el acercamiento a él, es posible generar una aproximación al objeto de estudio para evaluar el efecto de la variación en la temperatura de almacenamiento sobre las características físicas y la capacidad neutralizante de algunas de las actividades del veneno de *B. asper*, en las formas farmacéuticas de los antivenenos polivalentes almacenados durante un período de 3 y 6 meses, producidos en Colombia. En el siguiente capítulo, se expondrá el diseño metodológico de esta investigación.

3 Metodología

3.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio exploratorio-experimental-analítico-prospectivo, en el cual se manipuló la forma de preservación del SAP producido por el Instituto Nacional de Salud (INS), al liofilizarlo mediante secado por congelación. Con el fin de evaluar la capacidad de neutralización, comparando la forma de preservación líquida y liofilizada del SAP producida por el INS vs. el SAP de Laboratorios Probiol®. Se almacenaron a 3 temperaturas específicas (4, 22 y 45°C), por dos períodos de 3 y 6 meses. Éstas fueron seleccionadas teniendo en cuenta la temperatura de almacenamiento sugerida por el fabricante, la temperatura media en Colombia (72)²² y la temperatura máxima en la cual podría existir desnaturalización de las inmunoglobulinas del SAP.

A continuación, se expresa como se denominaron los tratamientos en la tabla 3-1.

Tabla 3-1. Designación del nombre de los tratamientos

SAP	Temperatura		
	4°C	22°C	45°C
Forma comercial Instituto Nacional de Salud	INS 4°C	INS 22°C	INS 45°C
Forma liofilizada Instituto Nacional de Salud (tratada en esta investigación)	INS_L 4°C	INS_L 22°C	INS_L 45°C
Forma comercial de Probiol	Probiol 4°C	Probiol 22°C	Probiol 45°C

Fuente: Elaboración propia.

3.1.1 Obtención del veneno de serpientes

No se realizaron procedimientos de ordeño, ya que el laboratorio de Ofidismo y Escorpionismo de la Universidad de Antioquia, cuenta con su propio banco de venenos.

²²El estudio realizado por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) para el período de 1971-2010, analizó el comportamiento promedio y las tendencias de largo plazo de la temperatura máxima media para las regiones hidroclimáticas de Colombia, arrojando como resultado que la temperatura media fue de 22,85°C y la máxima de 36,3°C (72).

El veneno empleado correspondió a ejemplares adultos de la serpiente *Bothrops asper*, representativo para las regiones de Magdalena Medio, Nordeste de Antioquia, Urabá, Bajo Cauca y Costa Pacífica.

Estos venenos se conservaron liofilizados a una temperatura de -20°C hasta su uso. Para los estudios de neutralización, se utilizó el veneno de la especie referida, ya que esta especie es la serpiente venenosa de mayor representación clínica y epidemiológica en Colombia y contra la cual los SAP evaluados tienen capacidad neutralizante (véase el apartado 2.3.1).

3.1.2 Adquisición de antivenenos

En este estudio se compró el SAP de INS directamente y el de Laboratorios Probiol® se obtuvo mediante un distribuidor. Se compraron 6 ampolletas de cada producto. INS lote N°14SAPO2 con fecha de vencimiento septiembre/2018 y Laboratorios Probiol® lote N°AP026VI 15-ES con fecha de vencimiento junio/2017. No se incluyó SAP producido en otros países (Instituto Clodomiro Picado-Costa Rica, Instituto Butantan-Brasil, Instituto Bioclón-México), dado que la recomendación para la producción de SAP por la OMS indica que éstos deben ser fabricados preferiblemente con especies de serpientes autóctonas de la región geográfica afectada (56) .

Las consideraciones para la adquisición del SAP dentro del estudio, por las que se tomó la decisión de adquirir un número limitado de viales de antiveneno, están relacionadas con:

1. Entre 2015 y 2016, Colombia enfrentaba una situación de Emergencia Sanitaria por desabastecimiento de los antivenenos producidos en el país. Esta investigación inició en este mismo período, por lo cual se tuvo dificultades para la obtención de diversos lotes.
2. Teniendo en cuenta la situación de Emergencia Sanitaria a nivel nacional, como consideración ética en esta investigación, se propuso usar la cantidad estrictamente necesaria para realizar las actividades propuestas, cumpliendo así los objetivos planteados. Dado que en Colombia, el SAP puede considerarse un medicamento vital no disponible en periodos de Emergencia Sanitaria.

3. Laboratorios Probiol[®], en este período, no contaba con Registro INVIMA vigente, por lo que esta condición limitaba la distribución y obtención de ampollas del SAP.
4. Para minimizar el sesgo por interés particular de terceros dentro de la investigación se evitó en lo posible la influencia institucional de alguno de los fabricantes, por lo que no se estableció comunicación o contacto con el INS o Laboratorios Probiol[®], para financiar o donar los Lotes de los SAP.
5. Considerando los altos costos de las unidades de SAP y la limitación financiera del estudio, se adquirieron las cantidades necesarias para la investigación conforme consideraciones del modelo metodológico.

3.2 Liofilización del antiveneno Líquido

El antiveneno del Instituto Nacional de Salud su fórmula farmacéutica es líquida, por lo que en esta investigación, se liofilizó con el propósito de lograr un factor de comparación real entre formulaciones liofilizadas.

La liofilización del SAP del INS, se realizó tomando 3 ampolletas, las cuales se dividieron a la mitad cada una, dejando la ampolleta original con 5ml, y el volumen restante en un vial estéril. Esto se llevó a cabo para garantizar que hubiera 2 muestras del SAP para ser almacenados a 3 y 6 meses.

Los 6 viales resultantes se cargaron en un liofilizador LABCONCO, se congelaron a -40°C y fueron llevadas a -10°C durante 4 horas. El secado primario se hizo a -20° C durante 48 horas y el secado secundario a 30° C durante 4 h.

3.3 Distribución de grupos y Almacenamiento del SAP

Se realizó a un muestreo no probabilístico (198)²³, en el que se optimizó el uso del contenido de cada ampolleta del lote por fabricante.

²³ Es una técnica en la que no se pueden aleatorizar las muestras, por lo tanto los resultados no son generalizados para todos los individuos de una población, sino que responde a la búsqueda de la representatividad evaluando o midiendo la cantidad de unidades a las que se puede acceder con facilidad (198).

La distribución de los tres grupos de tratamientos se realizó teniendo en cuenta las tres temperaturas de almacenamiento. De esta manera, se consolidan nueve grupos para cada ensayo obteniendo un total de 18 tratamientos almacenados, así:

Tabla 3-2. Distribución de los grupos de tratamientos a las tres temperaturas para el Ensayo 1 y 2, respectivamente.

		Temp. 1	Temp. 2	Temp. 3
		4 °C	22°C	45°C
Tratamiento 1	INS	5ml de amp. usados	5ml de amp. Usados	5ml de amp. Usados
Tratamiento 2	INS_L	5ml de amp. usados	5ml de amp. Usados	5ml de amp. usados
Tratamiento 3	Probiol	10ml de amp. usados	10ml de amp usados	10ml de amp. usados

Pruebas: 1. Determinación de títulos de anticuerpos por técnica de E.L.I.S.A.; 2. Ensayos de neutralización de actividad proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta; 3. SDS-PAGE.

Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta que se realizaron dos ensayos a los 18 tratamientos, las fechas de almacenamiento corresponden: Ensayo 1, se almacenó desde el 18 de enero al 18 de abril (3 meses), las pruebas de laboratorio se tomaron en las tres semanas siguientes (19 de abril al 6 de mayo/2016); Ensayo 2, se almacenó desde el 18 de enero hasta el 18 de julio (6 meses), las pruebas de laboratorio se tomaron en el mismo período anterior (19 de julio al 5 de agosto/2016).

Los antivenenos (INS, INS_L y Probiol) fueron almacenados en completa oscuridad, se etiquetaron las ampollas indicando fecha de almacenamiento y temperatura a almacenar. Posteriormente se prepararon 3 cajas para el almacenamiento de las ampollas a las temperaturas de 4, 22 y 45°C como se visualiza en la tabla 3-3.

Tabla 3-3. Almacenamiento del SAP

Lugar de almacenamiento	Temperatura	# Ampolletas INS	# Ampolletas INS_L	# Ampolletas Probiol
Nevera - lab. Ofidismo	4°C	1 (10ml c/u)	2 (5ml c/u)	2 (10ml c/u)
lab. Ofidismo a temperatura controlada	22° C	1 (10ml c/u)	2 (5ml c/u)	2 (10ml c/u)
Incubadora de serpentario UdeA	45°C	1 (10ml c/u)	2 (5ml c/u)	2 (10ml c/u)

Fuente: Elaboración propia.

3.4 Reconstitución de los SAP Liofilizados (INS_L y Probiol)

El proceso de reconstitución de los SAP se realizó una vez terminó cada período de almacenamiento (3 y 6 meses). El procedimiento a seguir fue así: para INS_L se reconstituyeron con 5ml de agua estéril (mismo volumen liofilizado) y, para Laboratorios Probiol[®], se reconstituyeron con 10ml de agua estéril, según las recomendaciones del productor. Se hidrató el producto por 2 minutos y luego se agitó suavemente con la mano. El tiempo requerido para lograr la disolución completa se registró (horas, minutos y segundos).

3.5 Caracterización de los cambios físicos de los SAP's

Se evaluó los cambios físicos observados posterior a la reconstitución, siendo tenidos en cuenta: coloración, turbidez y precipitación. Las dos primeras características, se evaluaron de acuerdo a los cambios visuales, y la precipitación se evaluó al centrifugar los SAP's a 5000 rpm durante 10 minutos.

3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida de los SAP's

El análisis electroforético de los SAP's incubados se realizó en SDS-PAGE en condiciones reducidas. Se preparó cada una de las muestras (INS, INS_L y Probiol para cada una de las temperaturas 4, 22 y 45°C) en una dilución así:

- 10µL SAP + 10µL SSN + 20µL Buffer de muestra a los 3 meses (para geles al 7.5%).
- 3µL SAP + 17µL SSN + 20 µL Buffer de muestra a los 6 meses (para geles al 10%)²⁴.

Posteriormente, se realizó la preparación de los geles según la técnica de Laemmli, se sembraron las muestras a las concentraciones descritas (20µL por carril) y se corrieron a 120v durante 60 minutos. Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 (199).

²⁴ Se usaron 2 concentraciones para los geles y de la muestra, dado que aquellos que fueron preparados a los 3 meses, se observó que el bandedo electroforético no se lograba apreciar adecuadamente.

3.7 Determinación de títulos de anticuerpos por el método de E.L.I.S.A

Se tomaron platos de 96 pozos, se incubaron toda la noche a 4°C con 4000 ng/ml de veneno de *B. asper* diluido en buffer de pegado, se lavaron, se les adicionó solución de bloqueo y se lavaron nuevamente. Se les adicionó 100µL de diluciones variables de los antivenenos y se incubaron por 2 horas a 37°C, se lavaron. Se les adicionó 100µL de IgG marcada con peróxidasa anti-IgG de caballo en una dilución 1:8000, los platos se incubaron nuevamente por 2 horas a 37°C y se lavaron. Finalmente, se les adicionó OPD con peróxido de hidrógeno y tampón de citrato. Se protegió de la luz incubando a 37°C por 15 minutos, se les adicionó 50µL de solución de pare y se leyó la absorbancia a 492nm (200).

3.8 Ensayos de neutralización *in vitro*

3.8.1 Neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de *B. asper*

Se prepararon mezclas de 10 µg del veneno de *Bothrops asper* con dosis variables del antiveneno²⁵ en un volumen de 20 µL de Tris-HCl pH 7,4; a las cuales se les adicionó 100 µL de una solución de azocaseína (10 mg/ml) y se incubaron por 90 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con la adición de 200 µL de ácido tricloroacético (5%). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 2500 rpm/5 min, se tomaron 100 µL del sobrenadante, depositándolos en microplatos de 96 hoyos y se le agregó 100 µL NaOH (0,5 M) y se leyó la absorbancia a 450nm. Se procesó como control positivo el veneno y como control negativo el antiveneno, según la técnica modificada de Wang (194). Los resultados se expresaron como el porcentaje de neutralización del efecto proteolítico, tomando como referencia la absorbancia obtenida para el veneno como el 100% de la actividad proteolítica²⁶. Los resultados que se escogieron para el análisis estadístico fueron aquellos en los que el antiveneno fue capaz de neutralizar el 50% o más de la actividad del veneno (DE₅₀). Se realizaron ensayos por triplicado, para cada SAP

²⁵ Se realizaron mezclas de Antiveneno-Veneno, teniendo como dosis de reto 10 µg del veneno. Éstas fueron llevadas a soluciones como: 500µL SAP/ 20µgV, 500µL SAP/ 10µgV, 1000µL SAP/ 20µgV y 1000µL SAP/ 10µgV. La DE₅₀ se obtuvo en una solución de la mezcla Antiveneno/Veneno 1000µL SAP/ 10µgV

²⁶ El porcentaje de inhibición o neutralización de la actividad proteolítica del veneno se calcula mediante la siguiente fórmula: $100 - \left(\frac{A_{\lambda} AV/V \times 100}{A_{\lambda} \text{ veneno} - A_{\lambda} \text{ antiveneno}} \right)$. * A_λ=absorbancia. AV= antiveneno. V=veneno. AV/V= solución de AV y V.

evaluado se obtuvieron 8 observaciones a los 3 meses de almacenamiento y 7 observaciones a los 6 meses, para un total de 135 observaciones para ambos periodos de almacenamiento.

3.8.2 Neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de *B. asper*

Se realizó mezclando 300 μL de plasma humano citratado (3,9 g/dL), con 50 μL de una solución que contenía 1 μg de veneno de *B. asper* con cantidades variables del antiveneno en buffer SSN (200) y se registró el tiempo de coagulación del plasma mediante coagulómetro. Se utilizó el antiveneno y el veneno solos cada uno, como controles negativo y positivo, respectivamente (195). La DE_{50} de antiveneno es aquella la dosis que incrementó el tiempo de coagulación en tres veces el tiempo del control positivo (veneno solo). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.8.3 Neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper*

Se prepararon mezclas de 2 μg de veneno de *B. asper* (una dosis hemolítica mínima) con dosis variables del antiveneno y disueltas en SSN; se incubaron por 30 minutos, y se adicionaron a platos previamente preparados con agarosa-yema de huevo-eritrocitos (68), los cuales se incubaron en una cámara húmeda por 20 horas a 37 °C. En seguida, se midió el diámetro del halo de hemólisis. Se utilizó SSN y el veneno solo como control negativo y positivo, respectivamente. La DE_{50} fue aquella dosis de antiveneno que redujo en un 50% la hemólisis inducida por el veneno solo (100% de hemólisis). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por el grupo de Consultoría Estadística del Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Con el fin de dar respuesta a los objetivos propuestos en la investigación, se establecieron varios procedimientos estadísticos, entre ellos el muestreo no probabilístico, análisis estadístico descriptivo, regresión beta, modelo lineal generalizado con respuesta Gamma y Análisis de Varianza Múltiple (MANOVA), teniendo en cuenta las propiedades de las variables de interés:

- Potencial de neutralización proteolítico. Para esta variable se ajustó un modelo de regresión Beta (201) con función de enlace log y con variables explicativas: temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento y forma de preservación. Lo anterior, debido a que dicha variable es un porcentaje y toma valores entre cero y uno.

Para el análisis de esta variable, se tomaron 135 observaciones, las cuales se distribuyeron así:

Tabla 3-4. Distribución de las observaciones para el potencial de neutralización de la actividad proteolítica del veneno de *B. asper*

	3 meses			6 meses		
Temperatura	4	22	45	4	22	45
INS	8	8	8	7	7	7
INS_L	8	8	8	7	7	7
PRO	8	8	8	7	7	7

Fuente: Elaboración propia. Véase informe estadístico

Mediante el modelamiento de datos²⁷, se calculó los porcentajes de neutralización proteolíticos promedio estimados por tratamiento (véase Tabla 3-5), a los que se les aplicó el cociente de respuestas medias para evaluar los contrastes de las diferentes variables, por ejemplo INS vs. INS_L (Tiempo 3). Luego, se disgregaron los resultados por los siguientes contrastes: SAP vs. tiempo de almacenamiento; temperatura vs. tiempo de almacenamiento; y, forma de preservación vs. tiempo vs. Temperatura.

²⁷ Al modelo de regresión *Beta*, se le aplicó verificación de supuestos y análisis de influencia; en el cual se valoró las interacciones entre las variables forma de preservación, tiempo y temperatura de almacenamiento. Véase modelamiento de datos en apartado de anexos, Consultoría estadística Caso I, realizado por la Consultoría Estadística del Departamento de estadística de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 3-5. Porcentajes de neutralización de las actividades proteolíticas contra el veneno de *B. asper* promedio estimadas

Tratamiento	Tiempo	Preservación	Temperatura	$\hat{\mu}_k$
1	3	INS	4	0.873356
2	6	INS	4	0.863510
3	3	INS_L	4	0.664195
4	6	INS_L	4	0.852663
5	3	PRO	4	0.556567
6	6	PRO	4	0.630214
7	3	INS	22	0.825262
8	6	INS	22	0.844207
9	3	INS_L	22	0.627619
10	6	INS_L	22	0.833602
11	3	PRO	22	0.525917
12	6	PRO	22	0.616126
13	3	INS	45	0.684832
14	6	INS	45	0.845831
15	3	INS_L	45	0.520820
16	6	INS_L	45	0.835205
17	3	PRO	45	0.436425
18	6	PRO	45	0.617311

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

- Potencial de neutralización coagulante. Para esta variable se ajustó un modelo lineal generalizado con respuesta Gamma y función de enlace log, con variables explicativas: temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento, forma de preservación. Lo anterior, debido a que la variable es continua y toma valores positivos.

Para el análisis de esta variable, se tomaron 72 observaciones, las cuales se encuentran distribuidas así:

Tabla 3-6. Distribución de las observaciones para el potencial de neutralización de la actividad coagulante del veneno de *B. asper*

Temperatura	3 meses			6 meses		
	4	22	45	4	22	45
INS	6	6	6	3	3	3
INS_L	3	3	3	3	3	3
PRO	6	6	6	3	3	3

Fuente: Elaboración propia. Véase informe estadístico.

Mediante el modelamiento de datos, se calculó la Razón de neutralización coagulante²⁸ contra el veneno de *B. asper* estimada por tratamiento (véase tabla 3-7), en el cual se les aplicó el cociente de respuestas medias para evaluar los contrastes de las diferentes

²⁸Número de veces que se triplica el tiempo de coagulación en relación al control positivo (veneno)

variables, por ejemplo INS vs. INS_L (Tiempo 3 - Temp 4). Posteriormente se disgregaron los resultados por contrastes.

Tabla 3-7. Razón promedio esperada de neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de *B. asper* estimada por tratamiento

Tratamiento	Tiempo	Preservación	Temperatura	$\hat{\mu}_k$
1	3	INS	4	31.1004
2	6	INS	4	22.0378
3	3	INS_L	4	11.4687
4	6	INS_L	4	16.1849
5	3	PRO	4	3.5483
6	6	PRO	4	5.0075
7	3	INS	22	31.8495
8	6	INS	22	44.9468
9	3	INS_L	22	9.8667
10	6	INS_L	22	35.0288
11	3	PRO	22	2.8154
12	6	PRO	22	1.6894
13	3	INS	45	14.0208
14	6	INS	45	19.7865
15	3	INS_L	45	9.9982
16	6	INS_L	45	35.4560
17	3	PRO	45	2.8018
18	6	PRO	45	5.3899

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

Se describe el cociente de respuestas medias a continuación, por ejemplo el cociente de respuestas medias estimadas para el contraste INS Vs INS_L (Ti 3 - Tem 4) es:

$$\frac{\text{Respuesta media estimada de INS_L}(Ti\ 3 - Tem\ 4)}{\text{Respuesta media estimada de INS}(Ti\ 3 - Tem\ 4)}$$

- Potencial de neutralización hemolítico indirecto. Para esta variable se realizó un análisis netamente descriptivo, teniendo en cuenta la falta de variabilidad en el porcentaje del diámetro de la hemólisis, lo que indica que el proceso en estudio se acerca más a un proceso determinístico que a un proceso aleatorio.

Para esta variable se analizaron 102 observaciones, las cuales se encuentran distribuidas así:

Tabla 3-8. Distribución de las observaciones para el potencial de neutralización de la actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. asper*

Temperatura	3 meses			6 meses		
	4	22	45	4	22	45
INS	6	4	6	6	6	6
INS_L	6	4	6	6	6	6
PRO	6	4	6	6	6	6

Fuente: Elaboración propia. Véase informe estadístico.

Los métodos anteriores fueron seleccionados frente a posibles diseños experimentales con respuesta normal, debido a que éstos requerían transformaciones que dificultan la interpretación de los resultados en la variable original de interés, es decir, el potencial de neutralización de las actividades hemolítica indirecta, coagulante y proteolítica contra el veneno de *B. asper*.

Con respecto al cuarto objetivo específico, se realizó un Análisis de Varianza Múltiple (MANOVA), con dos factores con sus respectivos niveles (Temperatura y Tiempos de preservación), la interacción y un bloque (Modo de preservación).

Para esta variable se analizaron 324 observaciones repartidas así: en 3 bloques correspondientes a los SAP's hubo 108 por cada uno; al interior de cada bloque se obtuvo por tiempo de almacenamiento (3 y 6 meses) se dieron 54 observaciones; y, por cada temperatura (4,22 y 45°C) hubo dos réplicas con 18 observaciones, para cada una. A continuación se presenta la tabla 4-13, que ejemplifica la distribución para una variable respuesta:

Tabla. 3-9. Ejemplificación de la distribución para una variable respuesta

	TÍTULO A 4.000					
	3 meses			6 meses		
Temperatura	4	22	45	4	22	45
INS	2	2	2	2	2	2
INS_L	2	2	2	2	2	2
PRO	2	2	2	2	2	2

Fuente: Elaboración propia. Véase Informe estadístico.

Para el análisis de los datos y el ajuste de los diferentes modelos se usó el software estadístico R versión 3.3.0, licencia GNU versión 3 (202). Para los cambios observados de las características físicas, no se realizó análisis estadístico sino una descripción de los hallazgos evidenciados.

3.10 Definición operacional de las variables

Variable	Definición	Operalización	Tipo	Escala	Instrumento
Títulos de anticuerpos de antiveneno	Máxima dilución del antiveneno problema que arroja un resultado positivo. Prueba de E.L.I.S.A. IgG marcada con peróxidasa contra anti-IgG de caballo	Absorbancia	Cuantitativa	Razón	E.L.I.S.A.
Potencial de neutralización proteolítico	La cantidad de antiveneno necesario para producir la mitad de la respuesta máxima. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición del efecto proteolítico, tomando como referencia la absorbancia obtenida para el veneno solo como 100% de actividad. La dosis eficaz 50 fue la que redujo en 50% la actividad del veneno. Los ensayos se realizaron por triplicado	% del valor de absorbancia en cada muestra respecto al control positivo	Cuantitativa	Intervalo	Espectrofotometría
Potencial de neutralización coagulante	La dosis eficaz de antiveneno es la dosis que incrementó el tiempo de coagulación en tres veces el tiempo del control positivo (veneno solo)	Tiempo de coagulación razón de número de veces que se prolongó el tiempo de coagulación con respecto al control positivo	Cualitativa	Intervalo	Coagulómetro
Potencial de neutralización hemolítico indirecto	La dosis eficaz fue aquella dosis de antiveneno que redujo en un 50% la hemólisis inducida por el veneno solo (100% de hemólisis)	% del diámetro de hemólisis en cada agarosa-yema de huevo eritrocitos respecto al control positivo	Cualitativa	Intervalo	Regla milimétrica
Temperatura de exposición	Es una magnitud escalar que indica la intensidad de calor o frío de un cuerpo, ambiente o un objeto, y que se mide en grados centígrados por un termómetro.	Temperatura de almacenamiento de los antivenenos en grados centígrados - 4 grados - 22 grados - 45 grados	Cuantitativa	Razón	Termómetro
Tiempo de almacenamiento	Medida en meses del tiempo que duraron almacenados los antivenenos desde el inicio del estudio, hasta seis meses. Todos con fecha de vencimiento vigente	Número de meses - 3 meses - 6 meses	Cuantitativa	Intervalo	Reloj
Coloración	La impresión producida por un tono de luz en los órganos visuales.	Si se presentó un cambio en el color del antiveneno durante el tiempo de almacenamiento	Cualitativa	Nominal	Investigador
Precipitación	La formación de elementos sólidos a partir de una solución por acción de la fuerza centrífuga	La presencia de elementos sólidos después de la centrifugación - Si (1) - No (0)	Cualitativa	Nominal	Investigador
Turbidez	La falta de transparencia de un líquido debido a la presencia de partículas en suspensión	Perdida de la transparencia de forma comparativa con la presentación farmacéutica inicial durante el tiempo de almacenamiento - Si (1) - No (0)	Cualitativa	Nominal	Investigador

4 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos en esta investigación, teniendo en cuenta todo el procedimiento y desarrollo metodológico, partiendo del almacenamiento de los Sueros Antiofídico Polivalentes (SAP) en el Ensayo 1 y 2. Es necesario recordar que se tiene un lote por cada fabricante de SAP, a saber: Instituto Nacional de Salud y Laboratorios Probiol®. Para efectos comparativos, parte de las ampollas seleccionadas, producidas por el INS, se liofilizaron (INS_L). Posteriormente, los viales de ambos fabricantes y los modificados aquí, una vez venció su período de almacenamiento, fueron reconstituídos (INS_L y Probiol) para el análisis de las variables de estudio.

4.1 Comparación de la evaluación de cambios físicos de los antivenenos almacenados a diferentes temperaturas por 3 y 6 meses

Los cambios físicos tenidos en cuenta para evidenciar el efecto de la variación de la temperatura de almacenamiento fueron: la coloración, la turbidez y la precipitación, estos se evaluaron cualitativamente, al concluir cada período previo al análisis de las otras variables de este estudio.

4.1.1 Coloración

Los cambios en la coloración se pueden encontrar en la Tabla 4-1. Se observa que al modificar la temperatura de almacenamiento INS 45°C y Probiol 45°C presentaron cambio de ésta, tomando una coloración blanquecina y ocre, respectivamente, en el Ensayo 1 y 2. Sin embargo, no se observó un efecto de la temperatura o el tiempo de almacenamiento sobre INS_L, pues no presentó cambios de la coloración. Estos cambios pueden ser evidenciados en las figuras 4-1, 4-2 y 4-3.

Tabla 4-1. Cambios de la coloración del SAP según temperatura y tiempo de almacenamiento

Temperatura de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento					
	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
	4°C		22°C		45°C	
INS	incoloro	incoloro	Incoloro	incoloro	Blanco	Blanco
INS_L	incoloro	incoloro	Incoloro	incoloro	Incoloro	Incoloro
Probiol	amarillo	amarillo	Amarillo	amarillo	Ocre	Ocre

Fuente: Elaboración propia.

4.1.2 Turbidez

Se observa que al modificar la temperatura de almacenamiento hay turbidez de todos los SAP almacenados a 45°C, a los 3 y 6 meses, comparándolos con los almacenados a 4 y 22°C, siendo INS 45°C el que mostró mayor turbidez. Llama la atención que Probiol 45°C, a los 3 meses de almacenamiento, presentó ligera turbidez vs. a los 6 meses de almacenamiento. Estos cambios pueden ser visualizados en las figuras 4-1, 4-2 y 4-3.

Tabla 4-2. Cambios de la turbidez del SAP según temperatura y tiempo de almacenamiento

SAP	Temperatura de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento					
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
		4°C		22°C		45°C	
	INS	no turbio	no turbio	no turbio	no turbio	Turbio	Turbio
	INS_L	no turbio	no turbio	no turbio	no turbio	ligeramente turbio	ligeramente turbio
	Probiol	no turbio	no turbio	ligeramente turbio	no turbio	Turbio	Ligeramente turbio

Fuente: Elaboración propia.

4.1.3 Precipitación

Como se observa en la tabla 4-3, al modificar la temperatura de almacenamiento hay precipitación de los SAP: Probiol 45°C almacenado por 3 y 6 meses e INS_L 45°C a los 6 meses. Haciendo la comparación con los demás grupos, se obtiene que INS no presenta precipitados a pesar del cambio de temperatura. Estos cambios pueden ver reflejados en las figuras 4-1, 4-2 y 4-3.

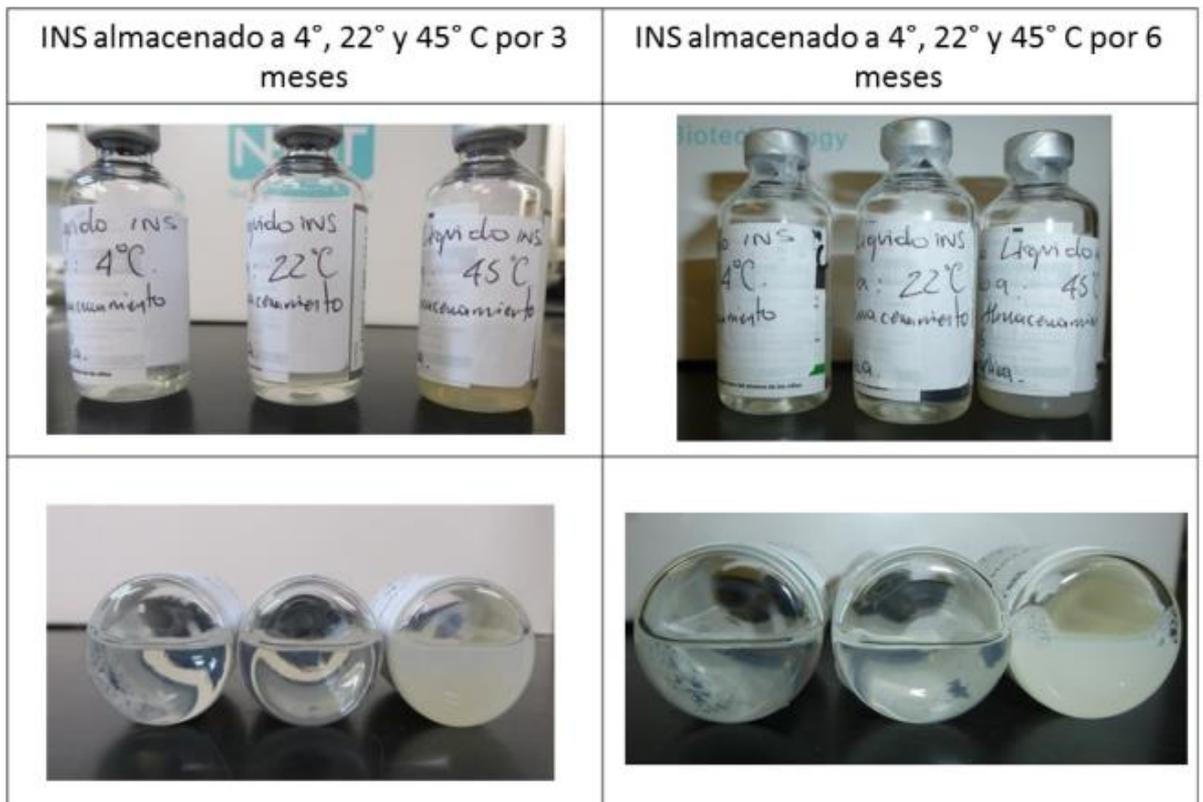
Tabla 4-3. Precipitación del SAP según temperatura y tiempo de almacenamiento

		Tiempo de almacenamiento					
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Temperatura de almacenamiento		4°C		22°C		45°C	
SAP	INS	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado
	INS_L	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	con precipitado
	Probiol	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	sin precipitado	Con precipitado	Con precipitado

Fuente: Elaboración propia.

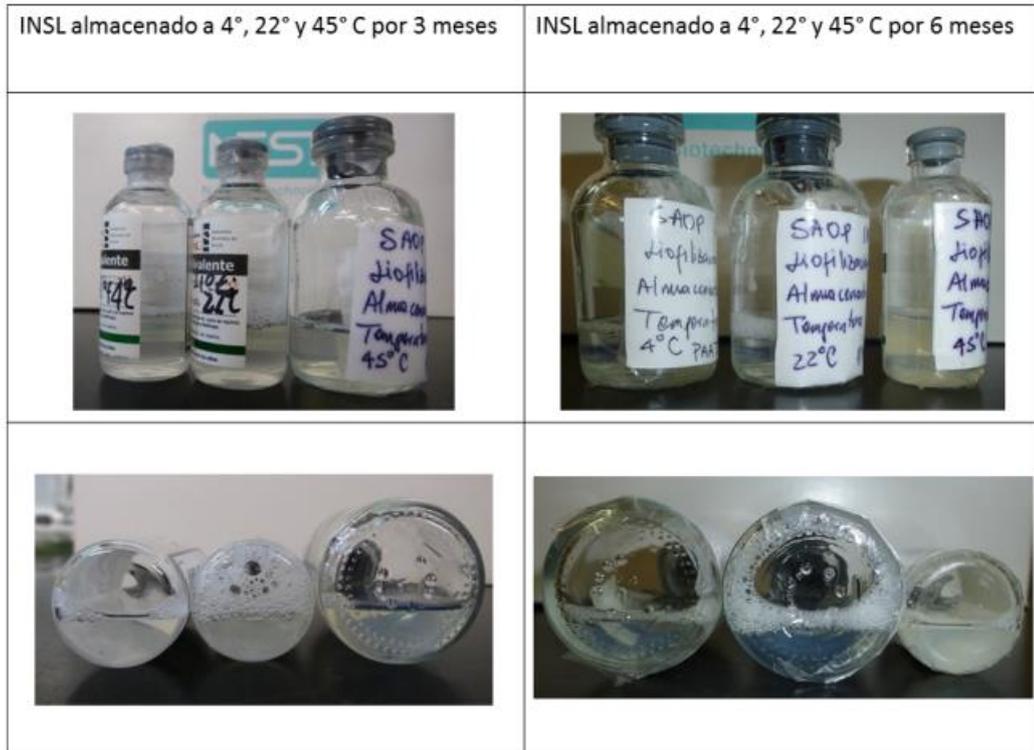
En la figura 4-1, 4-2 y 4-3 se presentan las imágenes de los SAP donde se evidencian los cambios físicos previamente descritos.

Figura 4-1. INS almacenado a 3 y 6 meses en las diferentes temperaturas



Fuente: Elaboración propia.

Figura 4-2 INS_L almacenado a 3 y 6 meses en las diferentes temperaturas



Fuente: Elaboración propia.

Figura 4-3. Probiol almacenado a 3 y 6 meses en las diferentes temperaturas



Fuente: Elaboración propia.

4.2 Tiempo de reconstitución de los SAP liofilizados a los 3 y 6 meses

El antiveneno de Probiol requirió un tiempo prolongado de reconstitución (1h 20 min a 2h 10 min) al compararse con INS_L (0 s a 2 min 25 s). Teniendo en cuenta que se usó la temperatura de almacenamiento recomendada por el fabricante ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), según lo estipulado por la Resolución 3690 de 2016 (73), entonces, no es posible adjudicar el tiempo en que tarda su reconstitución al cambio de temperatura extrema. Mientras que el comportamiento de INS_L demostró mayor eficiencia al reconstituirse en tiempos menores a 3 minutos, en los distintos períodos de almacenamiento. Véase la tabla 4-4.

Tabla 4-4. Tiempo de hidratación de los SAP liofilizados a los 3 y 6 meses

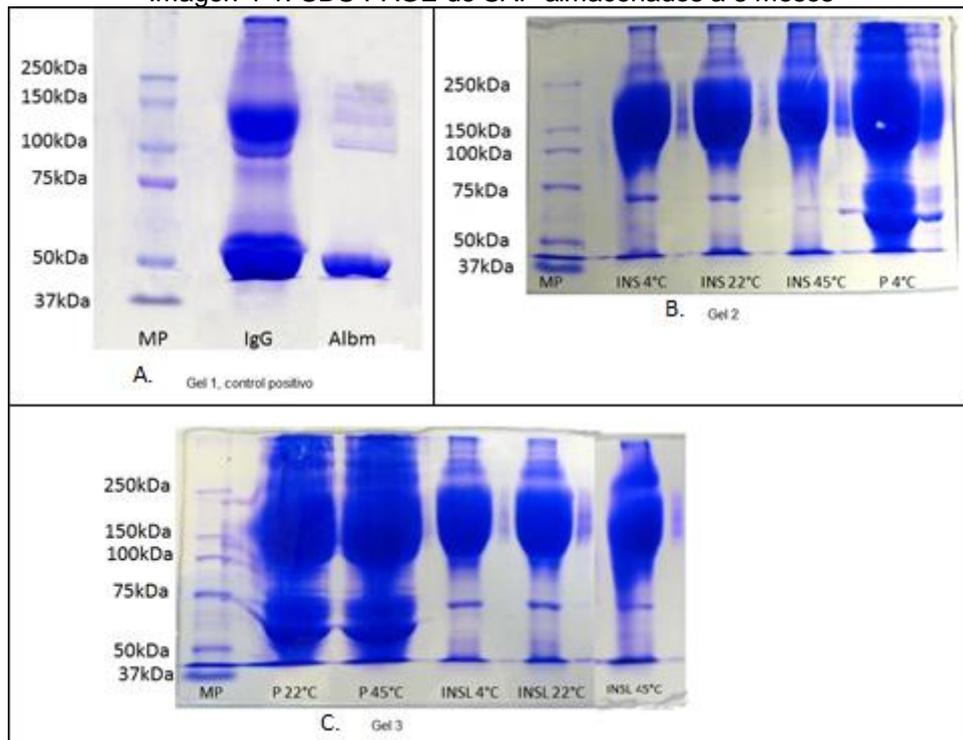
		Tiempo de almacenamiento					
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
		4°C		22°C		45°C	
SAP	Temperatura de almacenamiento						
	INS_L	0 s	30 s	0 s	32 s	0 s	2min – 25 s
	PROBIOL	1h - 25 min	1h - 21 min 58 s	1h - 20 min	1h - 54 min- 56s	1h - 30 min	2h - 10 min – 41s

Fuente: Elaboración propia.

4.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida de SAP almacenados a 3 y 6 meses

Se realizó un control positivo de una Inmunoglobulina (IgG) de ratón y de albúmina, con el fin de establecer el bandeo electroforético de control, en donde se evidencia cualitativamente el peso molecular de la inmunoglobulina y de la albúmina. A los 3 y 6 meses de almacenamiento, se procesaron 3 geles en los cuales se distribuyó cada uno de los SAP a las diferentes temperaturas, que se observan en la Imagen 4-1 y 4-2.

Imagen 4-1. SDS-PAGE de SAP almacenados a 3 meses

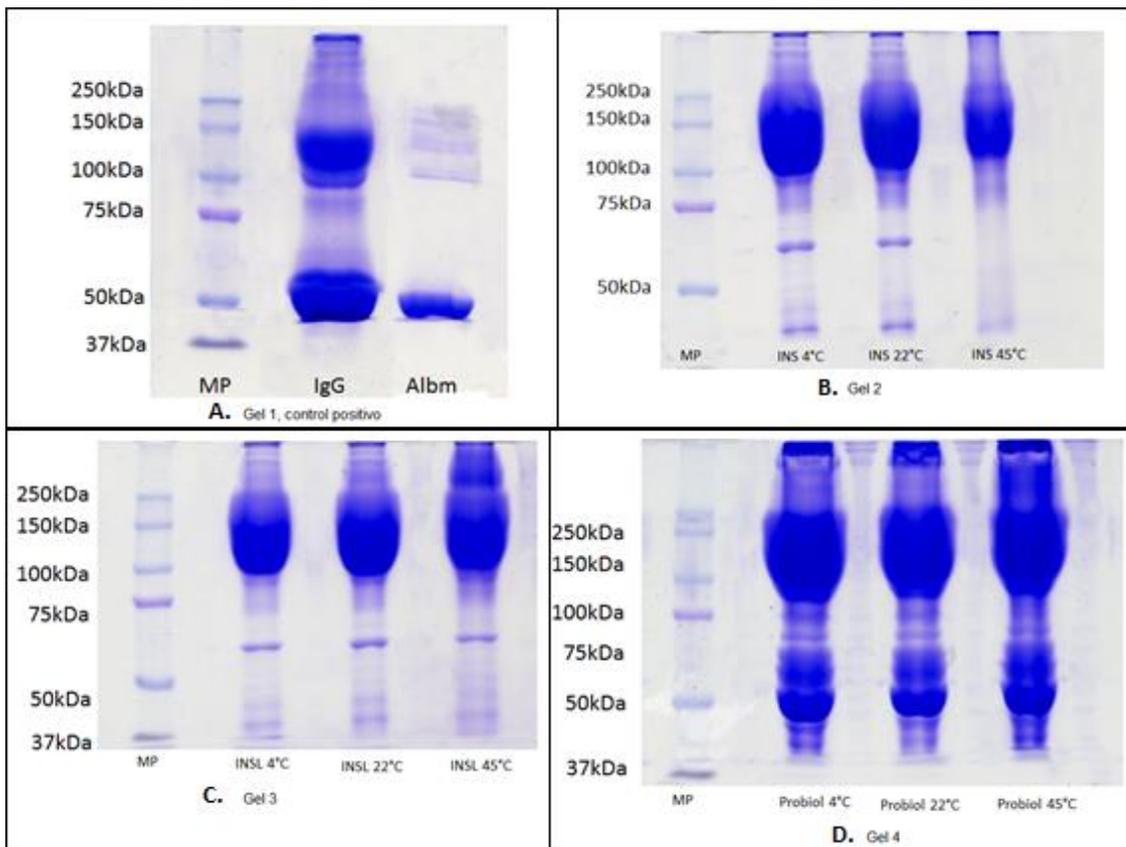


A. Gel 1, control positivo: marcadores de peso molecular, IgG de ratón y albumina. **B.** Gel 2, SAP's almacenados a 3 meses: INS 4°C, INS 22°C, INS 45°C y Probiol 4°C. **C.** Gel 3, SAP's almacenados a 3 meses: Probiol 22°C, Probiol 45°C, INS_L 4°C, INS_L 22°C e INS_L 45°C. Fuente: Elaboración propia.

En la imagen 4-1 se puede observar el bandeo electroforético de todos los antivenenos que presentaron una banda de proteína de 150KDa, correspondiente a la IgG. Pero además se visualiza una banda de 50KDa correspondiente a la albúmina, siendo muy pequeñas en INS, pero muy abundante en el de Probiol. Aparentemente, no se observan diferencias en la abundancia o comportamiento de la IgG. Exceptuando, en el caso de la observación de la banda de albúmina, a INS45°C, que refleja cualitativamente menor presencia de ésta. Con respecto al bandeo electroforético de Probiol, llama la atención que está muy cargado, a pesar de haberse usado la misma muestra de siembra que para los otros SAP. Por lo cual, se sospecha que cualitativamente podría mostrar un mayor contenido proteico.

En la imagen 4-2 se observa la electroforesis de los SAP que fueron almacenados durante 6 meses, que muestran cualitativamente un comportamiento similar al observado en el patrón electroforético de los 3 meses (ver imagen 4-1), Sin embargo, llama la atención que visualmente el bandeo electroforético para INS 45°C es más débil.

Imagen 4-2. SDS-PAGE de SAP almacenado a 6 meses



A. Gel 1, control positivo: marcadores de peso molecular, IgG de ratón y albumina. **B.** Gel 2, SAP's almacenados a 6 meses: INS 4°C, INS 22°C e INS 45°C. **C.** Gel 3, SAP's almacenados a 6 meses: INS_L 4°C, INS_L 22°C e INS_L 45°C. **D.** SAP's almacenados a 6 meses: Probiol 4°C, Probiol 22°C, Probiol 45°C. Fuente: Elaboración propia.

Esto quiere decir que el bandeo electroforético obtenido a los 3 vs. 6 meses de almacenamiento, cualitativamente, no se visualiza diferencia en la presencia de IgG en los SAP almacenados a las diferentes temperaturas con excepción de INS45°C.

4.4 Determinación de títulos de anticuerpos por el método E.L.I.S.A para el veneno de *B. asper*

Para la variable títulos de anticuerpos se realizó un Análisis descriptivo y un Análisis de Varianza Múltiple con el propósito de describir el comportamiento del resultado completo de las pruebas de E.L.I.S.A, las variables respuesta son los 9 títulos (4000, 8000, 16000, 32000, 64000, 128000, 256000, 512000, 1024000), los factores son la

temperatura (4, 22 y 45°C), el tiempo (3 y 6 meses), y el factor de bloqueo es la forma de preservación (INS, INS_L y Probiol)²⁹.

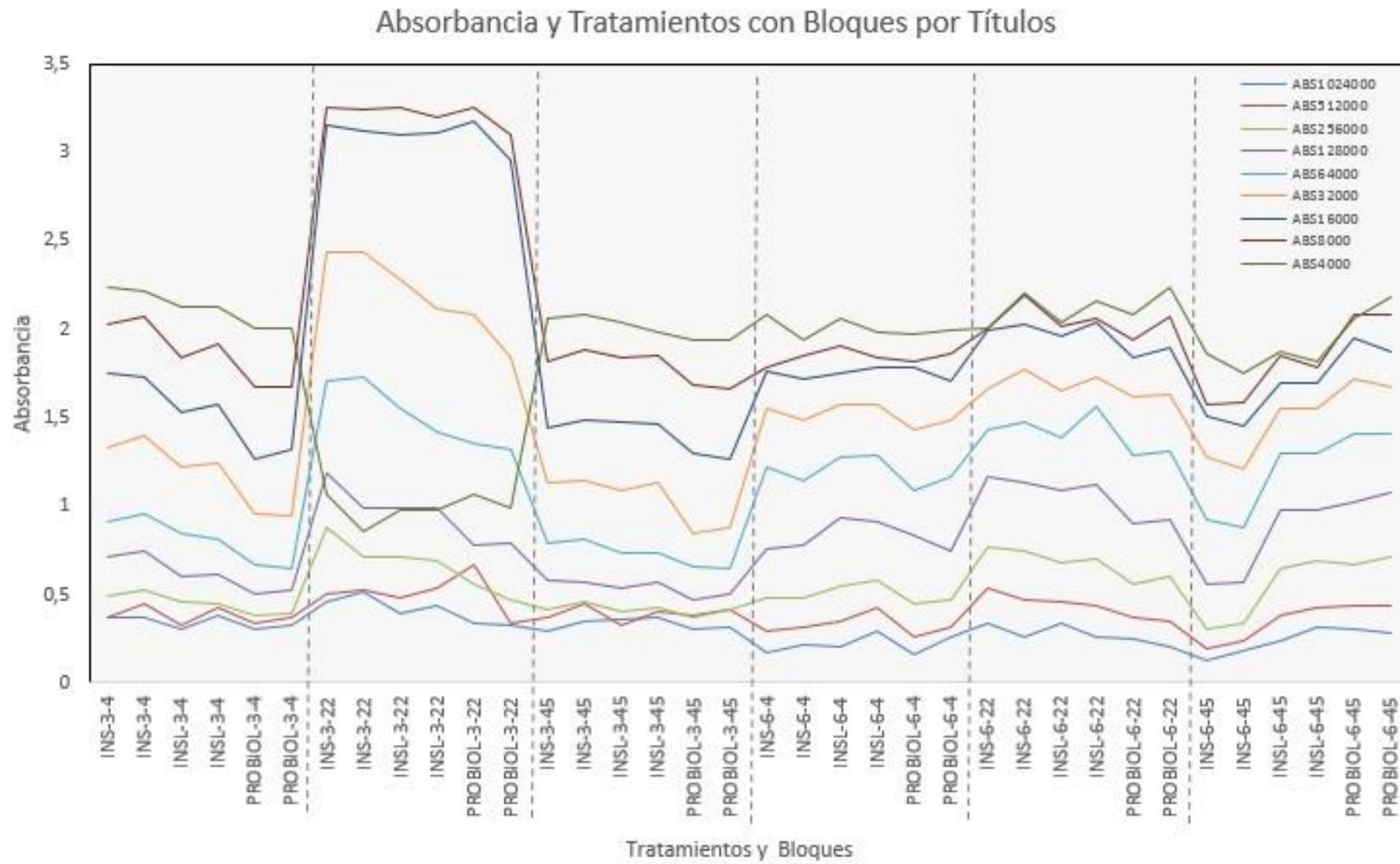
4.4.1 Análisis descriptivo

En la figura 4-4 se presentan los resultados de las pruebas E.L.I.S.A. por cada uno de los títulos, en la cual se observa que las curvas evidencian un comportamiento similar. Sin embargo, se observó que hubo un cambio importante en los resultados de los SAP que fueron almacenados por 3 meses a 22°C, ya que sin importar la forma de preservación, mostró una absorbancia mayor, excepto por el título a 4000, que es el único caso que sus valores disminuyen. Es necesario mencionar que a menor dilución, se observa una mayor absorbancia, por ende, mejor título de unión antígeno – anticuerpo.

En la figura 4-5 se observa que no existe una diferenciación marcada de los títulos de anticuerpos de INS entre las diferentes temperaturas de almacenamiento entre los 3 y 6 meses. No obstante, el comportamiento de INS_L y Probiol muestran un comportamiento inesperado en el que aquellos antivenenos que fueron almacenados a 4 y 45°C por 3 y 6 meses se sobreponen los títulos de anticuerpos. A pesar de eso se muestran mayores niveles de títulos para los SAP almacenados a 3 meses y a 22°C, seguidos de los almacenados a 4°C y, por último, a 45°C, sin importar el SAP estudiado.

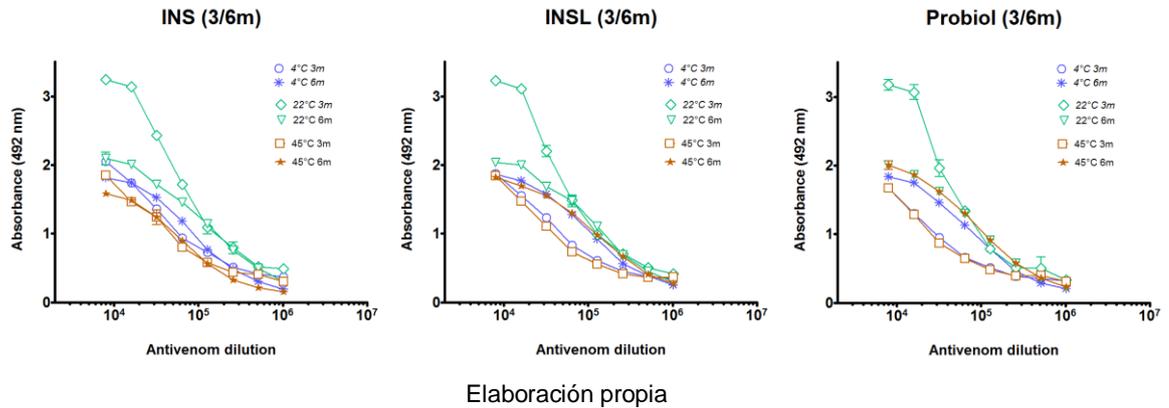
²⁹ Ver modelamiento de datos en apartado de anexos, Consultoría estadística Caso I, realizado por la Consultoría Estadística del Departamento de estadística de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Figura 4-4. Absorbancia y tratamientos con bloques por Títulos



Elaboración propia

Figura 4-5. Comparación INS, INS_L y Probiol a todas las temperaturas vs. tiempo de preservación



4.4.2 Análisis de Varianza Múltiple (MANOVA)

Se construyó el MANOVA usando cuatro test (Pillai, Wilks, Hotelling-Lawley y Roy), mediante el software estadístico R usando la función MANOVA (202), en la tabla 4-5 se presentan los resultados de cada test.

Tabla 4-5. Test para construcción de MANOVA

	Df	Pillai	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	0.98	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.50	0.78	18	42	0.7090
tiempo	1	0.91	22.32	9	20	0.0000
temp	2	1.45	6.18	18	42	0.0000
tiempo:temp	2	1.32	4.49	18	42	0.0000
Residuals	28					

	Df	Wilks	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	0.02	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.55	0.77	18	40	0.7187
tiempo	1	0.09	22.32	9	20	0.0000
temp	2	0.01	17.44	18	40	0.0000
tiempo:temp	2	0.01	16.24	18	40	0.0000
Residuals	28					

	Df	Hotelling-Lawley	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	51.66	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.72	0.76	18	38	0.7307
tiempo	1	10.05	22.32	9	20	0.0000
temp	2	40.89	43.16	18	38	0.0000
tiempo:temp	2	45.22	47.73	18	38	0.0000
Residuals	28					

	Df	Roy	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	51.66	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.54	1.27	9	21	0.3107
tiempo	1	10.05	22.32	9	20	0.0000
temp	2	39.98	93.29	9	21	0.0000
tiempo:temp	2	44.71	104.32	9	21	0.0000
Residuals	28					

Fuente: elaboración propia. Véase Informe estadístico.

De acuerdo a la anterior tabla, de los cuatro test estadísticos, en tres de ellos se rechaza la hipótesis H_0 : tiempo1= tiempo2 y H_0 : temperatura1= temperatura2 = temperatura3, lo que quiere decir que sí hay diferencia en los efectos producidos por la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre los cada uno de los 9 títulos de cada SAP.

Para la verificación de supuestos se realizó un modelo de regresión lineal de cada una de las variables respuesta (los 9 títulos) con cada factor (tiempo y temperatura), de las cuales se obtuvo 18 regresiones, se realizó la verificación de la normalidad de los residuales de cada regresión y la prueba de homocedasticidad de varianzas, en la cual se concluyó que el modelo cumplía 11 de los 18 criterios mínimos de significancia $\alpha=0.05$, lo que comprobó que el modelo estaba correctamente realizado (Véase Informe estadístico, Anexos).

4.5 Neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de *B. asper*

Se evaluó el porcentaje de la neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de *B. Asper*, de cada uno de los SAP, a diferentes concentraciones, la DE_{50} fue hallada a una concentración antiveneno/veneno de: 1000 μ L SAP/ 10 μ gV. El análisis estadístico de los resultados solo tuvo en cuenta los datos obtenidos a esta concentración.

4.5.1 Análisis descriptivo

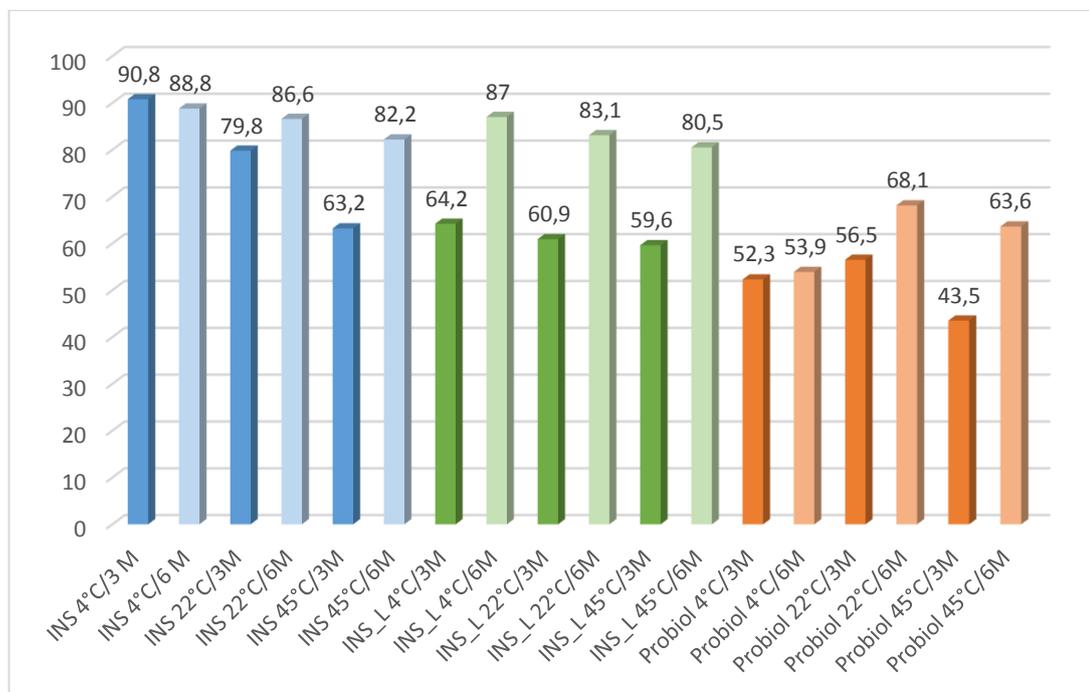
En la figura 4-6 se muestra la comparación de los resultados obtenidos en las pruebas de neutralización de la actividad proteolítica, a los 3 y 6 meses, en los que se evidenció que INS tiene un porcentaje de neutralización proteolítico superior (63,2-90,9%), seguido por INS_L (60,9-87%) y, finalmente, Probiol (43,5-68,1%). Al disgregar los resultados por temperatura de almacenamiento se observa que conforme esta aumenta, el porcentaje de neutralización disminuye para cada uno de los SAP en ambos periodos de tiempo analizados³⁰. Sin embargo, este comportamiento se modifica a los 6 meses, donde INS_L y Probiol arrojan promedios de neutralización

³⁰ A los 3 meses de almacenamiento: INS 4°C (90,8%), INS 22°C (79,8%), INS 45°C (63,2%); INS_L 4°C (64,2%), INS_L 22°C (60,9%), INS_L 45°C (59,6%); Probiol 4°C (52,3%), Probiol 22°C (56,5%), Probiol 45°C (43,5%). A los 6 meses de almacenamiento: INS 4°C (88,8%), INS 22°C (86,8%), INS 45°C (82,2%); INS_L 4°C (87%), INS_L 22°C (83,1%), INS_L 45°C (80,5%); Probiol 4°C (53,9%), Probiol 22°C (68,1%), Probiol 45°C (63,6%).

mayores en comparación a los observados a los 3 meses. Este comportamiento es atípico o poco esperado y se correlacionó con la aparición de precipitado en los SAP liofilizados.

Es importante aclarar que, aunque los resultados reflejen que a los 6 meses de almacenamiento aumenta el porcentaje de neutralización por parte de los antivenenos, esto no implica que a mayor tiempo de almacenamiento, mayor neutralización. Sino que debe prestarse atención a la precipitación como artefacto de los ensayos, como condicionante de interpretación.

Figura 4-6. Comparación del promedio de porcentajes de neutralización de la actividad proteolítica de *B. asper* a los 3 y 6 meses



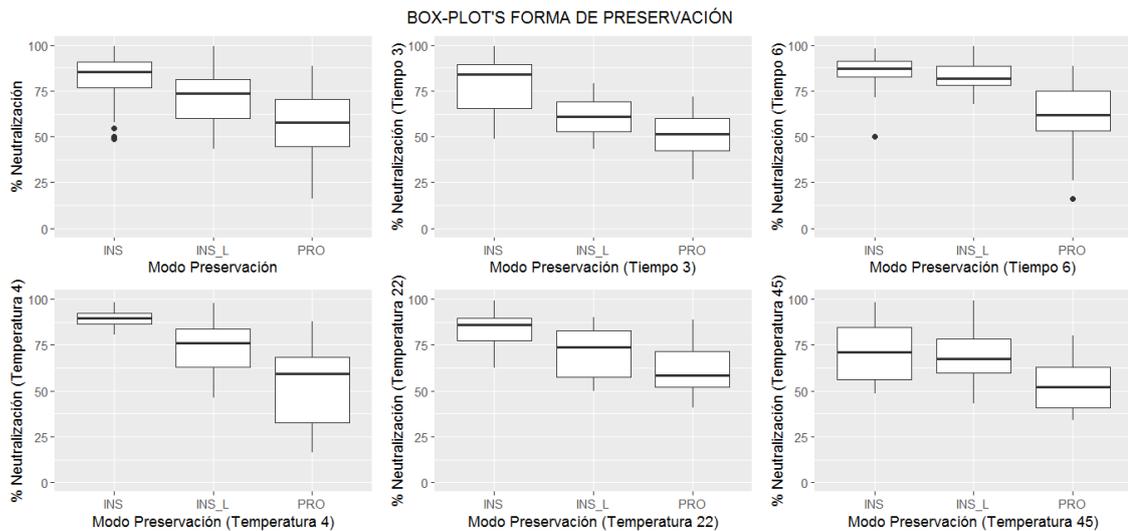
Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron gráficos Box-Plot por cada variable: forma de preservación; tiempo de almacenamiento vs. Temperatura; tiempo de almacenamiento vs. forma de preservación y temperatura de almacenamiento, discriminando por el resto de variables. Los cuales se presentan en las figuras 4-7, 4-8, 4-9 y 4-10.

En la figura 4-7 se aprecia que el porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de *B. asper*, dando como resultado que para INS es mayor, seguido por INS_L y Probiol, que se correlaciona con lo observado en la figura 4-6. Este comportamiento se mantiene al discriminar forma de preservación vs. tiempo de

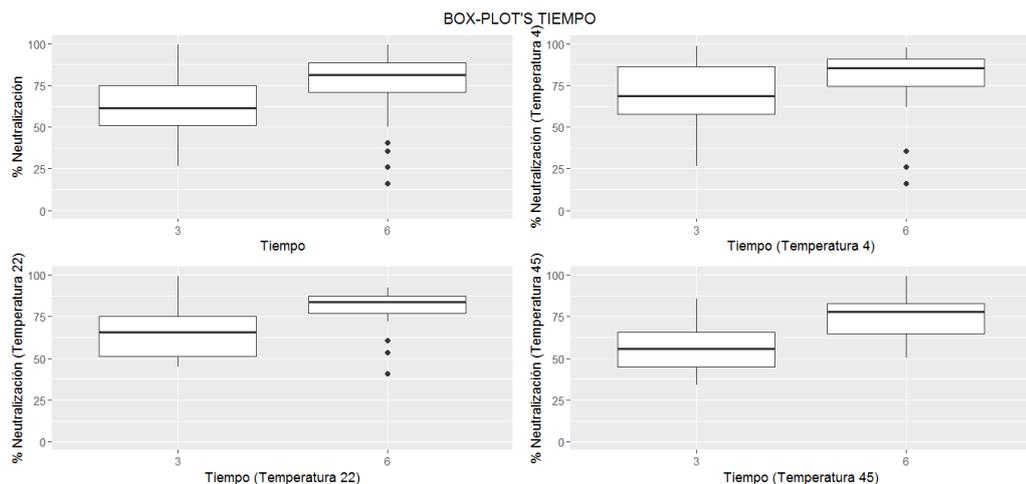
almacenamiento; y, forma de preservación vs. temperatura. Llama la atención que en la figura 4-7, Box-Plot (caja 3) modo de preservación vs. porcentaje de neutralización a los 6 meses, se observa poca diferencia entre INS e INS_L con respecto a Probiol, y este mismo comportamiento se observa en la misma figura (caja 6), modo de preservación vs. temperatura 45°C. Finalmente, se evidencia una importante disminución del porcentaje de neutralización de la temperatura a 45°C, con respecto a las otras temperaturas de almacenamiento.

Figura 4-7. Comparación de la forma de preservación



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

Figura 4-8. Comparación del tiempo de almacenamiento vs. temperatura



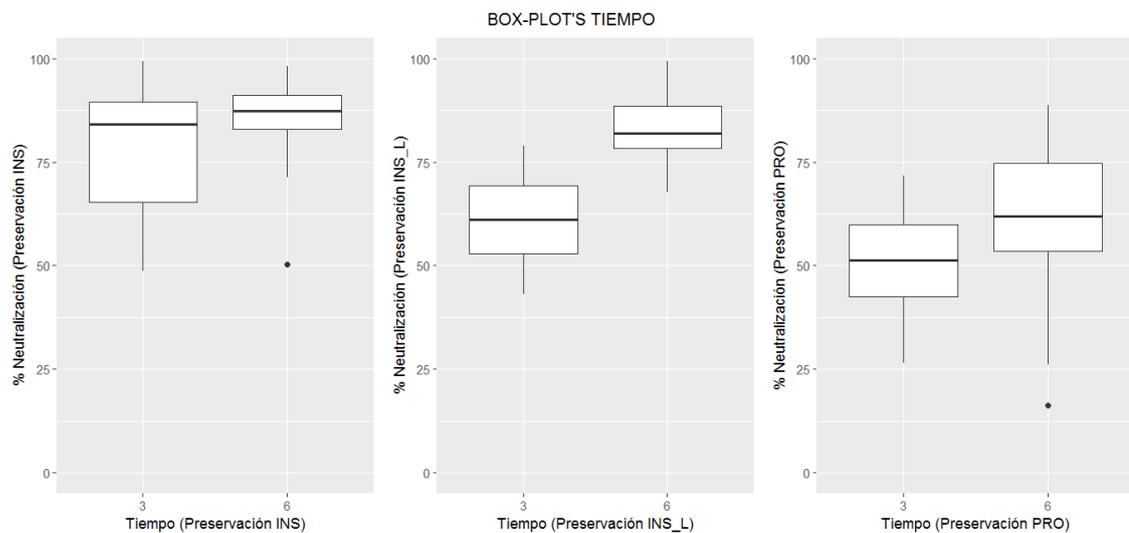
Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la figura 4-8 se observa que al comparar todos los SAP entre sí, el porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica, contra el veneno de *B. asper* es mejor a los

6 meses de almacenamiento para todas las temperaturas, lo cual está relacionado al comportamiento observado en la figura 4-6, que fue anteriormente explicado.

Adicionalmente se ve reflejado que al comparar la variable tiempo vs. Temperatura, el porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica a 45°C es menor con respecto a las otras temperaturas. Cabe anotar que en este grupo hay algunos datos atípicos que presentan porcentajes muy bajos de neutralización frente al comportamiento general.

Figura 4-9. Comparación del tiempo de almacenamiento vs. forma de preservación



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

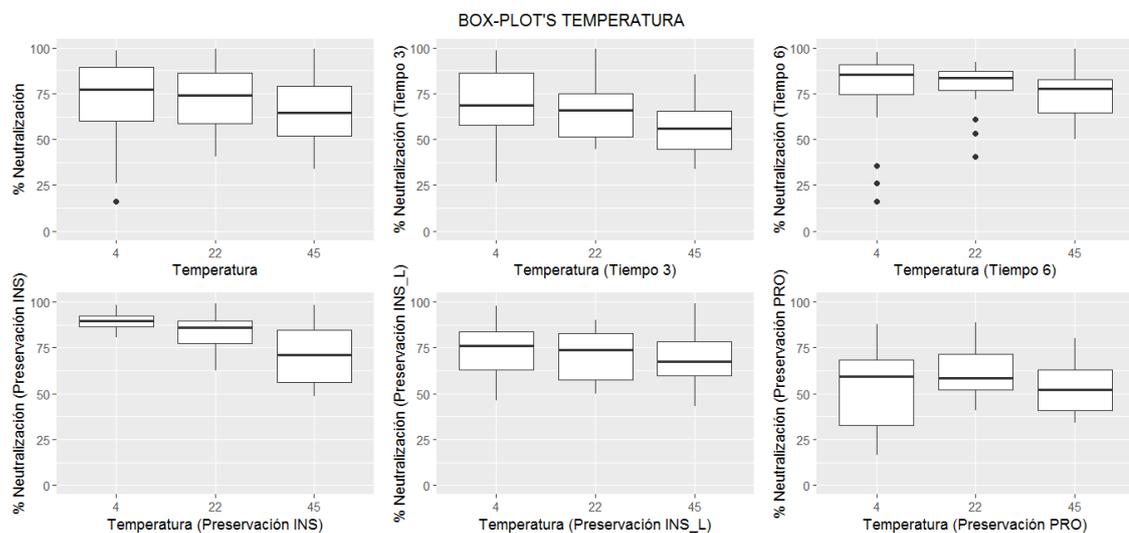
En la figura 4-9 se observa que el comportamiento general de los datos, donde el porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de *B. asper* es mayor a los 6 meses de almacenamiento al comparar INS, INS_L y Probiol entre sí; aunque dicha diferencia no es tan significativa estadísticamente para INS e INS_L (corroborado con el modelo, tabla 4-7). Probiol vs. INS e INSL sí muestra diferencias significativas estadísticamente a los 3 y 6 meses de almacenamiento. Aquí también se muestra el mismo comportamiento evidenciado en la figura 4-5 en donde INS presenta un mejor porcentaje de neutralización, seguido por INS_L y, por último, Probiol.

En la figura 4-10 se percibe que, al comprar todos los SAP entre sí, a menor temperatura de almacenamiento hay un mayor porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de *B. asper*. Sin embargo, estas diferencias parecen no ser tan marcadas entre las distintas temperaturas (caja 1). Cabe notar que en el grupo de tiempo de almacenamiento de 6 meses (caja 3), los resultados muestran

mayor porcentaje de neutralización que para el grupo de tiempo de almacenamiento de 3 meses (caja 2). Esto está asociado a un aumento en la variabilidad de los datos, puesto que hay una dispersión mayor de las observaciones recolectadas para el período de 6 meses, ya que presentan valores extremos hacia el límite inferior del porcentaje de neutralización calculado.

En la figura 4-10, se muestra, nuevamente, que hay un mejor comportamiento de INS con respecto a los otros SAP (caja 4-6), y que no hay diferencias aparentes entre INS_L a 4 y 22°C, igualmente para Probiol.

Figura 4-10. Comparación de temperatura



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

4.5.2 Análisis estadístico mediante modelo de regresión *Beta*

En el modelo de regresión *Beta*, se encontró que existe interacción entre todos los pares de variables, es decir, que el tiempo; la temperatura de almacenamiento y la forma de preservación tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de neutralización proteolítica lo cual se puede observar en la figura 4-11.

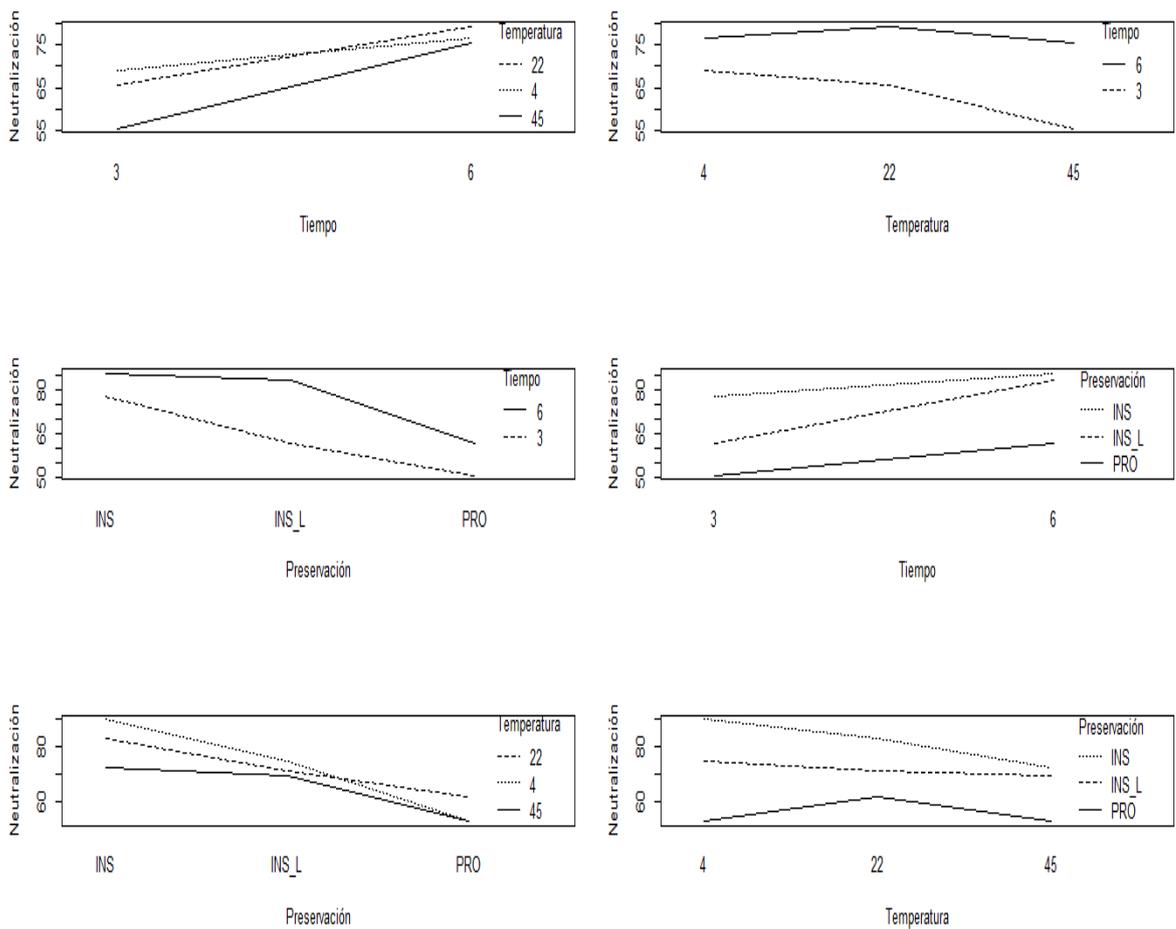
En la tabla 4-6 se observa que la mejor forma de preservación es INS, ya que con respecto a INS_L, tiene un porcentaje de neutralización proteolítica promedio estimado del 31%³¹ mayor, cuando el tiempo de almacenamiento es de 3 meses. Para el tiempo de almacenamiento de 6 meses, la diferencia entre INS e INS_L es tan solo del 1,2%.

³¹ Se calcula el porcentaje (resultado del cociente-1) x100, aplica para contrastes Neutralización de la actividad Proteolítica contra el veneno de *B. asper*.

Si se compara INS y Probiol, las diferencias en el porcentaje de neutralización proteolítico promedio estimado se incrementan, pues, para los tres meses, dicha diferencia es del 56.9% y para los 6 meses es del 37%, respectivamente. Por otra parte, entre INS_L y Probiol, el mejor comportamiento lo exhibe INS_L, pues, éste tiene un porcentaje de neutralización proteolítico promedio estimado de 19,3% mayor en el tiempo 3 meses y de 35,3% mayor en el tiempo 6 meses.

Figura 4-11. Gráficos de interacciones dobles de la neutralización de la actividad proteolítica para el veneno de *B. asper*

GRÁFICOS DE INTERACCIÓN



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

Tabla 4-6. Contraste SAP vs. tiempo de almacenamiento

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
INS Vs INS_L (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_2) = \exp(0.27377)$	1.314909
INS Vs INS_L (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6) = \exp(0.27377 - 0.26113)$	1.012722
INS Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_3) = \exp(0.45056)$	1.569186
INS Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_3 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.45056 - 0.13561)$	1.370185
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3) = \exp(-0.27377 + 0.45056)$	1.193379
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_6 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.3023039)$	1.352972

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la tabla 4-7 se observa que a menor temperatura de almacenamiento, se tiene un mayor porcentaje de neutralización proteolítica promedio estimado. En general, cuando se está en un tiempo de almacenamiento de 6 meses, las diferencias no son estadísticamente significativas, pues la diferencia máxima es de tan solo 2,3%. A los 3 meses de almacenamiento, las diferencias entre los porcentajes de neutralización proteolítica promedio estimados sí son estadísticamente significativas, ya que oscilan desde el 5,8% hasta el 27,5%.

Tabla 4-7. Contraste temperatura vs. tiempo de almacenamiento

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
Tem 4 Vs Tem 22 (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_4) = \exp(0.05664)$	1.058278
Tem 4 Vs Tem 22 (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_4 - \hat{\beta}_8) = \exp(0.05664 - 0.03404)$	1.022865
Tem 4 Vs Tem 45 (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_5) = \exp(0.24317)$	1.275286
Tem 4 Vs Tem 45 (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_5 - \hat{\beta}_9) = \exp(0.24317 - 0.22248)$	1.020902
Tem 22 Vs Tem 45 (tiempo 3)	$\exp(\hat{\beta}_4 - \hat{\beta}_5) = \exp(-0.05664 + 0.24317)$	1.205058
Tem 22 Vs Tem 45 (tiempo 6)	$\exp(\hat{\beta}_4 - \hat{\beta}_5 + \hat{\beta}_8 - \hat{\beta}_9) = \exp(-0.001921216)$	0.9980806

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la tabla 4-8 se muestra que a mayor tiempo de almacenamiento, hay un mayor porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica promedio estimado contra el veneno de *B. asper*. El porcentaje promedio a los 3 meses es un 19,1% menor que a los 6 meses. En el caso específico de INS almacenado a 4 y 22°C, se observa que las diferencias no son significativas estadísticamente; es decir, se puede considerar que el efecto del tiempo de almacenamiento es el mismo en estos grupos; mientras que para INS a 45°C sí se genera una diferencia estadísticamente significativa del 19,1%. Las diferencias entre el porcentaje promedio estimado de la neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno son mucho más grandes en el grupo de INS_L, éstas oscilan entre el 37.7% y el 22.1%. En el caso de Probiol las diferencias entre el porcentaje de neutralización proteolítico promedio estimado son menores que en el caso de INS_L, y oscilan entre el 29.3% y el 11.6%, aunque su comportamiento, como ya se había mencionado antes, es el más bajo de las tres formas de preservación.

Tabla 4-8. Contraste forma de preservación vs. tiempo de almacenamiento vs. temperatura

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
Ti 3 Vs Ti 6 (INS-Tem 4)	$exp(-\hat{\beta}_1) = exp(0.01134)$	1.011402
Ti 3 Vs Ti 6 (INS-Tem 22)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_8) = exp(0.01134 - 0.03404)$	0.9775583
Ti 3 Vs Ti 6 (INS-Tem 45)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_9) = exp(0.01134 - 0.22248)$	0.8096555
Ti 3 Vs Ti 6 (INS_L-Tem 4)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_6) = exp(0.01134 - 0.26113)$	0.7789659
Ti 3 Vs Ti 6 (INS_L-Tem 22)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_6 - \hat{\beta}_8) = exp(-0.2838233)$	0.7528997
Ti 3 Vs Ti 6 (INS_L-Tem 45)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_6 - \hat{\beta}_9) = exp(-0.4722723)$	0.6235837
Ti 3 Vs Ti 6 (PRO-Tem 4)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_7) = exp(0.01134 - 0.13561)$	0.8831385
Ti 3 Vs Ti 6 (PRO-Tem 22)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_7 - \hat{\beta}_8) = exp(-0.1583084)$	0.8535865
Ti 3 Vs Ti 6 (PRO-Tem 45)	$exp(-\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_7 - \hat{\beta}_9) = exp(-0.3467574)$	0.7069768

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

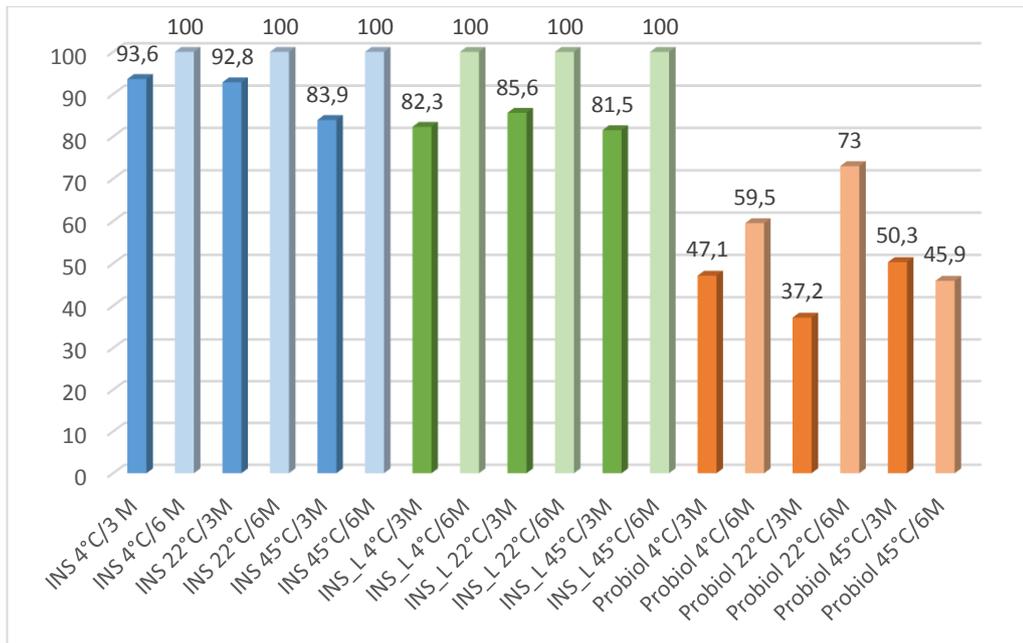
4.6 Neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper*

Se evaluó el porcentaje de la neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. Asper*, de cada uno de los SAP, a diferentes concentraciones, la DE₅₀ hemolítica indirecta³² fue hallada a una concentración antiveneno/veneno de: 2000µL SAP/1000µLV. El análisis estadístico de los resultados solo tuvo en cuenta los datos obtenidos a esta concentración.

Se ve reflejado en la figura 4-12 que INS e INS_L presentan la mejor capacidad de neutralización hemolítica para las tres temperaturas evaluadas en ambos puntos de la línea de tiempo experimental. Se evidencia además que a los 6 meses se obtuvo un comportamiento más adecuado de porcentajes de la neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. Asper*. Adicionalmente, llama la atención que para este período de tiempo, Probiol muestra un mejor comportamiento al ser almacenado a 22°C; sin embargo, INS e INS_L no mostraron alteración de su capacidad neutralizante a 45°C.

³² Dosis de antiveneno que redujo en un 50% la hemólisis inducida por el veneno solo (100% de hemólisis)

Figura 4-12. Comparación del porcentaje de neutralización hemolítica promedio a los 3 y 6 meses de almacenamiento

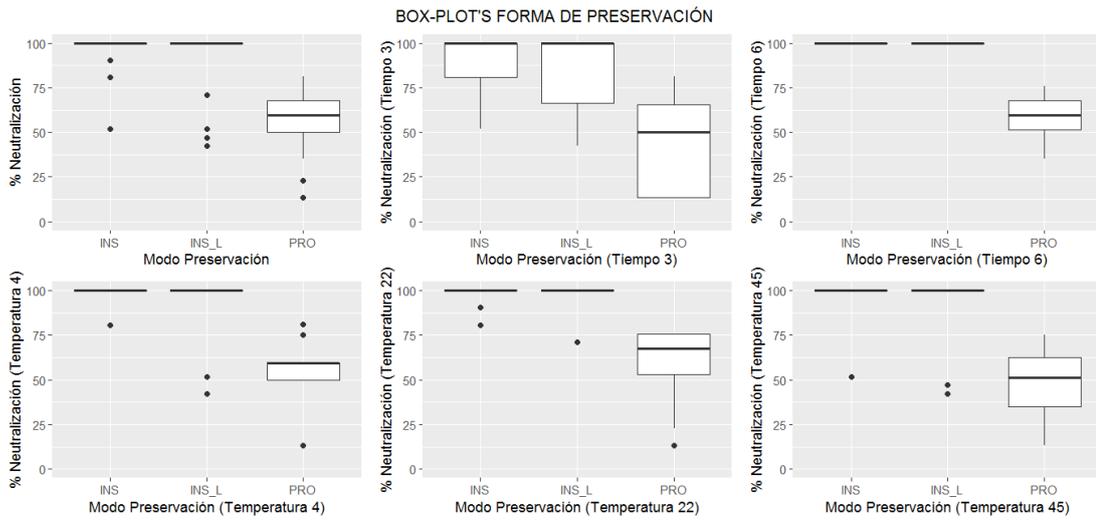


Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

El análisis de los resultados para esta actividad se realizó descriptivamente, dado la ausencia de variabilidad en los datos. Se realizaron gráficos Box-Plot por cada variable: forma de preservación; tiempo de almacenamiento vs. Temperatura; tiempo de almacenamiento vs. forma de preservación; y, temperatura de almacenamiento, discriminando por el resto de variables (Figura 4-12, 4-13, 4-14, 4-15 y 4-16).

En la figura 4-13 se observa que la forma de preservación INS e INS_L mostraron un porcentaje de la neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper* de 100%, exceptuando algunas observaciones que presentan valores extremos del comportamiento general. En el grupo que estuvo almacenado por 3 meses, parece presentar una leve variabilidad entre INS e INS_L; sin embargo, no modifican el comportamiento general. Por otra parte, se ilustra que Probiol sí cursa con variabilidad, mostrando un porcentaje de la neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper* muy inferiores en comparación a los de INS e INS_L, dichos porcentajes oscilan el 60%.

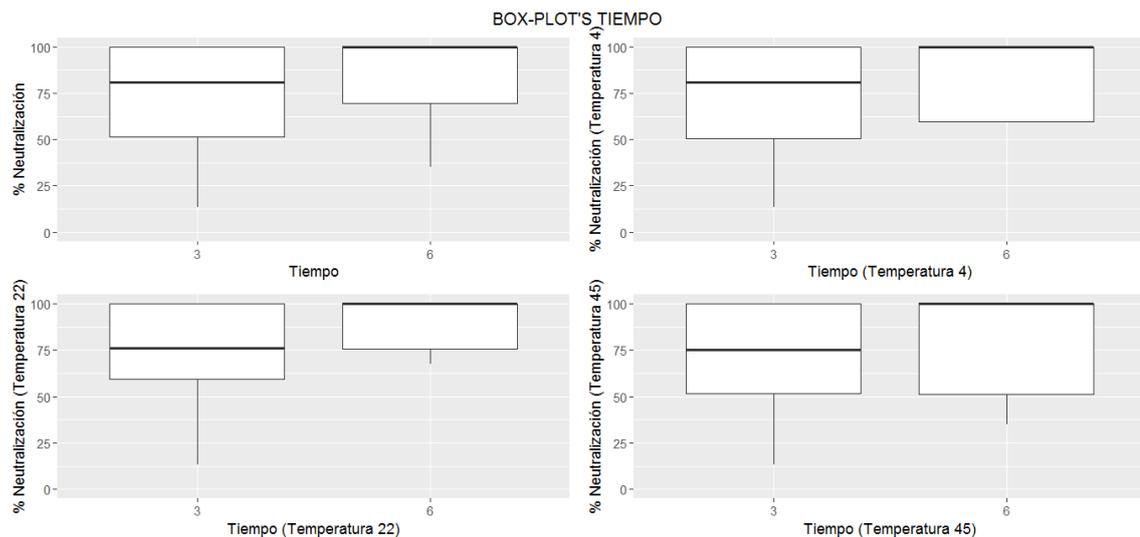
Figura 4-13. Forma de preservación



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la Figura 4-14 se muestra que el porcentaje de la neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper* en general, es mayor a los 6 meses de almacenamiento, además; en este tiempo se presenta menor variabilidad y la gran mayoría de las observaciones alcanzaron un porcentaje de neutralización del 100%. También se evidencia que el comportamiento es similar a las diferentes temperaturas independientemente del tiempo de almacenamiento.

Figura 4-14. Tiempo de almacenamiento vs. temperatura

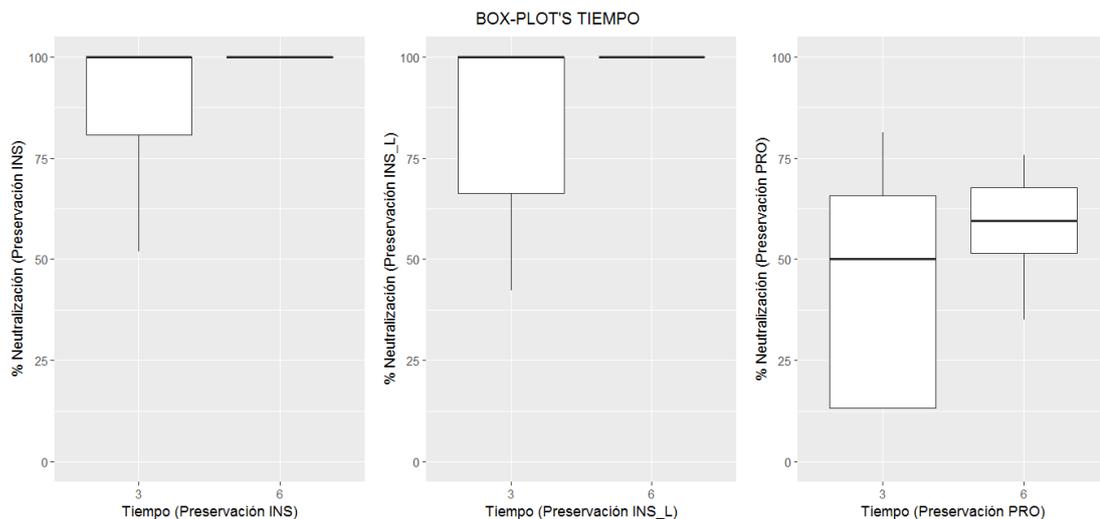


Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la figura 4-15 se evidencia que a los 6 meses de almacenamiento tanto INS como INS_L alcanzaron un 100% de neutralización hemolítico en todas sus observaciones.

A los 3 meses de almacenamiento hubo observaciones de INS e INS_L que no alcanzaron el 100%, lo que se correlaciona con el comportamiento observado en la figura 4-10. En Probiol se evidencia que se alcanzan porcentajes de neutralización muy inferiores a los de INS e INS_L, éstos oscilan entre el 55% con valores mayores para el tiempo de almacenamiento de 6 meses.

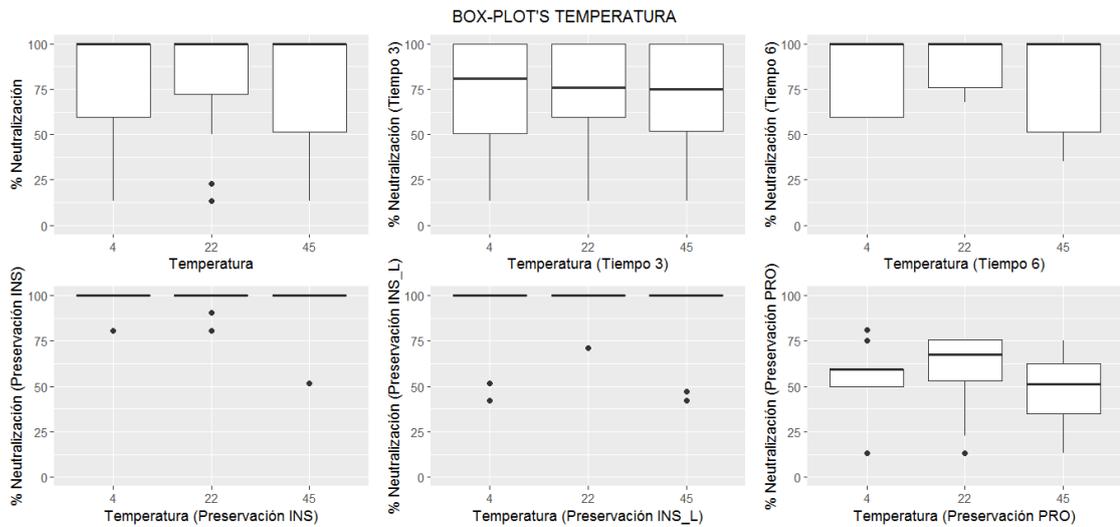
Figura 4-15. Tiempo de almacenamiento vs. forma de preservación



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la figura 4-16 se nota que hay diferencias importantes en los porcentajes de neutralización hemolítica alcanzados en las diferentes temperaturas, es decir, sin importar a qué temperatura se almacene el antiveneno, el comportamiento va a ser similar dentro de cada tiempo de almacenamiento y dentro de cada forma de preservación. También se evidencia un comportamiento similar en relación con las diferencias descritas en la figura 4-15 a favor de 6 meses vs. 3 meses de almacenamiento, y, a favor de INS e INS_L vs. Probiol.

Figura 4-16. Temperatura de almacenamiento



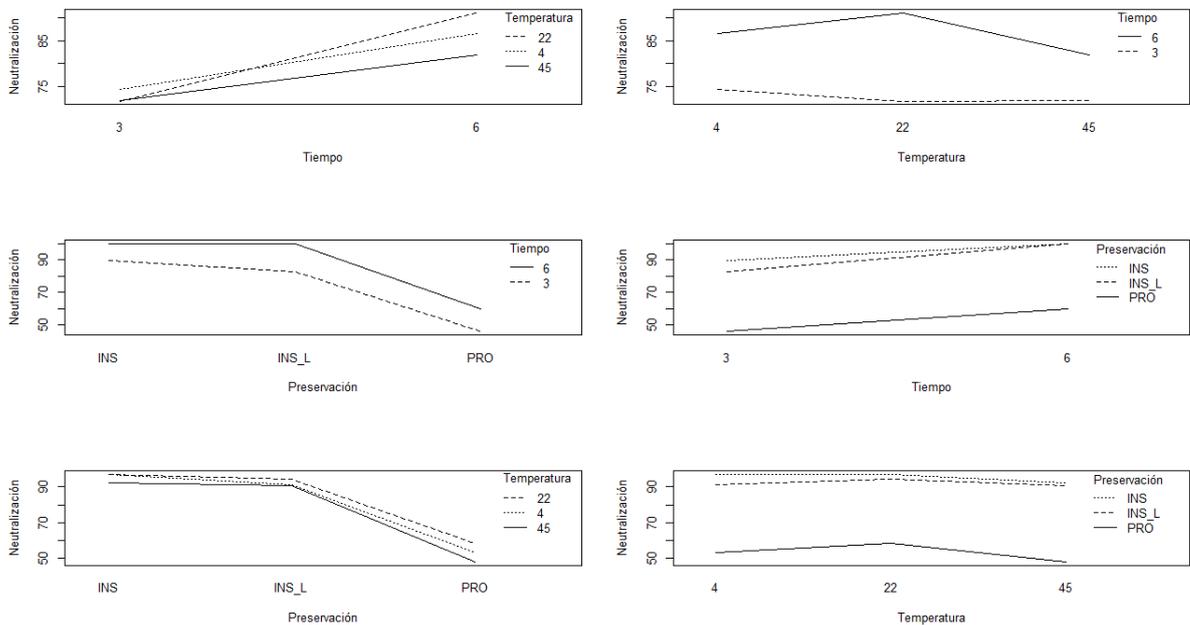
Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la figura 4-17 se muestra el comportamiento promedio del porcentaje de neutralización hemolítica, dado por la escasa variabilidad de los datos no se realizó ajuste de modelo estadístico, por lo tanto, no se evaluaron interacciones entre las variables.

En esta misma figura, se observa que los porcentajes de neutralización hemolítica promedio son mayores para las observaciones almacenadas durante 6 meses, sin importar la temperatura de almacenamiento ni la forma de preservación. Por otra parte, se nota que las formas de preservación de INS e INS_L presentan un mejor comportamiento que Probiol con porcentajes de neutralización hemolítico promedio alrededor del 95%; lo anterior sin restar el tiempo de almacenamiento ni la temperatura. También se observa que la temperatura de almacenamiento no está afectando notablemente el porcentaje de neutralización hemolítico promedio, a excepción del grupo almacenado a un tiempo de 6 meses, donde sí parece haber diferencias con una predominancia de 22°C, seguida 4°C y por 45°C.

Figura 4-17. Gráficos de interacciones dobles de la Neutralización de la actividad hemolítica indirecta contra el veneno de *B. asper*

GRÁFICOS DE INTERACCIÓN



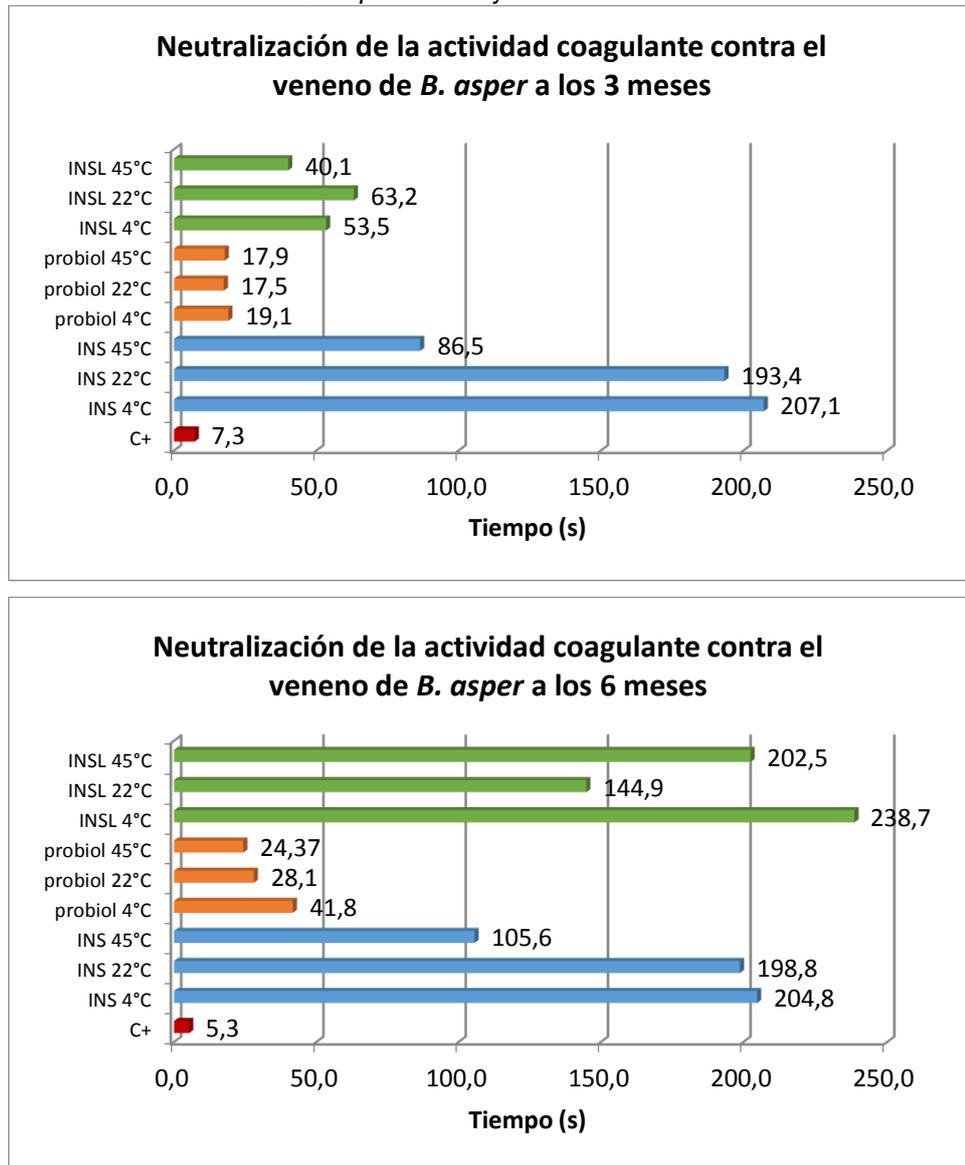
Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

4.7 Neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de *B. asper*

Se evaluó el porcentaje de la neutralización de la actividad proteolítica contra el veneno de *B. Asper*, de cada uno de los SAP, a diferentes concentraciones, la DE_{50} fue hallada a una concentración antiveneno/veneno de: $1000\mu\text{L SAP}/10\mu\text{gV}$. El análisis estadístico de los resultados solo tuvo en cuenta los datos obtenidos a esta concentración.

4.7.1 Análisis descriptivo

En la figura 4-1 se observa que todos los SAP triplican el tiempo de coagulación del control positivo (veneno) que fue de 7,3 segundos para 3 meses y de 5,3 segundos para 6 meses. Por tal motivo, el análisis estadístico se hizo en razón del número de veces que se prolongó el tiempo de coagulación vs. el control positivo. Adicionalmente se vislumbra que el INS muestra una mejor neutralización de la actividad coagulante contra el veneno, seguido de INS_L y Probiol.

Figura 4-18. Comparación de la neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de *B. asper* a los 3 y 6 meses

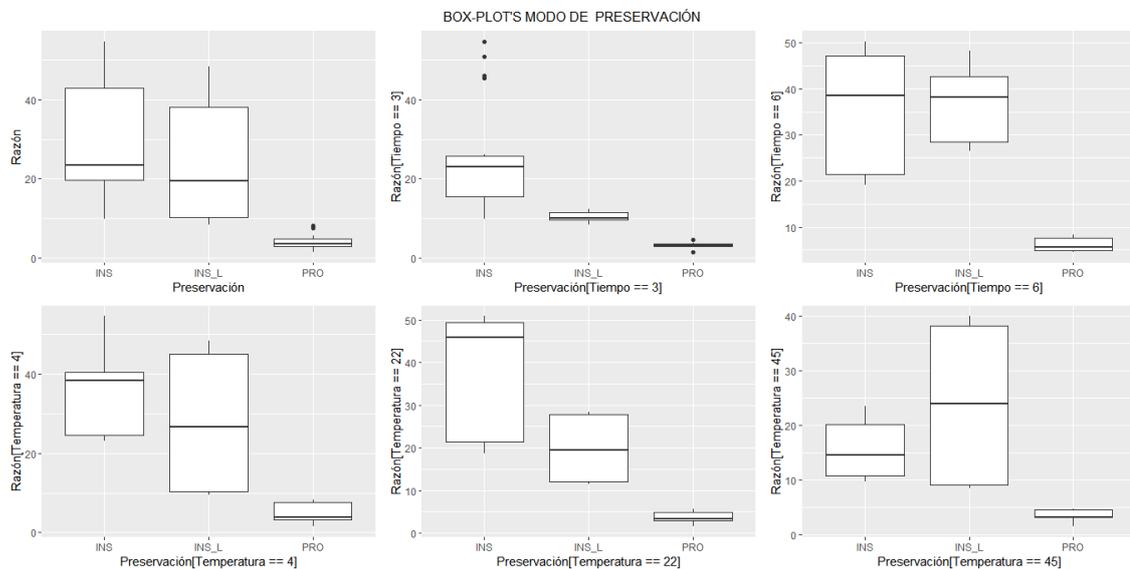
Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron gráficos Box-Plot por cada variable: forma de preservación; tiempo de almacenamiento vs. Temperatura; tiempo de almacenamiento vs. forma de preservación; y, temperatura de almacenamiento, discriminado por el resto de variables.

En la figura 4-19 se observa que la Razón de neutralización coagulante presenta valores altos y variables para el modo de preservación INS e INS_L, a diferencia de lo sucedido con Probiol, cuya Razón es menor y poco variable. Al discriminar la Razón de neutralización coagulante por el tiempo de almacenamiento, se puede ver que, para 3 meses, la mediana de la forma de preservación INS presenta la mayor Razón con

algunas observaciones extremas; seguida por INS_L, que presenta poca variación, y, por último, Probiol exhibe la menor Razón y muy poca variabilidad. Mientras que, para 6 meses, se obtiene que la mediana de la Razón de la neutralización coagulante, tanto para INS como INS_L, son elevadas y con escasas diferencias entre sí.

Figura 4-19. Forma de preservación

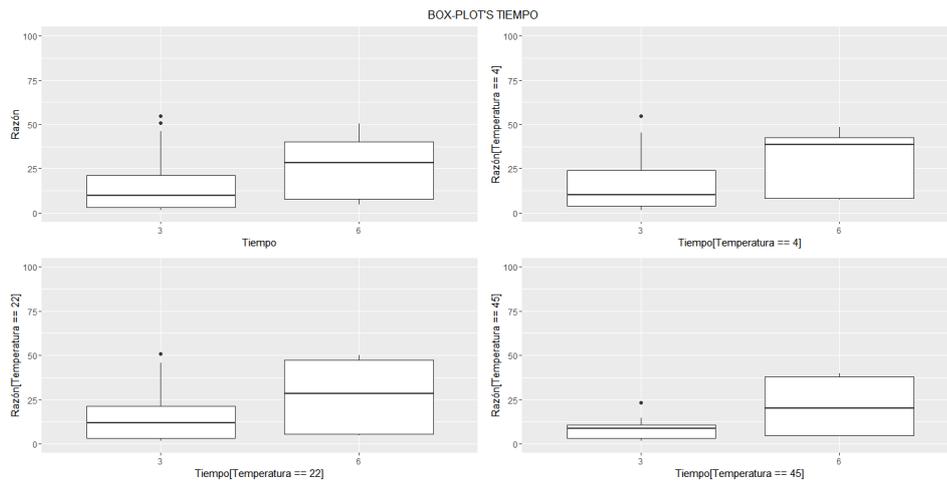


Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

Al observar el comportamiento de la Razón de neutralización coagulante (figura 4-19), discriminando por la variable temperatura, se puede ver que para las formas de preservación INS e INS_L, siguen conservando la jerarquía anteriormente descrita en la Razón, con la diferencia que esto no sucede para la temperatura de conservación de 45°C. Se obtiene que la mediana de la forma de preservación INS_L es mayor que la encontrada en INS; Probiol conserva su escasa variabilidad y presenta la menor Razón independientemente de la temperatura evaluada.

En la figura 4-20 se evidencia que para la Razón de neutralización coagulante por tiempo de almacenamiento, la mediana para 3 meses es menor que para 6 meses con algunas observaciones con valores muy elevados. La variabilidad en 6 meses es mayor que en 3. Y el anterior comportamiento se mantiene al discriminar las observaciones por las diferentes temperaturas.

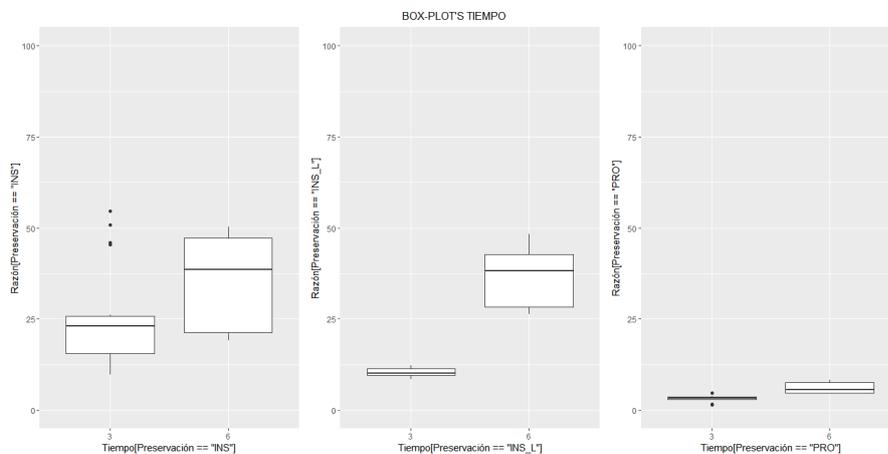
Figura 4-20. Variable tiempo



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la figura 4-21 se considera el tiempo de almacenamiento discriminado por la forma de preservación, en la cual se observa que para INS, la mediana es menor para un tiempo de 3 vs. 6 meses, y que para el primer período de almacenamiento presenta algunas observaciones con valores extremos para la Razón de neutralización coagulante. Para INS_L se nota una Razón mediana de neutralización coagulante mucho menor para los 3 vs. 6 meses; a los 3 meses se presenta poca variabilidad de las observaciones. Probiol presenta la particularidad de tener poca variación tanto para 3 meses vs. 6 meses, siendo éste, el que presenta los valores más bajos para la Razón de neutralización coagulante. Y al comparar a los tres SAP entre sí, se muestra que tienen un comportamiento similar, en el que, a los 3 meses, la prolongación del tiempo de coagulación es menor que a los 6 meses.

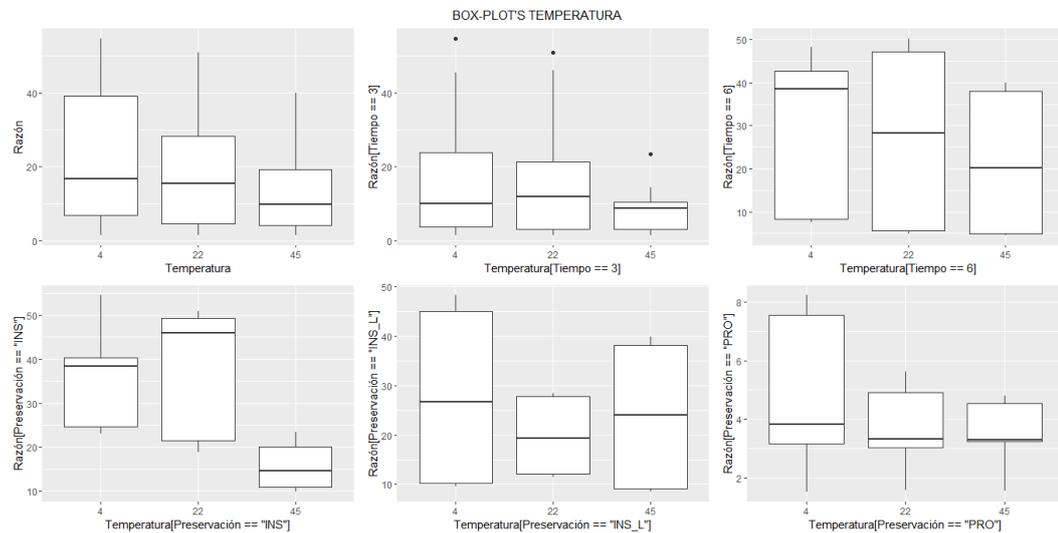
Figura 4-21. Variable tiempo vs. forma de preservación



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la figura 4-22, en la primera caja se observa cómo la Razón mediana de neutralización coagulante disminuye a medida que la temperatura de conservación aumenta, igualmente ocurre una disminución en la variación de las observaciones por efecto de la temperatura. Al realizar una discriminación por tiempo (caja 2) se puede ver que a dos temperaturas (4 y 22°C) existen similitudes en el comportamiento de los SAP, pero a temperatura 45°C, la variabilidad es menor para los SAP almacenados por 3 meses. Sin embargo, las medianas a las tres temperaturas no distan mucho entre sí. Para el caso de 6 meses (caja 3) se puede observar una alta variabilidad en la Razón de neutralización coagulante, dado que la mediana muestra un comportamiento decreciente a medida que la temperatura aumenta.

Figura 4-22. Variable temperatura



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

Al realizar la discriminación por forma de preservación (caja 4, Figura 4-22) se visualiza que para INS a 4 y 22°C se consiguen valores altos para las observaciones en la Razón de neutralización coagulante con una gran variabilidad, a diferencia de lo que sucede a temperatura 45°C, en donde la Razón de neutralización coagulante es mucho menor y presenta una variabilidad menor. Para el caso de INS_L (caja 5) se observa la particularidad que, para la temperatura 22°C, se obtuvo una menor variabilidad y un valor para la Razón mediana de neutralización coagulante menor, mientras que a las temperaturas de 4 y 45°C se observan comportamientos similares. En Probiol (caja 6) se presenta mayor variabilidad a temperatura 4°C, la mediana es similar en todas las temperaturas de estudio.

4.7.2 Análisis estadístico mediante modelo lineal generalizado con respuesta *Gamma*

En el modelo lineal generalizado con respuesta *Gamma*³³, se encontró que existe interacción entre todos los pares de variables, es decir, la Razón de neutralización coagulante contra el veneno de *B. asper*, se ve afectada por las variables de tiempo, temperatura de almacenamiento y forma de preservación, como se evidencia en la figura 4-23.

En los gráficos de interacción (figura 4-23) se puede entender una interacción entre la mayoría de pares de variables, a excepción de las variables tiempo y temperatura (caja 1 y 2). Lo anterior quiere decir que el efecto de la forma de preservación depende tanto del tiempo de almacenamiento como de la temperatura de almacenamiento; que tanto el efecto del tiempo de almacenamiento y la temperatura de almacenamiento dependen de la forma de preservación.

Tabla 4-9. Contraste para cada SAP vs. Tiempo de almacenamiento vs. temperatura

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
INS Vs INS_L (Ti 3 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_1) = exp(-0.99760)$	0.3688
INS Vs INS_L (Ti 3 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_8) = exp(-0.99760 - 0.17426)$	0.3098
INS Vs INS_L (Ti 3 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_{10}) = exp(-0.99760 + 0.65947)$	0.7131
INS Vs INS_L (Ti 6 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_8) = exp(-0.99750 + 0.92255)$	0.9378
INS Vs INS_L (Ti 6 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_6) = exp(0.24931)$	0.7793
INS Vs INS_L (Ti 6 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_{10}) = exp(0.58442)$	1.7940
INS Vs PRO (Ti 3 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_2) = exp(-2.17075)$	0.1141
INS Vs PRO (Ti 3 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_9) = exp(-2.17075 - 0.023135)$	0.0905
INS Vs PRO (Ti 3 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_{11}) = exp(-2.17075 + 0.56049)$	0.1998
INS Vs PRO (Ti 6 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_7) = exp(-2.17075 + 0.30979)$	0.1555
INS Vs PRO (Ti 6 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_7 + \hat{\beta}_9) = exp(-2.09231)$	0.1234
INS Vs PRO (Ti 6 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_7 + \hat{\beta}_{11}) = exp(-1.30047)$	0.2724
INS_L Vs PRO (Ti 3 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_1) = exp(-2.17075 + 0.99760)$	0.3095
INS_L Vs PRO (Ti 3 - Tem 22)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_8 + \hat{\beta}_9) = exp(-0.76754)$	0.4642
INS_L Vs PRO (Ti 3 - Tem 45)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_{10} + \hat{\beta}_{11}) = exp(-1.27213)$	0.2802
INS_L Vs PRO (Ti 6 - Tem 4)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_7) = exp(-1.23213)$	0.1676
INS_L Vs PRO (Ti 6 - Tem 22)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_7 - \hat{\beta}_8 + \hat{\beta}_9) = exp(-1.843)$	0.1583
INS_L Vs PRO (Ti 6 - Tem 45)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_7 - \hat{\beta}_{10} + \hat{\beta}_{11}) = exp(-1.88489)$	0.1519

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

Como resultado de los cocientes (Tabla 4-9), se observa que la mejor forma de preservación es INS, ya que INS_L tiene Razones de neutralización coagulante contra

³³ Se realizó verificación de supuestos y análisis de influencia (véase Informe estadístico, Anexos)

el veneno de *B. asper* promedio estimada de 63,12%³⁴, 69,02% y 28,69% menores que los presentados por INS a los 3 meses y a temperaturas de 4, 22 y 45°C, respectivamente. Para 6 meses, la diferencia entre INS_L e INS es tan sólo un 6,22% menor que el de INS a temperatura 4°C; un comportamiento similar se consigue a 22°C, ya que se espera que éste sea 22,07% menor. Mientras que para el contraste entre INS e INS_L, a 6 meses a 45°C, se observa un aumento de 79,40%, referido a INS_L.

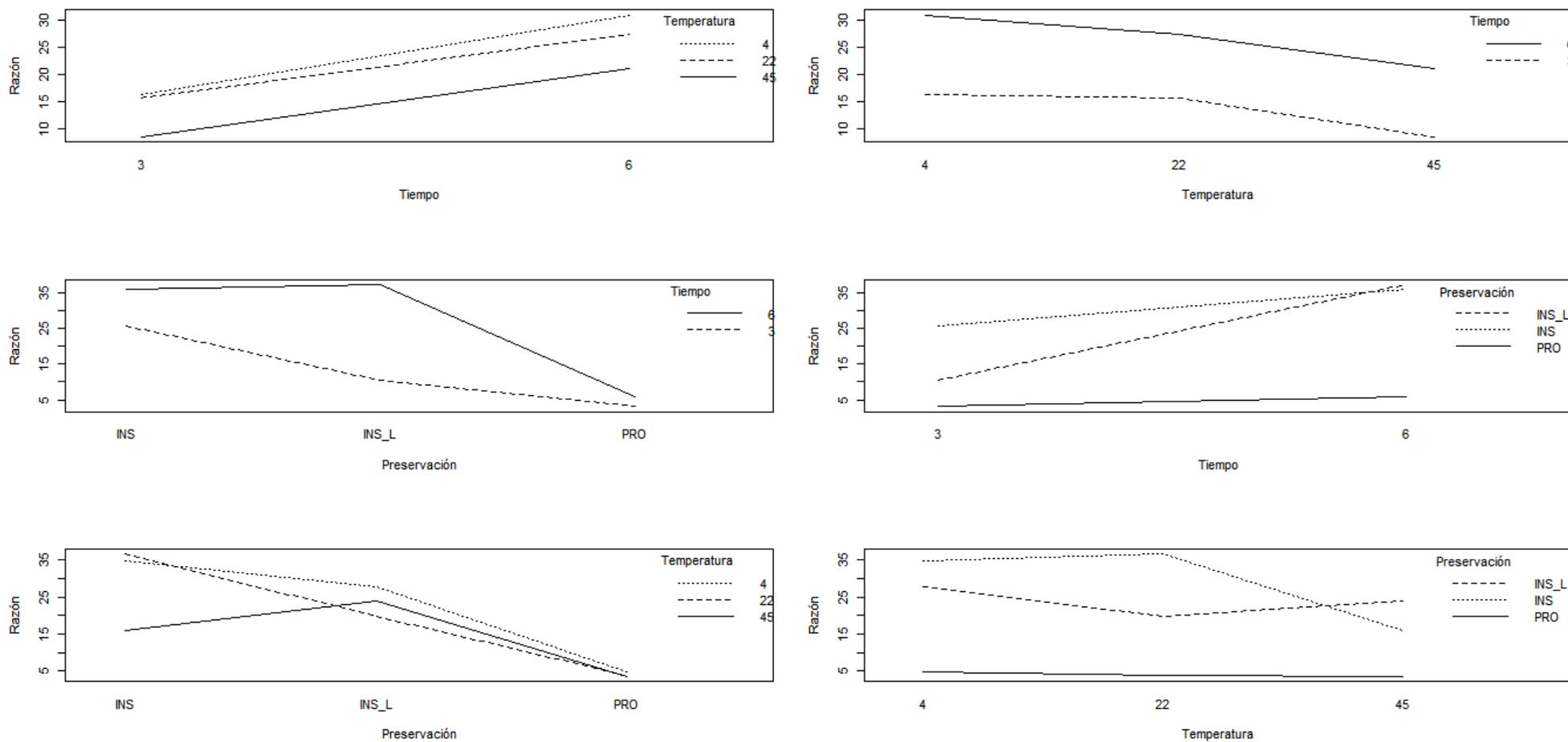
Comparando INS y Probiol, las diferencias en la Razón de neutralización coagulante promedio estimada se incrementan, ya que para 3 meses dicha diferencias son de 88,59%, 90,95% y 80,02% menores a las presentadas por INS almacenado en el mismo período a 4, 22 y 45°C, respectivamente. Para el tiempo de almacenamiento de 6 meses, se observan Razones de neutralización coagulante de 84,45%, 87,66% y 72,76% menores, a 4, 22 y 45°C, respectivamente, esto se diferencia con las Razones presentadas por INS bajo las mismas condiciones.

Por otra parte, entre INS_L y Probiol, es mejor el comportamiento de INS_L, dado que se observaron Razones de neutralización coagulante promedio estimadas para Probiol de 69,05%, 53,58% y 71,98% menores a las presentadas por INS_L en el tiempo de almacenamiento de 3 meses, para todas las temperaturas. Por último, las Razones de neutralización coagulante promedio estimadas para el caso de almacenamiento de 6 meses con diferencias de 83,24%, 84,17% y 84,81% menores a las encontradas bajo las mismas condiciones en INS_L.

³⁴ Se calcula el porcentaje $(1 - \text{resultado del cociente}) \times 100$

Figura 4-23. Gráficos de interacciones dobles

GRÁFICOS DE INTERACCIÓN



Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

Tabla 4-10. Contraste del efecto de la temperatura vs. Razón de neutralización coagulante contra el veneno de *B. asper*, para cada presentación de SAP

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
Tem 4 Vs Tem 22 (INS)	$exp(\hat{\beta}_4) = exp(0.0238)$	1.0241
Tem 4 Vs Tem 22 (INS_L)	$exp(\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_8) = exp(0.0238 - 0.17426)$	0.8603
Tem 4 Vs Tem 22 (PROB)	$exp(\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_9) = exp(0.0238 - 0.23135)$	0.8126
Tem 4 Vs Tem 45 (INS)	$exp(\hat{\beta}_5) = exp(-0.79668)$	0.4508
Tem 4 Vs Tem 45 (INS_L)	$exp(\hat{\beta}_5 + \hat{\beta}_{10}) = exp(-0.79668 + 0.65947)$	0.8716
Tem 4 Vs Tem 45 (PROB)	$exp(\hat{\beta}_5 + \hat{\beta}_9) = exp(-0.79668 + 0.56049)$	0.7895
Tem 22 Vs Tem 45 (INS)	$exp(\hat{\beta}_5 - \hat{\beta}_4) = exp(-0.79668 - 0.0238)$	0.4402
Tem 22 Vs Tem 45 (INS_L)	$exp(-\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_5 - \hat{\beta}_8 + \hat{\beta}_{10}) = exp(0.01325)$	1.0133
Tem 22 Vs Tem 45 (PROB)	$exp(-\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_5 - \hat{\beta}_9 + \hat{\beta}_{11}) = exp(-0.001921216)$	0.9718

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la Tabla 4-10 se evidencia que a menor temperatura de almacenamiento se tiene una mayor Razón de neutralización coagulante promedio estimada. A excepción de INS que almacenado a 22°C vs. 4°C, consiguió una Razón de neutralización coagulante promedio estimada de 2,41% más que lo obtenido a 4°C. En el caso de INS_L y Probiol se obtienen razones de neutralización coagulante promedio estimada de 13,97% y 18,74%, respectivamente, menores a temperatura 4°C vs. 22°C.

Para las comparaciones referentes a temperaturas 4°C vs. 45 °C, se observa una Razón de neutralización coagulante promedio estimada para INS, INS_L y Probiol de 54,92%, 12,84% y 21,05%, respectivamente, menores a las observadas a temperatura 4°C.

Finalmente, para el último conjunto de comparaciones (22°C vs. 45°C) se visualiza que, para INS a 45°C, se espera una Razón de neutralización coagulante promedio estimada de un 65,98% menos que a 22°C. Para la forma de preservación INS_L se obtiene una Razón promedio estimada 1,33% mayor que la observada a 22°C. En el caso de Probiol se obtuvo una Razón de neutralización coagulante promedio estimada 2.82% menor que la presentada a 22°C.

Tabla 4-11. Contraste del efecto del tiempo de almacenamiento vs. la razón de neutralización coagulante para cada SAP

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
Tiempo 3 Vs Tiempo 6 (INS)	$exp(\hat{\beta}_3) = exp(0.34446)$	1.4112
Tiempo 3 Vs Tiempo 6 (INS_L)	$exp(\hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_6) = exp(0.34446 + 0.92255)$	3.5502
Tiempo 3 Vs Tiempo 6 (PROBIOL)	$exp(\hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_7) = exp(0.34446 + 0.39979)$	1.9237

Fuente: Elaboración propia. Véase el Informe estadístico.

En la tabla 4-11 se observa que los SAP almacenados por 6 meses obtuvieron una Razón de neutralización coagulante promedio estimada mayor que a los 3 meses de

almacenamiento: para el caso de INS se obtuvo un 41,12% menor a los 3 meses; lo mismo sucede en la forma de preservación INS_L, en la cual la razón de neutralización coagulante promedio estimada se aumentó 3,5%; y Probiol almacenado por 6 meses tuvo un aumento de 92,37% en contraste con lo observado en tiempo 3, resultados que concuerdan con lo descrito en la sección descriptiva presentada previamente.

5 Discusión

La administración de suero antiofídico es la única terapia efectiva para el control de las manifestaciones clínicas del envenenamiento (4, 28-30). Es por esto que es tan importante contar con antivenenos que cumplan con estudios de estabilidad térmica, para ser distribuidos a puntos remotos con altas temperaturas, en donde más se necesitan (72, 92, 96), dado su escaso acceso a servicios de salud (3, 5, 9, 31). Adicionalmente que incluyan pruebas de neutralización para actividades específicas del veneno de *B. asper*, causantes de importante morbilidad como son la hemolítica indirecta, proteolítica y coagulante.

Los resultados demostraron que el SAP con la mejor capacidad para neutralizar la actividad proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. asper*, fue el del Instituto Nacional de Salud (INS), en su forma farmacéutica comercial, al compararse contra la presentación liofilizada en este estudio INS_L y Probiol. Esto se observó en los dos periodos de almacenamiento y a todas las temperaturas evaluadas³⁵. La estabilidad térmica de INS_L mostró ser muy similar al de la forma comercial y más estable que el de Probiol, lo cual permite resaltar el buen comportamiento de este medicamento biológico y, la urgencia de considerar liofilizarlo con el fin de aumentar su accesibilidad en zonas que no cuentan con una cadena de frío estable.

También se evidenció en los resultados que las temperaturas más bajas preservan mejor la capacidad de los SAP para una neutralización efectiva (ya que en todas las pruebas se logró obtener la dosis efectiva 50). Adicionalmente, las diferencias estadísticas entre 4 y 22°C no fueron significativas, es decir, que la forma comercial líquida podría tolerar hasta dicha temperatura sin perder su efectividad. Al contrastarse esto con los hallazgos previos de estabilidad del SAP, realizados por Rojas, et. al. en Costa Rica (67, 160) y por Ramirez, Renjifo y Forero en Colombia (70, 71), mediante DE₅₀, en esta investigación se considera que el INS no pierde su efectividad al ser almacenado hasta 22°C por un período menor a 6 meses, lo cual podría ser una información útil para no descartar este medicamento vital por pérdida de cadena de frío en dicho lapso. Sin embargo, siempre debe verificarse visualmente el aspecto del mismo, dado que la presencia de turbidez podría indicar formación de agregados

³⁵ Periodos de almacenamiento 3 y 6 meses, temperaturas de exposición: 4, 22 y 45°C

proteínicos sin que haya claridad de los efectos adversos que éstos puedan causar en un individuo.

Con relación a la determinación de los títulos de anticuerpos de los SAP almacenados a las diferentes temperaturas, el modelo estadístico mostró que existen diferencias significativas, por lo cual se rechaza la hipótesis nula, es decir, que la unión antígeno-anticuerpo se ve afectada al exponerse a variaciones del tiempo de almacenamiento y de la temperatura. Si bien no hay pérdida de afinidad por el veneno de *B. asper*, estas diferencias evidencian la importancia de mantener la cadena de frío al menos por el tiempo evaluado en este estudio. Aunque en las pruebas de E.L.I.S.A. no se evidencia una pérdida abrupta de los títulos al realizar la liofilización, el tratamiento del INS, en su forma de preservación comercial, presenta un comportamiento más adecuado, lo que es esperable, puesto que, la liofilización puede disminuir la unión antígeno-anticuerpo al favorecer la pérdida de IgG, siguiendo el estudio de Kasper y Friess (180). Es importante recalcar que la menor temperatura (4°C) es la que muestra la mejor unión antígeno-anticuerpo para los tres tratamientos INS, INS_L y Probiol.

Al observar el perfil electroforético de los SAP, a los 3 y 6 meses de almacenamiento (imagen 4-1 y 4-2), la banda correspondiente a la IgG no refleja diferencias en la abundancia o comportamiento de ésta. En relación a la banda electroforética de la albumina, se esperaría no encontrar en los antivenenos purificados esta proteína, o encontrar una muy escasa proporción, sin embargo, en este estudio se encontró una banda electroforética de la albúmina que muestra un comportamiento similar, exceptuando, en el caso de la observación de la banda de albúmina, a INS45°C, la cual se hace casi imperceptible. Lo anterior, posiblemente está correlacionado con la aparición de precipitados o la formación de agregados insolubles y en la literatura estos hallazgos fueron evidenciados por Segura et. al. y Herrera et. al. (52, 203) (Véase figuras 4-1, 4-2 y 4-3). Los SAP liofilizados no presentan este comportamiento.

Ante el elevado costo de demanda y oferta del SAP y las dificultades asociadas a su distribución, explicadas con antelación (29, 108, 173), sugerimos buscar otras opciones de distribución tales como establecer la obligatoriedad de contar con un stock de SAP en los centros de salud más cercanos a la población en donde hay mayor incidencia de accidentalidad ofídica anual (13). Estas vías posibles deben tener presente la elevación de la temperatura asociado al Fenómeno del Niño –OS, que afecta a las mismas zonas donde hay mayor incidencia y mortalidad de accidentes ofídicos (Orinoquia, Santander,

Antioquia, Chocó, los altiplanos Cundi-boyacense y nariñense y a lo largo del piedemonte llanero) (13).

Si bien el veneno que se usó para evaluar la capacidad de neutralización para las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta fue *B. asper*, por su alta accidentalidad en el país, se recomienda que en estudios posteriores se complemente la información para el comportamiento de neutralización de los antivenenos, con respecto a venenos de otras especies de importancia médica como *Lachesis muta* y *Crotalus durissus*. Además, deben considerarse estudios in vivo que fortalezcan e integren los hallazgos ilustrados en esta investigación

Descrito esto, es fundamental continuar los esfuerzos para evaluar las formas de mejorar la producción y distribución de antivenenos en Colombia, con el fin de disminuir el impacto de este accidente, que conlleva tantas secuelas y que consume recursos económicos de las víctimas, sus familias, y en un espectro mayor al Estado, ya que se pierde población vital en edad productiva.

Por último, es fundamental reconocer estas necesidades para tratar el accidente ofídico, y de esta manera impulsar a las instituciones productoras de los SAP a mejorar sus estándares de producción, fortalecer los mecanismos gubernamentales para favorecer planes políticos de acción en la población, entrenar a personal de salud etc. El problema de la producción de antivenenos en Colombia, no es exclusivo del orden farmacéutico, sino que reclama una visión integral que contemple la calidad de vida del individuo afectado que se da por las consecuencias del envenenamiento (factor toxicológico). Esta investigación aborda este objeto de estudio, desde la Toxinología, porque se focaliza en la resolución del tratamiento del accidente ofídico, a través de la evaluación y mejoramiento en los usos de los Sueros Antiofídicos Polivalentes.

6 Conclusiones

Esta investigación titulada: “Determinación de los efectos de la temperatura de almacenamiento sobre el título de anticuerpos y capacidad neutralizante presentes en las diferentes formas de preservación de los antivenenos polivalentes producidos en Colombia”, tuvo como objetivo evaluar el efecto de la variación en la temperatura de almacenamiento sobre los SAP durante un período de 3 y 6 meses. Para esto, se implementó una metodología de investigación exploratoria-experimental-analítica-prospectiva, que permitiera aproximarse al objeto de estudio y retar a los antivenenos a temperaturas similares a las encontradas en los territorios colombianos. Dando como resultado las siguientes conclusiones:

- En cuanto a la forma farmacéutica se considera que INS fue el SAP que mostró una mejor capacidad de neutralización de la actividad proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante del veneno de *B. asper*, seguido por INS_L y Probiol, aunque la diferencia entre INS e INS_L no es estadísticamente significativa, para cada una de las actividades descritas.
- En relación a la temperatura de almacenamiento, se concluye que a menor temperatura, se obtiene un comportamiento más adecuado para la neutralización de las actividades del veneno de *B. asper*. Sin embargo, es importante aclarar que no hubo diferencias significativas entre los SAP almacenados a 4 y 22°C. Lo que sugiere que podrían almacenarse a esta temperatura sin que perdieran su efectividad independientemente si requieren refrigeración.
- Se concluye que cualquier SAP, almacenado a menor temperatura hasta por 6 meses, obtendrá un comportamiento más adecuado sobre la neutralización de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante contra el veneno de *B. asper*.
- Cabe añadir que se encontró la particularidad que el SAP INS_L, almacenado por 6 meses y a una temperatura de 45°C, presentó un mejor comportamiento que INS, siendo este el único caso en el que INS se ve superado. Lo que sugiere que la técnica usada para su liofilización le brinda una mejor estabilidad, por lo tanto, podría constituir una posibilidad alterna de preservación a futuro.

- A pesar que en la determinación de la neutralización de la actividad coagulante contra el veneno de *B. asper* INS almacenado a todas las temperaturas y periodos de almacenamiento, mostró la mejor Razón de neutralización coagulante calculada, es importante enaltecer que INS_L logró triplicar la Razón calculada para neutralización de la actividad coagulante del veneno a los 3 meses de almacenamiento vs. 6 meses. Es decir, su comportamiento en contraste a Probiol fue mejor, lo que refuerza la necesidad de considerar la liofilización a largo plazo de INS.
- Acerca de la neutralización de la actividad hemolítica indirecta, la temperatura no afecta de manera notable el porcentaje de neutralización hemolítico promedio en los 2 períodos de tiempo analizados. Esto podría indicar que, sin importar la temperatura a la que se almacene el antiveneno, INS e INSL mantendrán su capacidad de neutralizar 100% la actividad del veneno, mientras que Probiol tendrá una menor efectividad de neutralización.
- Existen diferencias estadísticas significativas en los efectos producidos por la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre los títulos de los anticuerpos, esto sugiere que las variaciones de la temperatura producen alteraciones sobre la unión antígeno-anticuerpo.
- Las absorbancias promedio más altas se encuentran que el título a 8.000 las más bajas a 1.024.000. Además, en su mayoría presenta más alto niveles de absorbancia el modo de preservación INS_L.
- Se considera que el bandeo electroforético obtenido a los 3 vs. 6 meses de almacenamiento evidencia que cualitativamente no se observa la banda correspondiente a la albúmina para los SAP de INS almacenados a 45°C, mientras que los SAP liofilizados conservan su bandeo independiente del tiempo y la temperatura de almacenamiento.

Finalmente, esta investigación concluye con el aporte evaluativo de los efectos de la variación en la temperatura de almacenamiento sobre las características físico-químicas, los títulos de anticuerpos del antiveneno y la capacidad neutralizante de algunas de las actividades del veneno de *B. asper*, de los Sueros Antiofídicos Polivalentes producidos por dos instituciones en Colombia, a saber: Instituto Nacional de Salud y Laboratorios Probiol®. Investigación que continúa una agenda académica

importante en toxicología, en la que se extrapola el problema farmacéutico de la producción de antivenenos, a la situación problemática que se presenta en el país y que se ve reflejada en la emergencia sanitaria que aún no ha sido saldada. De tal manera, este trabajo genera algunas aperturas frente a las soluciones futuras referentes al tratamiento de envenenamiento por mordedura de serpiente *B. asper*. Así, como propone un horizonte de indagación a estudios de carácter mixto que permitan mejorar el circuito de administración de los SAP en Colombia.

7 Recomendaciones

Posterior al desarrollo de la metodología, teniendo en cuenta las consideraciones éticas y los hallazgos encontrados en este estudio, es fundamental realizar algunas recomendaciones que a futuro permitan establecer las bases para próximos estudios. Así como generar inquietudes en las instituciones productoras del SAP como motivación a generar avances metodológicos y tecnológicos en la fabricación de los antivenenos bajo el apoyo y supervisión de los entes regulatorios tales como Ministerio de Salud y Protección Social e INVIMA.

Describo a continuación algunas recomendaciones que deberían ser tenidas en cuenta:

- Considerando que este es un estudio exploratorio de las cualidades físico-químicas y biológicas de los SAP's, debe considerarse realizar estudios posteriores más amplios, en los cuales se incluyan una mayor cantidad de muestras, al menos 3 viales por temperatura evaluada, de al menos 2 o 3 lotes de cada SAP's a evaluar, considerando una temperatura adicional entre 36 y 38°C.
- Es importante que a futuro se realicen estudios similares evaluando la neutralización de los venenos de las serpientes *C durissus spp.* y *L. muta spp.*, dado que el SAP está fabricado para estos. Si bien, se podría predecir un comportamiento similar al hallado en el presente estudio, documentarlo por el método científico aportaría conceptos de seguridad y efectividad que complementarían el conocimiento de la estabilidad térmica de las IgG's y la capacidad neutralizante de los SAP's producidos en el país.
- Considerando el diseño usado en este estudio, solo sería relevante evaluar el comportamiento de la neutralización de los venenos en modelos *in vivo*, si los hallazgos *in vitro* requieran comprobación estricta en este tipo de modelo y exista un protocolo ético que disminuya el sufrimiento de los animales experimentales a usar. Dado hay que tener en cuenta el principio de las 3R's, pues la ética profesional, así como la tendencia científica mundial exige que los estudios para evaluar las capacidades neutralizantes de las actividades toxicas de los venenos se enfoquen en la reducción del sufrimiento causado por las pruebas de DL₅₀ y DE₅₀. De igual forma, se sugiere enfocar la producción de conocimiento a través

de la evaluación de la neutralización de actividades específicas de los venenos en modelos *in vitro*.

- Teniendo en cuenta los hallazgos del presente estudio, podría sugerirse a las instituciones productoras del SAP evaluar o reflexionar sobre las técnicas de producción actualmente usadas y/o las posibilidades para innovar otras técnicas que permitan fortalecer las características neutralizantes y la forma farmacéutica final del producto, ya que aspectos como la solubilidad y la estabilidad térmica observada en INS_L a todas las temperaturas evaluadas vs. Probiol es un hallazgo interesante en este aspecto. La implementación de nuevas técnicas de preservación y/o liofilización para antivenenos líquidos podría impactar directamente en la cadena de distribución de los antivenenos y mejorar la atención de las poblaciones afectadas por el accidente ofídico.
- Se sugiere a las instituciones productoras de SAP en Colombia, incluir estudios de estabilidad térmica, así como la evaluación de la neutralización de actividades específicas de los venenos de serpientes usados para la producción del SAP. Adicionalmente, sin quebrantar los protocolos de confidencialidad de los detalles de producción, es prioritario permitir el conocimiento público sobre las condiciones de estabilidad térmica de los SAP. Ya que las condiciones y características del país no siempre corresponden a las condiciones ideales de almacenamiento y preservación del SAP vs. las condiciones recomendadas por el productor

Bibliografía

1. Gutierrez J. M, Williams D, Fan H. W, Warrell D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2010;56(7):1223-35.
2. Warrell D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. *Infectious disease clinics of North America*. 2012;26(2):207-23.
3. Kasturiratne A, Wickremasinghe A. R, de Silva N, Gunawardena N. K, Pathmeswaran A, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS medicine*. 2008;5(11):1591-604.
4. Gutierrez J. M, Burnouf T, Harrison R. A, Calvete J. J, Kuch U, et al. A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. *Bulletin of the World Health Organization*. 2014;92(7):526-32.
5. Gutierrez JM, Theakston R.D, Warrell D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS medicine*. 2006;3(6):e150.
6. Gutierrez J. M. Reducing the impact of snakebite envenoming in Latin America and the Caribbean: achievements and challenges ahead. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;108(9):530-7.
7. Herrera M, Solano D, Gómez A, Villalta M, Vargas M, et al. Physicochemical characterization of commercial freeze-dried snake antivenoms. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2017;126:32-7.
8. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez J. M, Ratanabanangkoon K, et al. Epidemiological background. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 2 de septiembre de 2017]; P. 8-9. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.
9. Gutierrez J. M, Warrell D. A, Williams D.J, Jensen S, Brown N, et al. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(6):e2162.
10. The Lancet. Snake-bite envenoming: a priority neglected tropical disease. *The Lancet*. 2017;390(10089):2.
11. Espino-Solis G. P, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani L. D. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *Journal of Proteomics*. 2009;72(2):183-99.
12. Warrel D. A. Guidelines for the management of Snake bites: World Health Organization; 2010. [citado: 4 de febrero de 2016] Disponible en: http://apps.searo.who.int/PDS_DOCS/B4508.pdf.
13. León L. J. Informe Final del Evento Accidente Ofídico, Colombia, 2015. Instituto Nacional de Salud; 2015.
14. Recommendations for the adoption of additional diseases as neglected tropical diseases: World Health Organization; 2017 [citado: 5 de octubre de 2017]. [internet]. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/Adoption_additional_NTDs.pdf?ua=1.
15. Bravo C.A. Modelo matemático epidemiológico para estimar el sub-reporte de envenenamiento por serpientes en Colombia [tesis para obtener el título de Magister]. Bogotá: Universidad de los Andes; 2015.
16. Otero R, Nuñez V, Barona J, Diaz A, Saldarriaga M. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos

- farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Choco. *IATREIA*. 2002;15(1).
17. Peña L. M. Accidente Ofídico Bothrópico y Lachesico. En: Peña L. M, Zuluaga A. F, editores. *Protocolos de manejo del paciente intoxicado*. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; 2012. p. 226-33.
 18. Walteros D, Paredes A, León L. J. *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Accidente ofídico*. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis; 2015. p. 1-28.
 19. Harrison R. A, Hargreaves A, Wagstaff S. C, Faragher B, Laloo D. G. Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(12):e569.
 20. Williams D, Gutiérrez J. M, Harrison R, Warrell D. A, White J, Winkel K. D, et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*. 2010; 375(9708):89–91.
 21. Alirol E, Lechevalier P, Zamatto F, Chappuis F, Alcoba G, et al. Antivenoms for Snakebite Envenoming: What Is in the Research Pipeline? *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(9):e0003896.
 22. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez J. M, Ratanabanangkoon K, et al. WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 59th meeting; Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010. p. 1-141.
 23. Goswami P. K, Samant M, Srivastava R. S. Snake Venom, Anti-Snake Venom & Potential of Snake Venom *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(5):4-7.
 24. Isbister G. K. Antivenom efficacy or effectiveness: the Australian experience. *Toxicology*. 2010;268(3):148-54.
 25. Philadelphia-Wahby A. F, Ezz-El-deen N. A, Mohamed K. F, Samir A, El-Hariri M, et al. Production of Polyvalent Region-Specific Antivenom. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*. 2010;2(2):62-71.
 26. Gutiérrez J. M, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. 2011;39(2011):129-42.
 27. Chippaux J. P, Goyffon M. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1998;36(6):823-46.
 28. Otero R, Gutiérrez J, Mesa B, Duque E, Rodríguez O, et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2002;40(8):1107-14.
 29. Gutiérrez J. M, Fan H. W, Silver - C L. M, Angulo Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2009;53(2009):625-30.
 30. Solano G, Segura Á, Herrera M, Gómez A, Villalta M, et al. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2010;38(5):577-85.
 31. Brown N, Landon J. Antivenom: The most cost-effective treatment in the world? *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2010;55(7):1405-7.
 32. Morais V, Massaldi H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2006;12:497-511.
 33. Walteros-Acero D. M. Informe del Evento Accidente Ofídico hasta el periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2014. Proceso, vigilancia y análisis del riesgo en Salud Pública. Bogotá; 2014.

34. Gómez J. P. Accidente por animales ponzoñosos y venenosos. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2011;29(4):419-31.
35. Ahmed S. M, Ahmed M, Nadeem A, Mahajan J, Choudhary A, et al. Emergency treatment of a snake bite: Pearls from literature. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock*. 2008;1(2):97–105.
36. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez J. M, Ratanabanangkoon K, et al. Immunization regimens and use of adjuvant. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland, World Health Organization, [citado: 12 de septiembre de 2017]. P. 33-39. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1
37. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez J. M, Ratanabanangkoon K, et al. Preclinical assessment of antivenoms. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 12 de septiembre de 2017]; Págs 75-80. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.
38. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez J. M, Ratanabanangkoon K, et al. Stability, storage and distribution of antivenoms. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado 15 de marzo de 2016]; Págs 73-4. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.
39. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez J. M, Ratanabanangkoon K, et al. Quality control of antivenoms. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 20 de marzo de 2016]; P. 68-73. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.
40. Instituto Nacional de Salud. Suero antiofídico polivalente Bogotá, Colombia; 2015 [citado: 6 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Produccion/Paginas/suero-antiofídico-polivalente.aspx>.
41. Probiol. Ficha Técnica, Suero Antiofídico Polivalente Liofilizado Bogotá, Colombia: Laboratorios Probiol®; [citado: 6 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.probiol.com/images/pdf/probiolsueropolivalente.pdf>.
42. Otero-Patino R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of Bothrops asper bites. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2009;54(7):998-1011.
43. Resolución Número 2934 de 2004. Por la cual se declara una emergencia sanitaria. Bogotá, Colombia: Ministerio de la Protección social; 2004. p. 1-2.
44. Resolución Número 2672 de 2010. Por la cual se declara una emergencia sanitaria. Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud y Protección Social; 2010. p. 1-2.
45. Resolución Número 1300 de 2014. Por la cual se declara una emergencia nacional en salud pública (emergencia sanitaria) en el territorio nacional. Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud y Protección Social; 2014. p. 1-2.
46. Laboratorio y liberación de lotes (vacunas, hemoderivados y sueros de origen animal) Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA); 2014 [citado: 7 de junio de 2017]. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/vacunas/337-vacunas/laboratorios/3458-laboratorio-y-liberacion-de-lotes-vacunas-hemoderivados-y-sueros-de-origen-animal.html#año-2016>.

47. BACEX [Internet]. Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. Diseño y Desarrollo: Oficina de Sistemas de Información. 2013 [Citado: 6 de octubre de 2016]. Disponible en: http://bacex.mincit.gov.co/di_002_sa.asp?subp=3002101100&button=Continuar.
48. Vargas-Lorenzo I, Vázquez-Navarrete ML, Mogollón-Pérez A. S. Acceso a la atención en salud en Colombia. *Rev salud pública [internet]*. 2010;12(5):701-12.
49. Vargas J. J, Molina M. G. Acceso a los servicios de salud en seis ciudades de Colombia: limitaciones y consecuencias. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2009;27:121-30.
50. Zambrano-Ospina Á. M. Accidente ofídico como evento de interés en salud pública en Colombia: aportes al diseño de estrategias de gestión / Snake bites as events of public health interest in Colombia: contributions to the design of management strategies [Tesis de Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
51. *Journal of Medical Toxicology*. Antidote shortages in the USA: impact and response. *Journal of Medical Toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology*. 2015;11(1):144-6.
52. Herrera M, Tattini V, Jr., Pitombo R. N, Gutierrez J. M, Borgognoni C, et al. Freeze-dried snake antivenoms formulated with sorbitol, sucrose or mannitol: comparison of their stability in an accelerated test. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2014;90:56-63.
53. Chang L, Shepherd D, Sun J, Tang X, Pikal M. J. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: Implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;94(7):1445-55.
54. Al-Abdulla I, Casewell N. R, Landon J. Long-term physicochemical and immunological stability of a liquid formulated intact ovine immunoglobulin-based antivenom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;64:38-42.
55. Harrison R. A, Cook D. A, Renjifo C, Casewell N. R, Currier R. B, et al. Research strategies to improve snakebite treatment: Challenges and progress. *Journal of proteomics*. 2011;74(9):1768-80.
56. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez JM, Ratanabanangkoon K, et al. Antivenoms design: selection of snake venoms. 2010. En: *WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 3 de marzo de 2016]; P. 17-9. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.
57. Vargas M, Segura Á, Villalta M, Herrera M, Gutiérrez J. M, et al. Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. 2015;43(1):37-46.
58. Guidolin R. G, Marcelino R. M, Gondo H. H, Morais J. F, Ferreira R. A, et al. Polyvalent horse F(Ab`)₂ snake antivenom: Development of process to produce polyvalent horse F(Ab`)₂ antibodies anti-african snake venom. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(16):2446-55.
59. Dart R. C, Seifert S. A, Carroll L, Clark R. F, Hall E, et al. Affinity-Purified, Mixed Monospecific Crotalid Antivenom Ovine Fab for the Treatment of Crotalid Venom Poisoning. *Annals of emergency medicine*. 1997;30(1):33-9.
60. Chippaux J. P. Role of antivenoms in the treatment of snake envenomation. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. 2013;197(4-5):993-1006.
61. Lovrecek D, Tomic S. A century of antivenom. *Collegium antropologicum*. 2011;35(1):249-58.

62. Gutiérrez J. M. Understanding and confronting snakebite envenoming: The harvest of cooperation. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2016;109:51-62.
63. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez J. M, Ratanabanangkoon K, et al. Purification of immunoglobulins and immunoglobulin fragments in the production of antivenoms. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 15 de marzo de 2016]; P. 44-56. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.
64. Otero-Patiño R, Segura Á, Herrera M, Angulo Y, León G, et al. Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated [IgG and F(ab')₂] antivenoms, in Bothrops asper bites in Colombia. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2012;59(2):344-55.
65. Gutierrez J. M, Lomonte B, Sanz L, Calvete J.J, Pla D. Immunological profile of antivenoms: preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. *Journal of proteomics*. 2014;105:340-50.
66. Chippaux J. P, Balde M. C, Sessinou E, Yero Boiro M, Massougbodji A. Evaluation of a new polyvalent antivenom against snakebite envenomation (Inoserp(R) Panafrican) in two different epidemiological settings: Northern Benin and Maritime Guinea. *Medecine et sante tropicales*. 2015;25(1):56-64.
67. Rojas G, Espinoza M, Lomonte B, Gutiérrez J. M. Effect of storage temperature on the stability of the liquid polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1990;28(1):101-5.
68. Gutiérrez J. M, Avila C, Rojas E, Cerdas L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1988;26(4):411-3.
69. Rodrigues-Silva R, Antunes G. F, Velarde D. T, Santoro M. M. Thermal stability studies of hyperimmune horse antivenoms. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1999;37(1):33-45.
70. Ramirez J, Renjifo J. M, Forero M. A. Estabilidad de la actividad neutralizante del antiveneno ofídico conservado a 4°C y 16°C contra el veneno de tayas (complejo Bothrops atrox-asper) de Colombia. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*. 1994;14(4):204-8.
71. Ramírez J, Renjifo J. M, Forero M. A. Estabilidad de la actividad neutralizante del antiveneno ofídico conservado a 4°C y a 16°C contra el veneno de Cascabel (Crotalus durissus cumansensis) de Colombia. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*. 1995;15(4):215-9.
72. Hurtado G. Análisis del comportamiento promedio y tendencias de largo plazo de la temperatura máxima media para las regiones hidroclimáticas de Colombia Bogotá: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM); 2014 [citado: 6 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co/documents/21021/21138/Analisis+del+Comportamiento+de+la+Temperatura+Maxima.pdf/2a2f247c-f457-45f3-ac9a-f2a481f8daa6>.
73. Resolución Número 3690 de 2016. Por la cual se expide la Guía de Estabilidad de Medicamentos Biológicos Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud y la Protección Social; 2016. p. 1-18.
74. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez JM, Ratanabanangkoon K, et al. Preclinical assessment of antivenoms. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 12 de septiembre de 2017]. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.

75. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Guía de liberación de lotes de vacunas, hemoderivados y sueros de origen animal (suero antiofídico) Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA); 2017 [citado: 3 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/images/pdf/vacunas/Guia-de-Liberacion-de-Lote.pdf>.
76. León Nuñez L. J. Informe del evento accidente ofídico hasta el periodo epidemiológico XIII Colombia, 2016. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2016.
77. Resolución Número 3690 de 2016. Por la cual se expide la Guía de Estabilidad de Medicamentos Biológicos. Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud y la Protección Social; 2016. p. 1-18.
78. Gutierrez J. M, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura A, et al. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins (Basel)*. 2017;9(5).
79. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Listado de medicamentos vitales no disponibles Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA); 2014 [citado: 24 de septiembre de 2017]. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/pdf/salas-especializadas/CR_1_LISTADO%20DE%20MEDICAMENTOS%20VITALES%20NO%20DISPONIBLES_Marzo%202016.pdf.
80. Bardales F. R. "Ofidismo: experiencia clínica en la Amazonía Peruana". I Curso Internacional de Enfermedades infecciosas; Perú. 2006.
81. Villanueva M, Maguina C, Cabada M. Ofidismo en la provincia de Chanchamayo, Junín: revisión de 170 casos consecutivos en el Hospital de Apoyo de La Merced. *Rev Med Hered*. 2004;15(2).
82. Gómez J.P. Accidente por animales ponzoñosos y venenosos: su impacto en la salud ocupacional en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2011;29(4):419 - 31.
83. Warrel D. A. Venomous Bites, Stings, and Poisoning. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2012;26(2):207-23.
84. Gutierrez J. M, Williams D, Fan H, Warrell D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2010;56(7):1223-35.
85. Kasturiratne A, Wickremasinghe A. R, De Silva N, Gunawardena N. K, Pathmeswaran A, et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS medicine*. 2008;5(11):1591-604.
86. Feitosa E. S, Sampaio V, Sachett J, Castro D. B, Noronha M, et al. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015;48 Suppl 1:34-41.
87. Janaka de Silva D, Anuruddha A. Snakebite: The true disease burden has yet to be determined. *The Ceylon Medical Journal*. 2013;58(3):93-5.
88. Rahman R, Faiz M. A, Selim S, Rahman B, Basher A, et al. Annual Incidence of Snake Bite in Rural Bangladesh. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(10):e860.
89. Pugh R. N, Theaskston R. D, Reid H. A. Malumfashi Endemic Diseases Research Project, XIII. Epidemiology of human encounters with the spitting cobra, *Najanigracollis*, in the Malumfashi area of northern Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1980;74:523-30.
90. Snow R. W, Bronzan R, Roques T, Nyamawi C, Murphy S, Marsh K. The prevalence and morbidity of snake bite and treatment-seeking behaviour among a rural Kenyan population. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1994;88(6):665-71.

91. Gutiérrez J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*. 2002;50:377-94.
92. Chaves L. F, Chuang T. W, Sasa M, Gutierrez J. M. Snakebites are associated with poverty, weather fluctuations, and El Niño. *Science advances*. 2015;1(8):e1500249.
93. Gutiérrez G. Estrategias de Forrajeo. 1998. En: *Manual de Análisis Experimental del Comportamiento* [Internet]. Madrid: Librería Nueva, [citado: 28 de junio/2017]; Págs 359-81. Disponible en: <http://www.docentes.unal.edu.co/gahermannr/docs/1998%20Estrategias%20de%20Forrajeo.pdf>.
94. Santacoloma-Suárez A, Quiroga-Baquero L. Perspectivas de estudio de la conducta alimentaria. *Revista Iberoamericana de Psicología: Ciencia y Tecnología*. 2009;2(2):7-15.
95. Rojas M, Pérez D, Clavijo A, García-Leal O, Gutiérrez G. Efectos de la dispersión de alimento sobre la elección y los patrones de exploración. *Acta de investigación psicológica* [Internet]. 2011 [citado: 28 Junio de 2017; 1:132-48. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-48322011000100011&nrm=iso.
96. Sasa M, Wasko D. K, Lamar W. W. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2009;54(7):904-22.
97. Wright S. J, Carrasco C, Calderon O, Paton S. The El Niño Southern Oscillation, Variable Fruit Production, and Famine in a Tropical Forest. *Ecology*. 1999;80(5):1632-47.
98. Wasko D. K, Sasa M. Food resources influence spatial ecology, habitat selection, and foraging behavior in an ambush-hunting snake (Viperidae: *Bothrops asper*): an experimental study. *Zoology (Jena, Germany)*. 2012;115(3):179-87.
99. León L. J. Informe del Evento Accidente Ofídico hasta el periodo epidemiológico XII, Colombia, 2015. Instituto Nacional de Salud; 2015.
100. Instituto Nacional de Salud. Informe Epidemiológico de Evento, Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2016 [Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Paginas/informes-de-evento.aspx>].
101. Pineda D, Rengifo J. Accidentes por animales venenosos: accidente ofídico. Informe del Evento Accidente Ofídico Final Año 2012. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2012.
102. Ahmed S. M, Ahmed M, Nadeem A, Mahajan J, Choudhary A, et al. Emergency treatment of a snake bite: Pearls from literature. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock*. 2008;1(2):97-105.
103. Warrell D. A. Snake bite. *The Lancet*. 2010;375(9708):77-88.
104. Franco F. L. Origem e Diversidade das Serpentes. En: Cardoso F. F, Wen F, Malaque C, Haddad J. V, editores. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sao Paulo: Sarvier; 2003. p. 13-32.
105. Wallach V, Williams K. L, Boundy J. *Snakes of the world: a catalogue of living and extinct species*. Boca Ratón, FL: CRC Press; 2014.
106. Campbell J, Lamar W. W. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Campbell J, Lamar W. W, editores: Cornell University Press; 2004.
107. Gómez J.P. Accidente por animales ponzoñosos y venenosos: su impacto en la salud ocupacional en Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2011;29(4):419-31.
108. Rodríguez A. L. *Comportamiento general de los accidentes provocados por animales venenosos en Colombia entre 2006 y 2010, atendidos en el centro de investigación, gestión e información toxicológica de la Universidad Nacional de Colombia* [Tesis Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
109. Ayerbe S, Latorre J. *Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico*. República de Colombia. Gobernación del

- Departamento del Cauca, Secretaría Departamental de Salud: Editorial López; 2009. 60 p.
110. Otero R, Osorio R. G, Valderrama R, Giraldo C. A. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1992;30(5-6):611-20.
 111. Nanjaraj Urs A. N, Ramakrishnan C, Joshi V, Suvilesh K. N, Veerabasappa Gowda T, et al. Progressive Hemorrhage and Myotoxicity Induced by *Echis carinatus* Venom in Murine Model: Neutralization by Inhibitor Cocktail of N,N,N',N'-Tetrakis (2-Pyridylmethyl) Ethane-1,2-Diamine and Silymarin. *PLoS one*. 2015;10(8):e0135843.
 112. Vieira L. F, Magro A. J, Fernandes A. H, de Souza B. M, Cavalcante L.G, et al. Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Biochimie*. 2013;95(12):2365-75.
 113. McCleary R.Jr, Kini R. M. Snake bites and hemostasis/thrombosis. *Thrombosis research*. 2013;132(6):642-6.
 114. Escalante T, Rucavado A, Fox J. W, Gutiérrez J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of proteomics*. 2011;74(9):1781-94.
 115. Andrews R. K, Booth W. J, Gorman J. J, Castaldi P. A, Berndt M. C. Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry*. 1989;28(21):8317-26.
 116. Rucavado A, Soto M, Kamiguti A. S, Theakston R. D, Fox J. W, et al. Characterization of Aspercetin, a Platelet Aggregating Component from the Venom of the Snake *Bothrops asper* which Induces Thrombocytopenia and Potentiates Metalloproteinase-induced Hemorrhage. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;85(4):710-5.
 117. Matsui T, Hamako J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2005;45(8):1075-87.
 118. Castro H. C, Lemos G. J, Bon C, Zingali R. B. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2003;41(4):525-8.
 119. Lomonte B, Gutierrez J. M. Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta chimica Slovenica*. 2011;58(4):647-59.
 120. Teixeira C. F, Landucci E. C, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2003;42(8):947-62.
 121. Castrillón-Estrada D. F, Acosta J. G, Hernández-Ruiz E. A, Alonso L. M. Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte*. 2007;23(1):96-111.
 122. Colombini M, Fernandes I, Cardoso D. F, Moura-da-Silva AM. *Lachesis muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2001;39(5):711-9.
 123. Ayerbe S, Rodríguez J. R. Accidentes por animales venenosos y plantas tóxicas, Accidente ofídico Crotálico. En: Correa L. F, Berdejo J. P, Mora V. H, Sánchez D. M, Gutiérrez M, editores. *Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas Grupo de Atención de Emergencias y Desastres*. Bogotá, Colombia: Imprenta Nacional de Colombia; 2008. p. 284-6.

124. Melani R. D, Araujo D.T, Carvalho P.C, Goto L, Nogueira C.S, et al. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venome of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *EuPA Open Proteomics*. 2015;8:144-56.
125. Cavalcante L. G, Ponce-Soto L. A, Marangoni S, Gallacci M. Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;96:46-9.
126. Peña L. M. Accidente Ofídico Crotálico. En: Peña L. M, Zuluaga A. F, editores. *Protocolos de manejo del paciente intoxicado*. 1 ed. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; 2012. p. 240-42.
127. Brahma R. K, McCleary R. J, Kini R. M, Doley R. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;93:1-10.
128. Koh C. Y, Kini R. M. From snake venom toxins to therapeutics - cardiovascular examples. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2012;59(4):497-506.
129. Hemmi R, Alves C, Perales J, da Costa Neves-Ferreira A. G. Snake Venom Proteopectidomics: What Lies Behind the Curtain. 2014. En: *Venom Genomics and Proteomics [Internet]*. Springer Link: Springer, [citado: 6 de febrero 2016]; p.1-30.
130. Leon G, Sanchez L, Hernandez A, Villalta M, Herrera M, Segura A, et al. Immune response towards snake venoms. *Inflammation & allergy drug targets*. 2011;10(5):381-98.
131. Calvete J. J. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;75:44-62.
132. EcologiaHoy. Serpientes venenosas EcologiaHoy.com2013 [citado: 6 de febrero 2016]. Disponible en: <http://www.ecologiahoy.com/serpientes-venenosas>.
133. Ali J. Modern Aspects of Snake Venom LinkedIn SlideShare2015. [citado: 6 de febrero 2016]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/alijishan786/modern-aspects-of-snake-venom>.
134. Richards D. P, Barlow A, Wuster W. Venom lethality and diet: differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*). *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2012;59(1):110-6.
135. Sousa L. F, Nicolau C. A, Peixoto P. S, Bernardoni J. L, Oliveira S. S, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(9):e2442.
136. Thorpe R. S, Daltry J, Wuster W, Malhotra A, Thorpe N. L. The biology of dangerous snakes: systematics and venom evolution. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1995;33(5):589.
137. Barlow A, Pook C. E, Harrison R. A, Wüster W. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009;276(1666):2443-9.
138. Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yarlequé A. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2012;29:198-205.
139. Gutierrez J. M, Leon G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. 2011;39(3):129-42.
140. Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, et al. Snake Venomomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of proteome research*. 2008;7(8):3556-71.
141. Lomonte B, Gené J, Gutiérrez J, Cerdas L. Estudio comparativo de los venenos de serpiente Cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién

- nacidos. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1983;21(3):379-84.
142. Gutiérrez J. M, dos Santos M. C, de Fatima-Furtado M, Rojas G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1991;29(10):1273-7.
 143. Menezes M. C, Furtado M. F, Travaglia-Cardoso S. R, Camargo C. M, Serrano M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2006;47(3):304-12.
 144. Dos-Santos M. C, Arroyo C, Solano S, Herrera M, Villalta M, et al. Comparison of the effect of *Crotalus simus* and *Crotalus durissus ruruima* venoms on the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom: Implications for the production of polyspecific snake antivenoms. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2011;57(2):237-43.
 145. Correa-Netto C, Teixeira-Araujo R, Aguiar A. S, Melgarejo A. R, De-Simone S. G, et al. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2010;55(7):1222-35.
 146. Arroyo C, Solano S, Herrera M, Segura Á, Estrada R, et al. *Lachesis stenophrys* venom reduces the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom used as co-immunogen in the production of polyspecific snake antivenom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;103:99-105.
 147. Gawade S. P. Snake venom neurotoxins: Pharmacological classification. *J Toxicol-Toxin Rev*. 2004;23(1):37-96.
 148. Peña L. M. Accidente Ofídico Elapídico. En: Peña L. M, Zuluaga A. F, editors. *Protocolos de manejo del paciente intoxicado*. 1 ed. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; 2012. p. 234-40.
 149. Renjifo C, Smith E. N, Hodgson W. C, Renjifo J. M, Sanchez A, et al. Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: An evolutionary perspective. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2012;59(1):132-42.
 150. White J. Venomous animals: clinical toxicology. En: Luch A, editor. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 2: Clinical Toxicology*. Basel: Birkhäuser Basel; 2010. p. 233-91.
 151. Hirschowitz E. A, Yannelli J. R. Immunotherapy for lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009;6(2):224-32.
 152. Shahani L, Singh S, Khardori N. M. Immunotherapy in Clinical Medicine: Historical Perspective and Current Status. *Medical Clinics of North America*. 2012;96(3):421-31.
 153. Inogés S, Rodríguez Calvillo M, López Díaz de Cerio A, Zabalegui N, Melero I, et al. Inmunoterapia activa en el tratamiento de neoplasias hematológicas. *Anales Sis San Navarra*. 2004;27(1):45-62.
 154. Waldmann T. A. Immunotherapy: past, present and future. *Nature medicine*. 2003;9(3):269-77.
 155. Fitzhugh D. J, Lockey R. F. History of Immunotherapy: The First 100 Years. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2011;31(2):149-57.
 156. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez JM, Ratanabanangkoon K, et al. Selection and veterinary health care of animals used for production of antivenoms. 2010. En: *WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins* [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 25 de marzo de 2016]; p.31-2. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.

157. Padilla A, Bon C, Burnouf T, Gutiérrez JM, Ratanabanangkoon K, et al. Collection and control of animal plasma for fractionation. 2010. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 10 de septiembre de 2017]; p.39-43. Disponible en: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1.
158. Litwin S, Isabettini A. O, Calderón L, Varni L. M. Optimización en la recuperación de inmunoglobulinas, como molécula entera y fragmento F(ab')₂, en la producción de antivenenos. *Acta toxicol argent*. 2014;22(2):82-9.
159. dos Santos M. C, D'Império Lima M. R, Furtado G. C, Colletto D. D, Kipnis T. L, et al. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1989;27(3):297-303.
160. Rojas G, Jiménez J, Gutiérrez J. M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 1994;32(3):351-63.
161. Sarciaux J. M, Mansour S, Hageman M. J, Nail S. L. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(12):1354-61.
162. Maury M, Murphy K, Kumar S, Mauerer A, Lee G. Spray-drying of proteins: effects of sorbitol and trehalose on aggregation and FT-IR amide I spectrum of an immunoglobulin G. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;59(2):251-61.
163. Litwin S, Isabettini A. O, Calderón L, Varni LM. Optimización en la recuperación de inmunoglobulinas, como molécula entera y fragmento F(ab')₂, en la producción de antivenenos. *Acta toxicológica argentina*. 2014;22:82-9.
164. Renjifo C. Bioinformatic design of toxin-specific antivenom to improve the treatment of snakebite in Africa. [Tesis Doctorado]. Liverpool, Inglaterra: University of Liverpool; 2014.
165. Warrell D. A, Davidson N, Greenwood B. M, Ormerod L. D, Pope H. M, et al. Poisoning by bites of the saw-scaled or carpet viper (*Echis carinatus*) in Nigeria. *The Quarterly journal of medicine*. 1977;46(181):33-62.
166. Warrel D. A. Clinical toxicology of snakebite in África and the middle east / Arabian peninsula. En: Meier J, White J, editores. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1995. p. 472.
167. Habib A. G, Abubakar S. B, Abubakar I. S, Larnyang S, Durfa N, et al. Envenoming after carpet viper (*Echis ocellatus*) bite during pregnancy: timely use of effective antivenom improves maternal and foetal outcomes. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2008;13(9):1172-5.
168. Instituto Nacional de Salud. Reseña Histórica Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2016 [citado: 9 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/conocenos/Paginas/rese%C3%B1a-historica.aspx>.
169. Laboratorios Probiol. Nosotros, La Empresa Bogotá, Colombia: Laboratorios Probiol; 2016 [citado: 9 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.probiol.com/index.php/nosotros>.
170. Instituto Nacional de Salud. Planta de Antivenenos, Proceso de Producción Suero antiofídico Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2015 [citado: 2016 6 de enero]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Produccion/Paginas/hacienda-galindo-y-serpentario.aspx#.WdITIVuCzIU>.
171. Decreto Número 0868 de 2015. Por el cual se amplía la vigencia del Decreto 1375 de 2014 en el marco de emergencia nacional en salud pública. Bogotá, Colombia: Ministerio de salud y de la Protección Social; 2015. p. 1-2.

172. Resolución Número 1478 de 2016. Por la cual se prorroga la emergencia sanitaria declarada mediante las Resoluciones 1300 , 1301, 1302 de 2014. Bogotá, Colombia: Ministerio de la Protección social; 2016. p. 1-3.
173. Gutiérrez J. M, Gondo Higashi H, Hui Wen F, Burnouf T. Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: Report of a workshop. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2007;49(1):30-5.
174. Ospina de Nigrinis L. El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos. Parte I. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* [Internet]. 1994; 22(1):7-12. Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56499/55452>.
175. Singh S, Junwal M, Modhe G, Tiwari H, Kurmi M, et al. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;49:71-88.
176. ICH Expert Working Group. Stability testing of new drug substances and products: International Conference on Harmonisation (ICH); 2003 [citado: 6 de abril de 2017]. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf.
177. Documento técnico guía de estabilidad de medicamentos. Bogotá, Colombia: Ministerio de la Protección Social, República de Colombia; 2010 [citado: 8 de abril de 2017]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GU%C3%8DA%20PARA%20EL%20DESARROLLO%20Y%20PRESENTACI%C3%93N%20DE%20LOS%20ESTUDIOS%20DE%20ESTABILIDAD%20DE%20MEDICAMENTOS%20CONVENCIONALES.pdf>.
178. ICH Expert Working Group. Quality of biotechnological products: Stability testing of Biotechnological/Biological products, annex to the tripartite ICH guideline for the stability testing of new drug substances and products: International Conference on Harmonisation (ICH); 1995 [citado: 12 de julio de 2017]. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf.
179. Navarro Alfano M. La Liofilización de Productos Farmacéuticos. *Sintefarma*. 1998;4(1).
180. Kasper J. C, Friess W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2011;78(2):248-63.
181. Wanning S, Süverkrüp R, Lamprecht A. Pharmaceutical spray freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;488(2015):136-53.
182. Avis K. E, Levchuck J. W. Preparados Parenterales. En: Genaro A.R, editor. *Reminton: The Science and Practice of Pharmacy*. Montevideo: Editorial Medica Panamericana; 2000. p. 931-6.
183. Hill R. E, Bogdan G. M, Dart R. C. Time to reconstitution: purified Fab antivenom vs. unpurified IgG antivenom. *Toxicon*. 2001;39(5):729-31.
184. Quan A. N, Quan D, Curry S. C. Improving Crotalidae polyvalent immune Fab reconstitution times. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2010;28(5):593-5.
185. Iliyasu G, Tihamiyu A. B, Daiyab F. M, Tambuwal S. H, Habib Z. G, Habib A. G. Effect of distance and delay in access to care on outcome of snakebite in rural north-eastern Nigeria. *Rural Remote Health*. 2015;15(4):3496.
186. Theakston R. D, Warrell D. A, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003;41(5):541-57.

187. Gerring D, King TR, Branton R. Validating a faster method for reconstitution of Crotalidae Polyvalent Immune Fab (ovine). *Toxicon*. 2013;69:42-9.
188. Mahler H-C, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(9):2909-34.
189. Sino Biological Inc. Sandwich ELISA, Highly Sensitive ELISA Enciclopedia. 2014 [citado: 4 de octubre de 2015] Disponible en: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>.
190. Ochoa R. F. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Ochoa R. F, Betancourt V, editores. La Habana: Finlay Ediciones; 2012.
191. Robles A, Gene J. A. Determinación de la dosis letal 50% por el método de Spearman-Kärber. *Toxicol. Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, San José Publicación Offset*. 1990:1-6.
192. de Souza L. L, Stransky S, Guerra-Duarte C, Flor-Sá A, Schneider F. S, et al. Determination of Toxic Activities in Bothrops spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between In Vitro Versus In Vivo Assays. *Toxicological Sciences*. 2015;147(2):458-65.
193. Gómez G. N, Nerli B. B, Acosta O. C, Picó G. A, Leiva L. C. An alternative method to isolate protease and phospholipase A2 toxins from snake venoms based on partitioning of aqueous two-phase systems. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2012;8(3):306-16.
194. Wang W. J, Shih C. H, Huang T. F. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from Agkistrodon acutus venom. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324(1):224-30.
195. Theakston R. D, Reid H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*. 1983;61(6):949-56.
196. Sells P. G. Animal experimentation in snake venom research. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2003;42(2003):115-33.
197. Pereañez J. A, Jiménez S. L, Quintana J. C, Nuñez V, Fernández M, Restrepo Y. Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta producidas por el veneno de Bothrops asper por extractos etanólicos de tres especies de Heliconias. *VITAE*. 2008;15(1):157-64.
198. Universidad de Antioquia. Muestreo e Inferencia Estadística. Aprende en línea, Moodle: Universidad de Antioquia; 2007.
199. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
200. Nuñez V, Fernández M, Rey-Suárez P, Pereañez J. A. Development of a sensitive enzyme immunoassay (ELISA) for specific identification of Lachesis acrochorda venom. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2012;18(2):173-9.
201. Ferrari S, Cribari-Neto F. Beta Regression for Modelling Rates and Proportions. *Journal of Applied Statistics*. 2004;31(7):799-815.
202. Team R.C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016.
203. Segura Á, Herrera M, González E, Vargas M, Solano G, et al. Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: Towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2009;53(6):609-15.
204. Cribari-Neto F, Zeileis A. Beta Regression in R. *Journal of Statistical Software*; Vol 1, Issue 2 (2010). 2010.
205. Díaz Monroy L, Morales Rivera M. Análisis estadístico de datos multivariados [monografía de Internet]. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia.

2012. [citado julio 18, 2017]. disponible en: Catálogo Bibliotecas Universidad Nacional de Colombia.

Anexos

A. Materiales

Determinación de títulos de anticuerpos por el método de E.L.I.S.A

- Buffer de pegado: Buffer de Carbonatos pH 9.6 (100ml)
 - Na₂CO₃ (carbonato de sodio) 0.159gr
 - NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) 0.293 gr
 - H₂O desionizada 100ml

Ajustar pH con el carbonato o el bicarbonato, según se requiera

- Buffer para bloquear (100ml)
 - Buffer de carbonatos pH9.6
 - BSA 2% 2gr
- PBS pH 7.2 para 2.5L
 - NaCl (cloruro de sodio) 25gr
 - KH₂PO₄ (fosfato de potasio) 0.625gr
 - Na₂HPO₄ (fosfato de disodio) 3.595 gr
 - KCl (cloruro de potasio) 0.625 gr
 - H₂O 2.5L

Ajustar el pH7.4 con HCl o NaOH, o preparar de acuerdo a lo que se requiera

- Buffer para diluir muestras
 - PBS con 1% de BSA pH7.4 (2gr de BSA + 200ml de PBS)
- Buffer de lavado
 - PBS + 0.05% de Tween 20. Para 4L 2ml de Tween
- Tampón Citrato pH 6.0
 - Preparar 2 soluciones:
 - Ácido cítrico (solución A) 0.1M = 1.25gr
 - H₂O 50ml
 - Citrato de sodio (solución B) 0.1M =1.46gr
 - H₂O 50ml
- OPD
 - 1mg de OPD por ml de tampón citrato, adicionar 1µL de peróxido de hidrogeno por cada ml de la solución anterior. Preparar al momento de usar. Así, para 10ml son: 10mg de OPD, 10ml de tampón citrato y 10µL de peróxido. Mantener protegido de la luz
- Solución de pare
 - Preparar solución madre: 1.1ml H₃PO₄ + 0.4ml HCl aforar a 10ml con agua destilada. A partir de ésta se prepara la solución de pare que es 2.5ml de solución madre y 7.5ml de H₂O
- IgG marcada con peróxidasa anti IgG de Caballo, dilución 1:8000 (2.3 µL para 2000µL)
- Antivenenos INS y Probiol almacenados a 4, 22 y 45 °C (1µL)
- Stock de veneno de *B. asper* 1µg/1µL
- Platos de E.L.I.S.A. estériles

- Tubos de ensayo
- Micropipetas 1-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L y 1000-5000 μ L
- Gradilla

Electroforesis en gel de poliacrilamida

- Solución de monómeros de acrilamida

29,2 g de acrilamida

0,8 g de bis-acrilamida

Disolver en agua desionizada y aforar a 100ml, filtrar y guardar en botella ámbar en refrigeración.

- Amortiguador del gel separada (inferior)

18,5 gr de Tris a pH de 8,8

Aforar a 100ml con agua desionizada y guardar en refrigeración.

- Amortiguador del gel espaciador (superior)

3 g de Tris a pH de 6,8

Aforar a 100ml con agua desionizada y guardar en refrigeración.

- Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10x)

12 g Tris – base

57,6 g glicina

4g de SDS

Aforar a 400ml con agua desionizada, a pH de 8,3-8,4. Guardar a temperatura ambiente y diluir 10 veces al momento de utilizar.

- Solución para decolorar

Metanol 60ml

Etanol 30ml

Ácido acético 15ml

Agua 195ml

- Gel inferior, se prepararon 2 geles al 7,5% y 2 geles al 5%

	1 gel al 7.5%	4 geles al 7.5%	1 gel al 10%	3 geles al 10%
Agua desionizada	1167	2334	1167	2334
Amortiguador inferior	1250	2500	1250	2500
SDS	50	100	50	100
Acrilamida/Bis	1250	2500	833,3	1666,6
TEMED	6	12	6	12
Persulfato de amonio	30	60	30	60

El volumen a adicionar a cada vidrio es de 3600 μ L

- Gel superior

	1 gel	4 geles
Agua desionizada	1500	6000
Amortiguador inferior	630	2520
SDS	33	132
Acrilamida/Bis	330	1320
TEMED	5	20
Persulfato de amonio	20	80

- Coomassie Brilliant Blue R-250
- Cámara electroforética
- Vidrios para electroforesis
- Antivenenos (INS, INS_L Y Probiol) a sus respectivas temperaturas 4, 22 y 45°C

Neutralización actividad proteolítica

- Buffer de Tris – HCL 25Mm, NaCl 0.15M, CaCl₂ 5Mm a pH 7.4
- Azocaseína solución de 10mg/ml preparada en Buffer de pH 7.4 (la solución se mantuvo protegida de la luz y a 4°C)
- Ácido tricloroacético al 5% en agua destilada
- Solución de veneno – antiveneno así: INS 4°C, 22°C y 45°C; INS Liofilizado 4°C, 22°C y 45°C; Probiol 4°C, 22°C y 45°C.
- Placas de E.L.I.S.A de fondo plano #1
- Eppendorf # 11
- Micropipeta multicanal
- Micropipeta de 10-100µ y de 100-1000µ y sus respectivas puntas.
- Canaleta (Reagent reservoir) #1

Neutralización de la actividad coagulante

- Eppendorff
- Stock de veneno de *B. asper* 1µg/µL
- Antiveneno de INS, INS_L y Probiol almacenados a 4, 22 y 45°C
- Plasma humano anticoagulado con solución de citrato de sodio 3.8g/dl
- Solución Salina Normal (como buffer)
- Coagulómetro
- Incubadora

Neutralización de la actividad hemolítica indirecta

- Agarosa el 0.8%
- Cloruro de Calcio 0.01M,
- Yema de huevo
- Eritrocitos al 100%

- Tapas de platos de E.L.I.S.A.
- Termómetro
- Erlenmeyer
- Cámara húmeda
- Incubadora
- Probeta
- Solución Salina Normal
- Regla

B. Informe estadístico

El informe estadístico que se presenta a continuación fue realizado por el grupo de Consultoría Estadística del Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, Octubre 2016. Los consultores encargados fueron: Cristian Alexander Avella Reyes³⁶, Oscar Asdrúbal Montes³⁷, Jonnathan Steven Pinzon Zapata³⁸ y Harry Cristhian Torres Moreno³⁹. Este documento corresponde al informe original entregado por ellos, el cual fue convertido de pdf a documento de texto enriquecido con el fin de anexarlo como soporte del análisis estadístico de la presente tesis, por tal razón se mantuvo el formato usado por los consultores.

Diagnóstico del Problema:

El proyecto de maestría busca encontrar los factores que se ven afectados al someter los antivenenos a diferentes temperaturas y tiempo de conservación, el proyecto estaba adelantado en la parte metodológica y los experimentos ya habían sido efectuados en el laboratorio, por lo cual los datos ya estaban recolectados y tabulados en forma conveniente para la solicitante. La siguiente fase del proyecto corresponde a la de análisis de información, motivo de la consultoría

Descripción del Problema:

Una vez manipulado el modo de preservación de los antivenenos con el fin de evaluar la capacidad neutralizante a diferentes temperaturas y en diferentes tiempos, correspondiente a los objetivos del trabajo, se encontraran diferencias por cada una de las variables de la actividad proteolítica, coagulante y hemolítica. Además, se evaluará la diferencia entre los títulos obtenidos de la prueba E.L.I.S.A. aplicada.

Palabras Clave: Títulos de anticuerpos, capacidad neutralizante, liofilizado, Instituto Nacional de Salud, almacenamiento, preservación, *Bothrops asper*, proteolíticos, hemolíticos, coagulante, absorbancia.

1. Objetivos

³⁶caavellar@unal.edu.co

³⁷oamontesb@unal.edu.co

³⁸jspinonz@unal.edu.co

³⁹hctorresm@unal.edu.co

1.1. General:

Evaluar el efecto de almacenamiento de las diferentes formas de preservación de los antivenenos polivalentes producidos en Colombia y mantenidos a diferentes temperaturas sobre sus características físico- químicas y su capacidad neutralizante de algunas de las actividades del veneno de *Bothrops asper*.

1.2. Específicos:

1. Determinar la capacidad neutralizante de las diferentes formas de preservación de los antivenenos polivalentes producidos en Colombia y mantenidos a diferentes temperaturas sobre los efectos proteolítico, hemolítico y coagulante del veneno de *Bothrops asper*.
2. Establecer el efecto de la temperatura sobre los títulos de anticuerpos contra el veneno de *Bothrops asper* en los antivenenos polivalentes producidos en Colombia.

Existen unos objetivos específicos referentes a los cambios físico-químicos de los antivenenos, los cuales se acordó ser abordado en su totalidad por la consultante, pues no existía material suficiente para llevar a cabo un estudio estadístico más allá de conteos.

2. Metodología Estadística a Emplear

Con el fin de dar respuesta a los objetivos propuestos en la investigación, se establecieron varios procedimientos estadísticos teniendo en cuenta las propiedades de las variables de interés. Con respecto al primer objetivo específico, lo que se busca es determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento (4, 22 y 45°C), el tiempo de almacenamiento (3 y 6 meses) y la forma de preservación, Instituto Nacional de Salud (INS), Instituto Nacional de Salud liofilizado (INS_L) y Probiol, sobre la capacidad neutralizante. Dicha capacidad neutralizante se encuentra representada por tres variables, la cuales son:

- Potencial de neutralización proteolítico: Es el porcentaje del valor de absorbancia en cada muestra respecto al control positivo.
- Potencial de neutralización coagulante: Es el tiempo de coagulación de cada muestra sobre el tiempo de coagulación del control positivo, es decir, el número de

veces que se aumenta o disminuye el tiempo de coagulación de cada muestra con respecto al tiempo de coagulación del control positivo.

- Potencial de neutralización hemolítico indirecto: Es el porcentaje del diámetro de hemólisis en cada agarosa-yema de huevo eritrocitos respecto al control positivo.

Los métodos estadísticos llevados a cabo para cada variable fueron los siguientes:

- Potencial de neutralización proteolítico: Para esta variable se ajustó un modelo de regresión *Beta* (201) con función de enlace log y con variables explicativas temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento y forma de preservación. Lo anterior debido a que dicha variable es un porcentaje y toma valores entre cero y uno.
- Potencial de neutralización coagulante: Para esta variable se ajustó un modelo lineal generalizado con respuesta *Gamma* y función de enlace log, con variables explicativas temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento, forma de preservación. Lo anterior debido a que la variable es continua y toma valores positivos.
- Potencial de neutralización hemolítico indirecto: Para esta variable se realizó un análisis netamente descriptivo, lo anterior teniendo en cuenta la falta de variabilidad en el porcentaje del diámetro de hemólisis, lo cual indica que el proceso en estudio se acerca más a un proceso determinístico que a un proceso aleatorio.

Los métodos anteriores fueron seleccionados frente a posibles diseños experimentales con respuesta normal, debido a que con estos últimos se requerían transformaciones que dificultan la interpretación de los resultados en la variable original de interés.

Con respecto al segundo objetivo específico, lo que se busca es poder encontrar diferencias que generan las diferentes temperaturas y el tiempo de preservación en cada uno de los títulos de anticuerpos generados de las pruebas ELISA, estas pruebas arrojan resultados de absorbancias en medidas desde 4.000 a 1.024.000. Una vez elaborado el análisis descriptivo de los resultados, se considerará cada una de estas absorbancias como una variable respuesta de la aplicación de la combinación de factores (temperatura, tiempo) se realizará un análisis de varianza múltiple (manova), con dos factores con sus respectivos niveles (Temperatura y Tiempos de preservación),

la interacción y un bloque (Modo de preservación). Para el análisis de los datos y el ajuste de los diferentes modelos se usó el software estadístico R versión 3.3.0 para Windows con licencia GNU versión 3 (202). Nota: Se aclara que por la naturaleza de la obtención de los resultados, los comentarios y conclusiones a partir de estos análisis son aplicables únicamente a estos mismos.

3. Resultados Obtenidos

3.1. Potencial de Neutralización Proteolítico

3.1.1. Análisis Descriptivo

Para esta variable se tienen 135 observaciones, las cuales se encuentran distribuidas de la siguiente forma dentro de las variables explicativas.

	3 meses			6 meses		
Temperatura	4	22	45	4	22	45
INS	8	8	8	7	7	7
INS_L	8	8	8	7	7	7
PRO	8	8	8	7	7	7

En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se presentan los gráficos Box-Plot por cada variable explicativa discriminando por el resto de variables. Como se observa en la Figura 1, la forma de preservación INS en general siempre tiene un porcentaje de neutralización proteolítico superior, seguido por INS_L; PROBIOL presenta el menor porcentaje de neutralización proteolítico. Este comportamiento se mantiene al discriminar los resultados por la variable tiempo de almacenamiento, aunque en el tiempo 6 meses se observa poca diferencia entre INS y INS_L. Al observar el comportamiento del porcentaje de neutralización proteolítico discriminando por la variable temperatura, se observa que el comportamiento mencionado anteriormente se mantiene, pero las diferencias entre las formas de preservación disminuyen bastante en la temperatura 45. Otro hecho de anotar, es que en general el porcentaje de neutralización proteolítico promedio se encuentra siempre por encima del 77 %, mientras que en el grupo de temperatura de almacenado de 45 grados centígrados, el porcentaje de neutralización promedio es el más bajo de todos con el 72 %.

En la Figura-2 se observa que en general el porcentaje de neutralización proteolítico es mayor a los 6 meses de almacenamiento, aunque en este grupo hay unas pocas observaciones que presentan porcentajes muy bajos de neutralización respecto al

comportamiento general. También se observa que en la temperatura 45 el porcentaje de neutralización es menor que en las otras temperaturas.

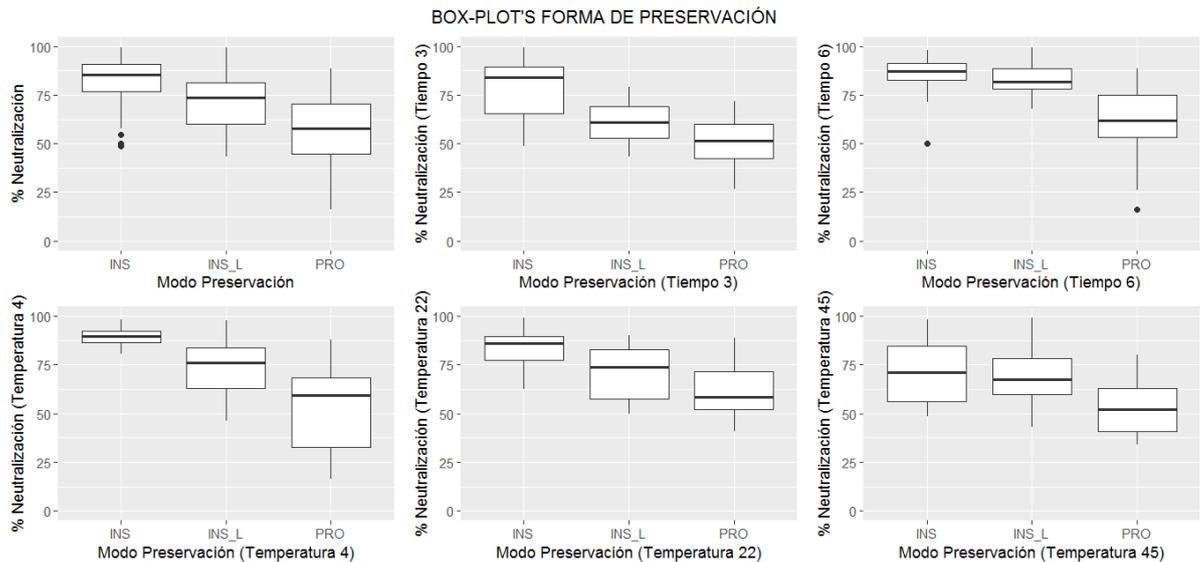
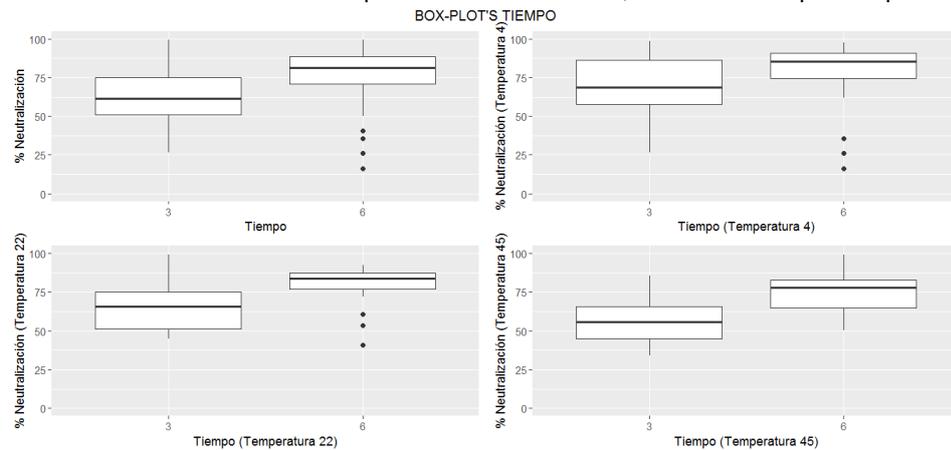


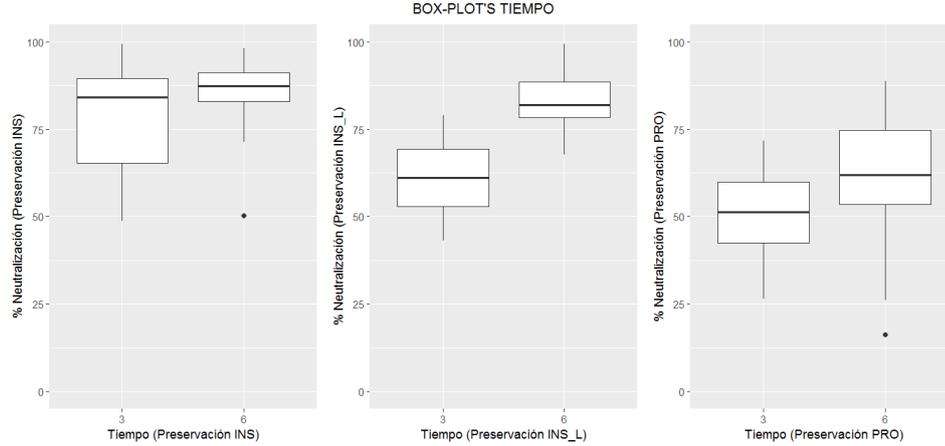
Figura-1: Box-Plot's de la variable Forma de Preservación.

Figura-2: Box-Plot's de la variable Tiempo de Almacenamiento, discriminando por temperatura.



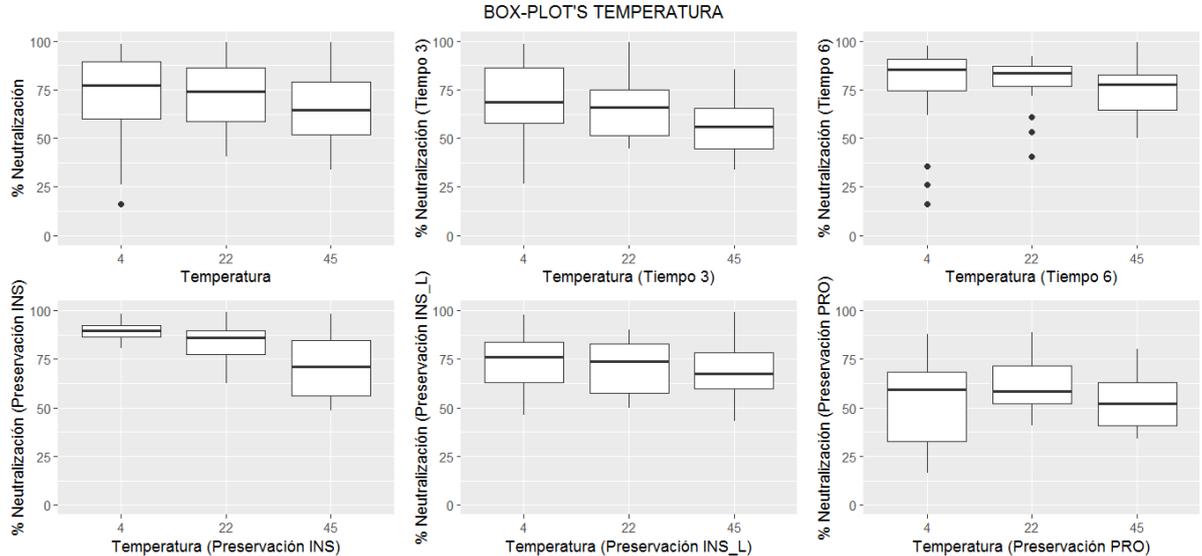
En la Figura-3 se observa que en general el porcentaje de neutralización proteolítico es mayor a los 6 meses de almacenamiento, aunque dicha diferencia no es tan marcada en la forma de preservación INS. Además se observa, como ya se había mencionado en el gráfico 1, que el comportamiento es mejor para INS, seguido por INS_L y por último PROBIOL.

Figura-3: Box-Plot's de la variable Tiempo de Almacenamiento, discriminando por forma de preservación



En la Figura-4 se observa que a menor temperatura de almacenamiento parece haber un mayor porcentaje de neutralización proteolítico, aunque estas diferencias parecen no ser tan marcadas. Cabe notar que en el grupo de tiempo de almacenamiento 6, aunque los resultados muestran mayor porcentaje de neutralización que en los otros grupos, también es cierto que aumenta la variabilidad pues hay unas pocas muestras que presentan valores bajos de porcentaje de neutralización. Se vuelve a observar que hay mejor comportamiento de INS.

Figura 4: Box-Plot's de la variable Temperatura de Almacenamiento.

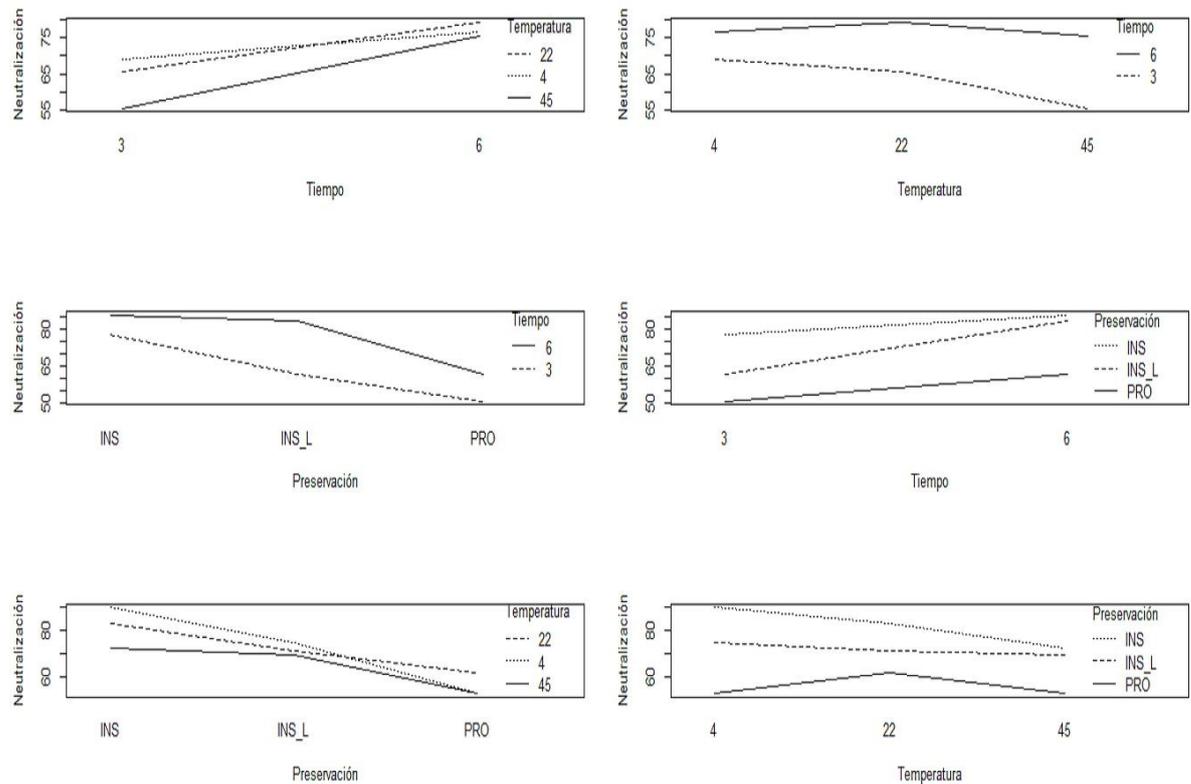


En la Figura-5 se observan los gráficos de interacción. En base a dichos gráficos, se observa que parece haber interacción entre todos los pares de variables. Lo anterior quiere decir que el efecto de una variable explicativa, dígase X_1 , sobre el porcentaje de neutralización proteolítico, depende de una posible segunda variable explicativa X_2 . Este

aspecto se verificó en el ajuste del modelo y se explica ampliamente en la interpretación de los resultados.

Figura-5: Gráficos de Interacciones dobles.

GRÁFICOS DE INTERACCIÓN



En conclusión, del análisis descriptivo, se observa que parece haber un mejor comportamiento de la forma de preservación INS, seguida por INS_L y PROBIOL. Además, se observó que a mayor tiempo parece haber mayor porcentaje de neutralización proteolítica. De la misma forma, a menor temperatura parece haber mayor porcentaje de neutralización proteolítica. También se observó que parecen haber interacciones entre las variables explicativas al momento de evaluar su efecto sobre el porcentaje de neutralización proteolítica.

3.1.2. Modelo Ajustado

Como se mencionó anteriormente, para el análisis de la variable potencial de neutralización proteolítica, se ajustó un modelo de regresión *Beta*. Luego de haber indagado por las interacciones de tipo triple y doble mediante la prueba de razón de

verosimilitudes y los estadísticos de *Wald*, y siguiendo el método *Backward* de selección de variables, se escogió el mejor modelo, el cual contiene interacciones entre las variables tiempo de almacenado y forma de preservación, y entre las variables tiempo de almacenado y temperatura de almacenado. Se presenta a continuación el modelo:

$$\begin{cases} y_k \sim \text{Beta}(\mu_k, \phi); k = 1, \dots, n \\ \log(\mu_k) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,k} + \beta_2 x_{2,k} + \beta_3 x_{3,k} + \beta_4 x_{4,k} + \beta_5 x_{5,k} + \beta_6 x_{6,k} + \beta_7 x_{7,k} + \beta_8 x_{8,k} + \beta_9 x_{9,k} \\ y_1, \dots, y_n \text{ independientes} \end{cases}$$

Donde y_k es el porcentaje de neutralización proteolítico de la k -ésima observación, $n = 135$, μ_k es la media de la variable y_k , la variable $X_{1,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación fue almacenada por 6 meses y 0 en caso contrario, la variable $X_{2,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación es de INS_L y 0 en caso contrario, la variable $X_{3,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación es de PROBIOL y 0 en caso contrario, la variable $X_{4,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó a 22°C y 0 en caso contrario, la variable $X_{5,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó a 45°C y 0 en caso contrario, la variable $X_{6,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó durante 6 meses y es de INS_L y 0 en caso contrario, la variable $X_{7,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó durante 6 meses y es de PROBIOL y 0 en caso contrario, la variable $X_{8,k}$ toma el valor 1 si la k ésima observación se almacenó durante 6 meses a temperatura 22°C y 0 en caso contrario, y la variable $X_{9,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó durante 6 meses a temperatura 45°C y 0 en caso contrario.

Del ajuste se observa que las dos interacciones planteadas resultan ser altamente significativas, por ende, las variables tiempo de almacenado, temperatura de almacenado y forma de preservación, resultan ser significativas en el modelo. Esto nos indica que tanto el tiempo de almacenado, como la temperatura de almacenado y la forma de preservación, tienen efecto sobre el porcentaje de neutralización proteolítico, lo anterior sujetos a la verificación de los supuestos del modelo, la cual se lleva a cabo posteriormente.

<i>Beta</i>	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept) (β_0)	-0.13541	0.03	-4.18	0.00
Tiempo6 (β_1)	-0.01134	0.05	-0.25	0.80
PreservaciónINS_L (β_2)	-0.27377	0.05	-5.09	0.00
PreservaciónPRO (β_3)	-0.45056	0.06	-7.04	0.00
Temperatura22 (β_4)	-0.05664	0.05	-1.21	0.23
Temperatura45 (β_5)	-0.24317	0.06	-4.08	0.00
Tiempo6:PreservaciónINS_L (β_6)	0.26113	0.06	4.07	0.00
Tiempo6:PreservaciónPRO (β_7)	0.13561	0.08	1.61	0.11
Tiempo6:Temperatura22 (β_8)	0.03404	0.06	0.55	0.58
Tiempo6:Temperatura45 (β_9)	0.22248	0.07	3.10	0.00

Con respecto al parámetro de dispersión ϕ se obtuvo un ajuste, el cual resultó ser también altamente significativo.

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(phi)	10.67	1.27	8.41	0.00

Para el ajuste se obtuvo un pseudo- R^2 de 0,86, un AIC de -175.9654 y una *log-verosimilitud* de 98,98. Los resultados anteriores fueron obtenidos mediante el uso del paquete betareg (204) del software R.

3.1.3. Verificación de supuestos y análisis de influencia

Con el ánimo de poder dar una interpretación válida a los resultados del ajuste, es necesario realizar la verificación de los supuestos del modelo. Para esto se hizo uso de los gráficos de diagnóstico los cuales se presentan en la Figura-6. A partir de los gráficos se observa que no existen problemas de dependencia ni de heterocedasticidad. También se observa que el ajuste del modelo es bueno, pues todas las observaciones se encuentran dentro del gráfico de diagnóstico. Con respecto al análisis de influencia se tiene que las observaciones 91, 92 y 116 son posibles datos influyentes. Se procedió a analizar dichas observaciones, encontrando que ninguna combinación de estas genera un cambio significativo en el ajuste del modelo, por lo tanto se concluye que la significancia de las variables se debe a características del grupo de observaciones en general y no sólo a alguna observación en particular.

Teniendo en cuenta la verificación de los supuestos del modelo y el análisis de influencia, tiene sentido y validez la interpretación de los parámetros estimados en el mismo. Procedimiento que se realiza a continuación.

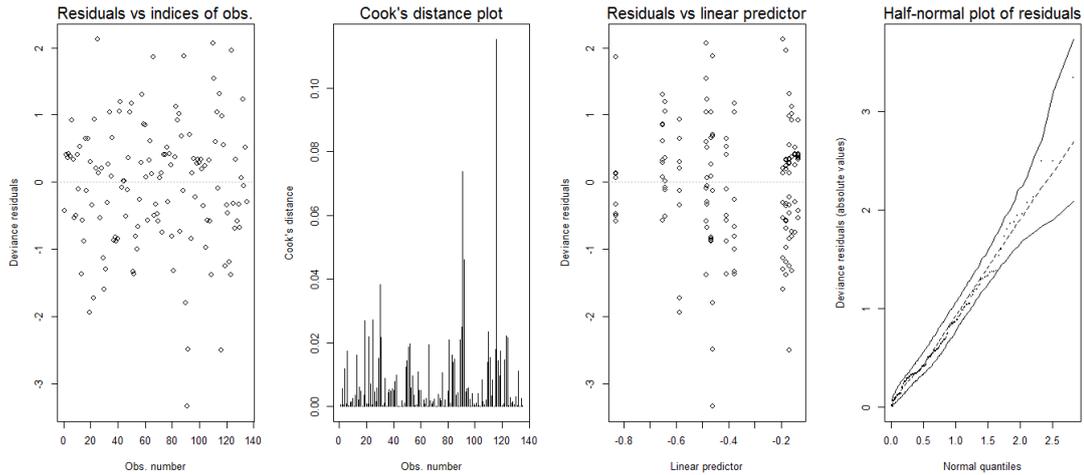


Figura-6: Gráficos de Diagnóstico.

3.1.4. Interpretación de resultados

Como se mencionó anteriormente y teniendo en cuenta la verificación del modelo, se concluye que existe efecto de las variables tiempo de almacenamiento, temperatura de almacenamiento y forma de preservación sobre el porcentaje de neutralización proteolítico. Estos efectos dependen de los valores que toman las otras variables, pues hay presencia de interacciones entre las variables tiempo de almacenamiento y forma de preservación, y entre las variables tiempo de almacenamiento y temperatura de almacenamiento. Lo anterior quiere decir que el efecto del tiempo de almacenamiento depende tanto de la forma de preservación como de la temperatura de almacenamiento, que el efecto de la forma de preservación depende del tiempo de almacenamiento, y que el efecto de la temperatura de almacenamiento depende del tiempo de almacenamiento.

Los porcentajes de neutralización proteolítico promedio estimados por tratamiento son:

Tratamiento	Tiempo	Preservación	Temperatura	$\hat{\mu}_k$
1	3	INS	4	0.873356
2	6	INS	4	0.863510
3	3	INS_L	4	0.664195
4	6	INS_L	4	0.852663
5	3	PRO	4	0.556567
6	6	PRO	4	0.630214
7	3	INS	22	0.825262
8	6	INS	22	0.844207
9	3	INS_L	22	0.627619
10	6	INS_L	22	0.833602
11	3	PRO	22	0.525917
12	6	PRO	22	0.616126
13	3	INS	45	0.684832
14	6	INS	45	0.845831
15	3	INS_L	45	0.520820
16	6	INS_L	45	0.835205
17	3	PRO	45	0.436425
18	6	PRO	45	0.617311

A continuación se presenta una tabla con los respectivos contrastes para analizar el efecto de la forma de preservación sobre el porcentaje de neutralización proteolítico, en donde, por ejemplo el cociente de respuestas medias estimadas para el contraste INS Vs INS_L (Tiempo 3) es:

$$\frac{\text{Respuesta media estimada de INS (Tiempo 3)}}{\text{Respuesta media estimada de INS_L (Tiempo 3)}}$$

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
INS Vs INS_L (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_2) = \exp(0.27377)$	1.314909
INS Vs INS_L (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6) = \exp(0.27377 - 0.26113)$	1.012722
INS Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_3) = \exp(0.45056)$	1.569186
INS Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_3 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.45056 - 0.13561)$	1.370185
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3) = \exp(-0.27377 + 0.45056)$	1.193379
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_6 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.3023039)$	1.352972

Con resultado se observa que la mejor forma de preservación es INS, ya que con respecto a INS_L tiene un porcentaje de neutralización proteolítico promedio estimado 31 % mayor cuando el tiempo de almacenamiento es de 3 meses; para tiempo de almacenamiento de 6 meses la diferencia entre INS e INS_L es tan solo del 1,2 %. Si se compara INS y PROBIOL, las diferencias en el porcentaje de neutralización proteolítico promedio estimado se incrementan, pues para los tres meses dicha diferencia es del 56,9 % y para los 6 meses es del 37 %. Por otra parte, entre INS_L y PROBIOL, es mejor el comportamiento de INS_L pues este tiene un porcentaje de neutralización proteolítico promedio estimado 19,3 % mayor en el tiempo 3 y 35,3 % mayor en el tiempo 6.

La siguiente tabla contiene los respectivos contrastes para analizar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el porcentaje de neutralización proteolítica.

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
INS Vs INS_L (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_2) = \exp(0.27377)$	1.314909
INS Vs INS_L (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6) = \exp(0.27377 - 0.26113)$	1.012722
INS Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_3) = \exp(0.45056)$	1.569186
INS Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_3 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.45056 - 0.13561)$	1.370185
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3) = \exp(-0.27377 + 0.45056)$	1.193379
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_6 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.3023039)$	1.352972

De la anterior tabla se observa que a menor temperatura de almacenamiento se tiene un mayor porcentaje de neutralización proteolítica promedio estimado. En general, cuando se está en un tiempo de almacenamiento de 6 meses las diferencias no son tan marcadas, a tal punto que podrían considerarse casi iguales pues la diferencia máxima es de tan solo 2,3 %. En el tiempo de almacenamiento 3, las diferencias entre los porcentajes de neutralización proteolítica promedio estimados si son bastante marcadas y oscilan desde el 5,8 % hasta el 27,5 %.

Por último se presenta la tabla que contiene los respectivos contrastes para analizar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el porcentaje de neutralización proteolítica.

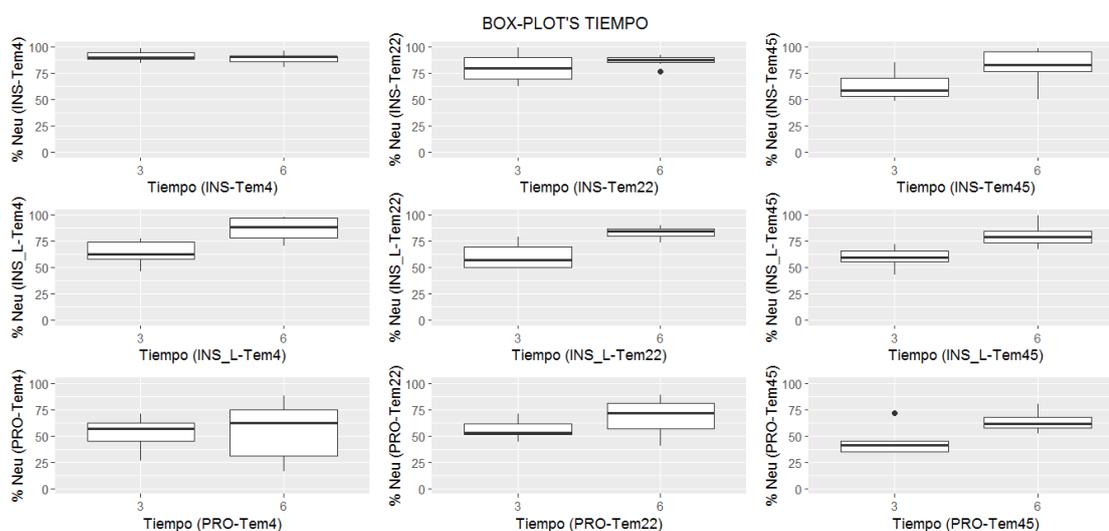
Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
INS Vs INS_L (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_2) = \exp(0.27377)$	1.314909
INS Vs INS_L (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6) = \exp(0.27377 - 0.26113)$	1.012722
INS Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(-\hat{\beta}_3) = \exp(0.45056)$	1.569186
INS Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(-\hat{\beta}_3 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.45056 - 0.13561)$	1.370185
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 3)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3) = \exp(-0.27377 + 0.45056)$	1.193379
INS_L Vs PROBIOL (tiempo 6)	$\exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_6 - \hat{\beta}_7) = \exp(0.3023039)$	1.352972

De los resultados anteriores se concluye que en general, a mayor tiempo de almacenado se tiene un mayor porcentaje de neutralización proteolítica promedio estimado. En el caso específico de INS para temperaturas 4 y 22, se observa que las diferencias no son grandes, es decir, se puede considerar que el efecto del tiempo de almacenado es el mismo en estos grupos, mientras que en INS a temperatura 45 si se genera una diferencia considerable del 19,1 %, es decir que el porcentaje de neutralización promedio a los 3 meses es un 19,1 % menor que a los 6 meses. Las diferencias entre el porcentaje de neutralización proteolítica promedio estimado son mucho más grandes en el grupo de INS_L, éstas oscilan entre el 37,7 % y el 22,1 %. En

el caso de PROBIOL las diferencias entre el porcentaje de neutralización proteolítico promedio estimado son menores que en el caso de INS_L y oscilan entre el 29.3% y el 11.6%, aunque su comportamiento como ya se había mencionado antes, es el más bajo de las tres formas de preservación.

Con el fin de tener una ayuda visual de lo que se interpretó en la tabla anterior, se presenta en la Figura-7 los gráficos de Box-Plot para la variable tiempo fue discriminando por forma de preservación y por temperatura de almacenamiento.

Figura-7: Box-Plot's Tiempo discriminando Preservación y Temperatura.



3.2. Potencial de neutralización coagulante

3.2.1. Análisis descriptivo

Esta variable cuenta con un total de 72 observaciones, las cuales se encuentran distribuidas de la siguiente forma dentro de las variables explicativas.

	3 meses			6 meses		
Temperatura	4	22	45	4	22	45
INS	6	6	6	3	3	3
INS_L	3	3	3	3	3	3
PRO	6	6	6	3	3	3

A continuación se presentan los gráficos Box-Plot para cada variable explicativa, los cuales se encuentran discriminados por las demás variables.

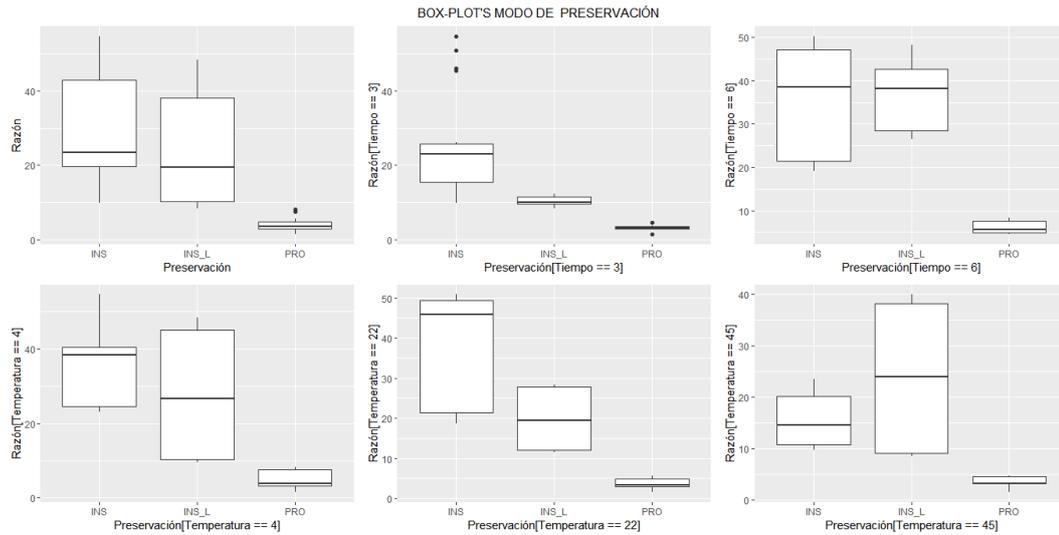


Figura-8: Box-Plot's de la variable Forma de Preservación.

En la Figura-8 se observa que la variable respuesta Razón presenta valores altos y variables para el modo de preservación INS e INS_L, a diferencia de lo sucedido con Probiol cuya razón de neutralización coagulante es bastante baja y poco variable. Al discriminar la razón de neutralización coagulante por el tiempo de almacenamiento se puede ver que para tres meses la mediana de la forma de preservación INS presenta la mayor razón de neutralización coagulante con algunas observaciones con razón de neutralización coagulante muy alta, seguida por INS_L, la cual presenta poca variación, PROBIOL presenta la menor razón de neutralización coagulante y muy poca variabilidad; para seis meses se observa que la mediana de la razón de neutralización coagulante tanto para INS como INS_L son altas y muy cercanas, con la diferencia en que los datos para INS son más variables que los de INS_L, PROBIOL presenta una razón de neutralización coagulante muy baja y con poca variabilidad en diferencia a las otras formas de preservación.

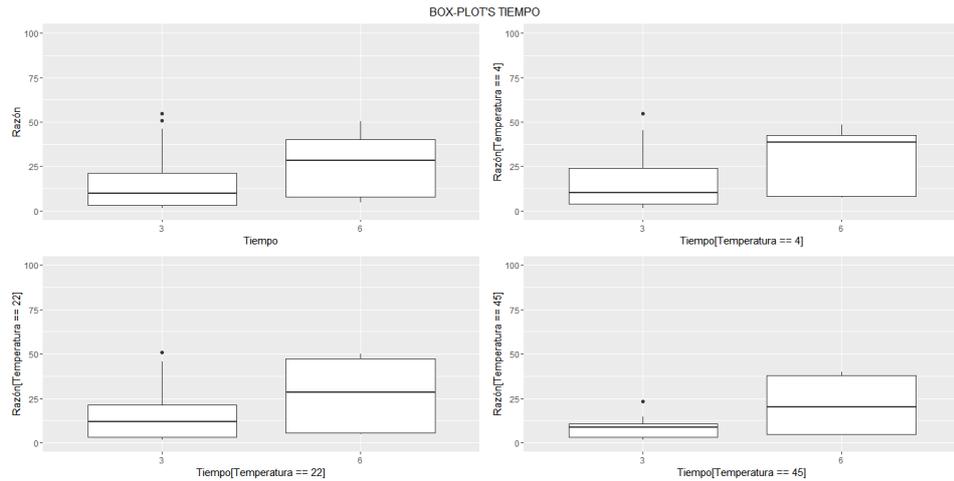
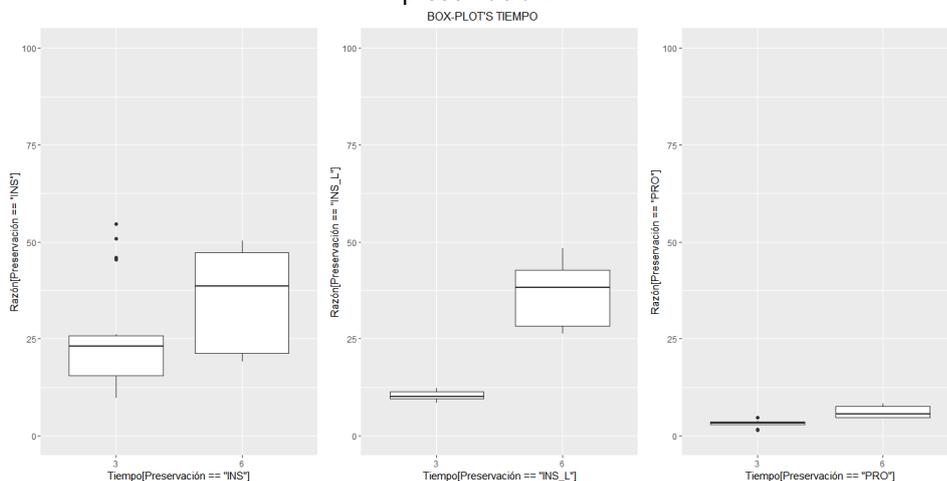


Figura 9: Box-Plot's de la variable Tiempo.

Al observar el comportamiento del porcentaje de neutralización discriminando por la variable temperatura, se puede ver que para las formas de preservación INS e INS_L se sigue conservando la jerarquía anteriormente observada en la razón de neutralización coagulante donde INS presenta una razón mediana de neutralización coagulante mayor, seguido de INS_L y por último PROBIOL, con la diferencia que esto no sucede para la temperatura de conservación de 45 grados centígrados, en donde la mediana de la forma de preservación INS_L es mayor que la encontrada en INS; PROBIOL sigue teniendo poca variabilidad y presenta en general la menor razón de neutralización coagulante.

En la Figura-9 se observa que para la variable respuesta por tiempo de almacenamiento la mediana para tres meses es menor que para seis meses con algunas observaciones con valores muy elevados en la razón de neutralización coagulante, la variabilidad en seis meses es mayor que en tres, el anterior comportamiento se mantiene al discriminar las observaciones por las diferentes temperaturas.

Figura 10: Box-Plot's de la variable Tiempo de Almacenamiento, discriminando por forma de preservación.



En la Figura-10 se considera el tiempo de almacenamiento discriminado por la forma de preservación en donde para INS la mediana es menor para un tiempo de tres meses que para seis meses, aunque también presenta algunas observaciones con valores elevados para la razón de neutralización coagulante, el comportamiento a seis meses presenta en su mayoría valores para razón de neutralización coagulante mayores que en tres meses. Para INS_L se observa una razón mediana de neutralización coagulante mucho menor para una temporalidad de tres meses que para una de seis, a los tres meses se presenta poca variabilidad. PROBIOL presenta la particularidad de tener poca variación tanto para tres meses como para seis meses, en general PROBIOL presenta los valores más bajos para la razón de neutralización coagulante.

En la figura-11 se observa como la razón mediana de neutralización coagulante disminuye a medida que la temperatura de conservación aumenta, también se observa una disminución en la variación de las observaciones por el mismo hecho. Al realizar una discriminación por tiempo se puede ver que a dos temperaturas 4 y 12 existen similitudes, pero a temperatura 45 la variabilidad es menor esto para un tiempo de preservación de tres meses, en general las medianas a las tres temperaturas no distan mucho; para el caso de seis meses se puede observar una alta variabilidad en la razón de neutralización coagulante con razón mediana de neutralización coagulante decreciente a medida que la temperatura aumenta.

Al realizar la discriminación por forma de preservación se observa que para INS a 4 y 24 grados centígrados se consiguen valores altos para las observaciones en la razón de neutralización coagulante con una gran variabilidad, a diferencia de lo que sucede a temperatura 45 en donde la razón de neutralización coagulante es mucho menor y presenta una variabilidad menor; para el caso de INS_L se observa la particularidad que a temperatura 22 obtuvo menor variabilidad y un valor para la razón mediana de neutralización coagulante menor, a temperatura 4 y 45 se observan comportamientos similares; PROBIOL presenta mayor variabilidad a temperatura 4, la razón mediana de neutralización coagulante es similar en todas las temperaturas de estudio.

En la Figura-12 se observan los gráficos de interacción. En base a dichos gráficos, se puede entender una interacción entre la mayoría de pares de variables a excepción de las variables tiempo y temperatura. Lo anterior quiere decir que el efecto de una variable explicativa, dígase X_1 , sobre la razón de neutralización coagulante, depende de una posible segunda variable explicativa X_2 . Este aspecto se analizará en el ajuste del modelo y se explicará ampliamente en la interpretación de los resultados.

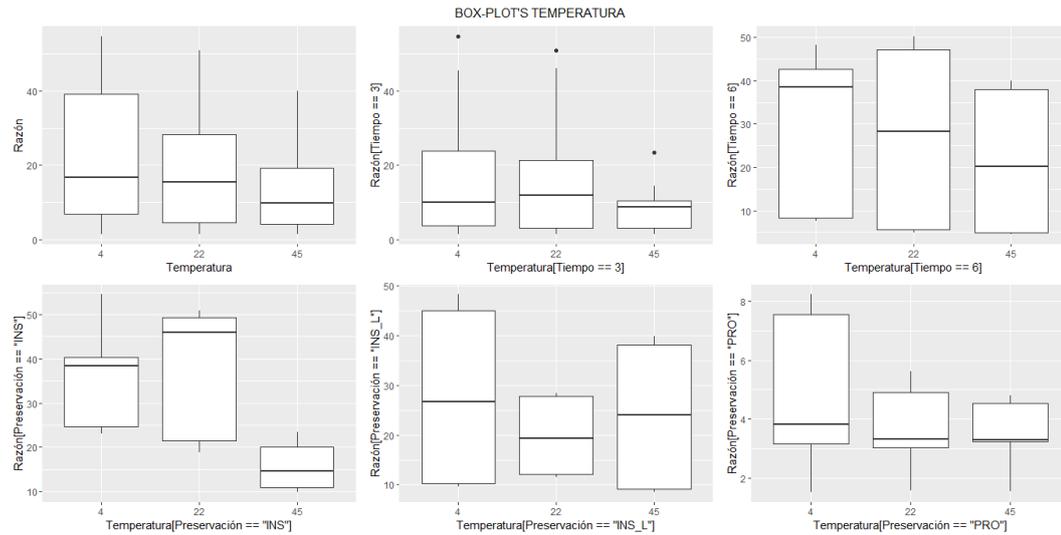


Figura-11: Box-Plot's de la variable Temperatura.

3.2.2. Modelo Ajustado

Para el análisis de la variable potencial de neutralización coagulante, se ajustó un modelo lineal generalizado con respuesta γ , esto se decidió debido a que la variable respuesta es continua y toma solo valores positivos. Luego de haber indagado por las interacciones de tipo triple y doble mediante la prueba de razón de verosimilitudes y los estadísticos de *Wald*, y siguiendo el método *Backward* de selección de variables, se escogió el mejor modelo, el cual contiene interacciones entre las variables tiempo de almacenamiento y forma de preservación, y entre las variables temperatura de almacenamiento y forma de preservación. A continuación se presenta el modelo:

$$\begin{cases} y_k \sim \text{Gamma}(\mu_k, \phi); k = 1, \dots, n \\ \log(\mu_k) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,k} + \beta_2 x_{2,k} + \beta_3 x_{3,k} + \beta_4 x_{4,k} + \beta_5 x_{5,k} + \beta_6 x_{6,k} + \beta_7 x_{7,k} + \beta_8 x_{8,k} + \beta_9 x_{9,k} \\ \quad + \beta_{10} x_{10,k} + \beta_{11} x_{11,k} \\ y_1, \dots, y_n \text{ independientes} \end{cases}$$

Donde y_k es el razón de neutralización coagulante, μ_k es la media de la variable y_k , la variable $X_{1,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación es de INS_L y 0 en caso contrario, la variable $X_{2,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación es de PROBIOL y 0 en caso contrario, la variable $X_{3,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación fue almacenada a seis meses y 0 en caso contrario, la variable $X_{4,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó a 22°C y 0 en caso contrario, la variable $X_{5,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó a 45°C y 0 en caso contrario, la variable $X_{6,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación se almacenó durante 6 meses y es de INS_L y 0 en caso contrario, la variable $X_{7,k}$ toma el valor 1 si la k ésima observación se

almacenó durante 6 meses y es de PROBIOL y 0 en caso contrario, la variable $X_{8,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación corresponde a INS_L que se almacenó a temperatura 22°C y 0 en caso contrario, la variable $X_{9,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación corresponde a PROBIOL que se almacenó a temperatura 22°C y 0 en caso contrario, la variable $X_{10,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación corresponde a INS_L que se almacenó a temperatura 45°C y 0 en caso contrario, la variable $X_{11,k}$ toma el valor 1 si la k -ésima observación corresponde a PROBIOL que se almacenó a temperatura 45°C y 0 en caso contrario.

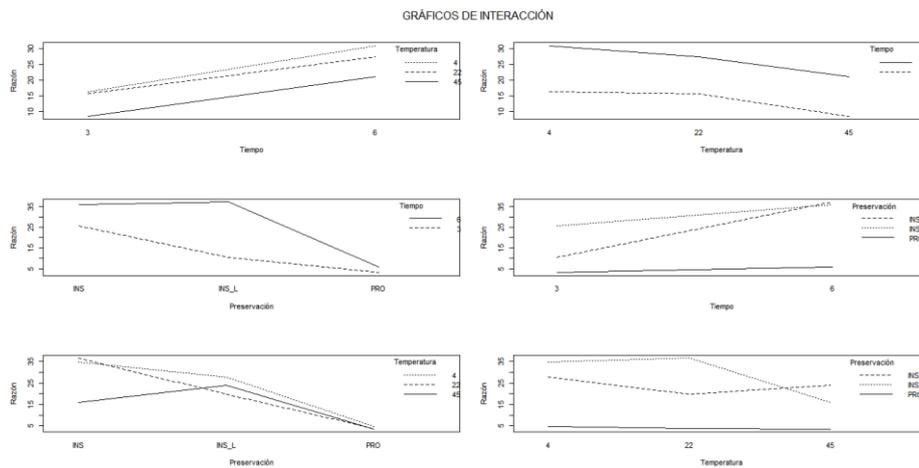


Figura 12: Gráficos de Interacciones dobles.

El ajuste se realizó con el software estadístico R. Se obtuvo el siguiente ajuste:

<i>Beta</i>	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept) (β_0)	3.4372	0.0987	34.82	0.00
PreservaciónINS_L (β_1)	-0.9976	0.1626	-6.13	7.34e-08
PreservaciónPRO (β_2)	-2.1708	0.1396	-15.55	0.00
Tiempo6 (β_3)	0.3445	0.1119	3.08	0.00315
Temperatura22 (β_4)	0.0238	0.1293	0.18	0.85452
Temperatura45 (β_5)	-0.7967	0.1293	-6.16	6.54e-08
PreservaciónINS_L:Tiempo6 (β_6)	0.9226	0.1700	5.40	1.22e-06
PreservaciónPRO:Tiempo6 (β_7)	0.3098	0.1583	1.96	0.05501
PreservaciónINS_L:Temperatura22 (β_8)	-0.1743	0.2044	-0.85	0.39724
PreservaciónPRO:Temperatura22 (β_9)	-0.2314	0.1828	-1.27	0.21053
PreservaciónINS_:Temperatura45 (β_{10})	0.6595	0.2045	3.07	0.00325
PreservaciónPRO:Temperatura45 (β_{11})	0.5605	0.1828	3.10	0.00

Del ajuste se observa que las dos interacciones planteadas resultan ser altamente significativas, por ende, las variables tiempo de almacenamiento, temperatura de almacenado y Forma de Preservación, deben conservarse en el modelo. Lo anterior indica que tanto el tiempo de almacenamiento, como la temperatura de almacenamiento

y la forma de preservación, tienen efecto sobre la razón de neutralización coagulante, lo anterior sujetos a la verificación de los supuestos del modelo, la cual se lleva a cabo posteriormente.

3.2.3. Verificación de supuestos y análisis de influencia

Con el fin de poder dar una interpretación válida a los resultados del ajuste, es necesario realizar la verificación de supuestos del modelo. Para esto se hizo uso de los gráficos de diagnóstico los cuales se presentan en la Figura-13. A partir de los gráficos se observa que el ajuste del modelo es bueno pues todas las observaciones se encuentran dentro del gráfico envelope. Respecto al análisis de influencia se tiene que las observaciones 5, 10, 17 y 51 son posibles datos influyentes. Se procedió a analizar dichas observaciones, encontrando que casi ninguna combinación de estas genera un cambio significativo en el ajuste del modelo, a excepción de retirar todas estas observaciones que tiene por efecto la duplicación del coeficiente asociado a la interacción *Preservación PRO: Tiempo6*, por lo tanto se concluye que la significancia de las variables se debe a características del grupo de observaciones en general y no sólo a alguna observación en particular.

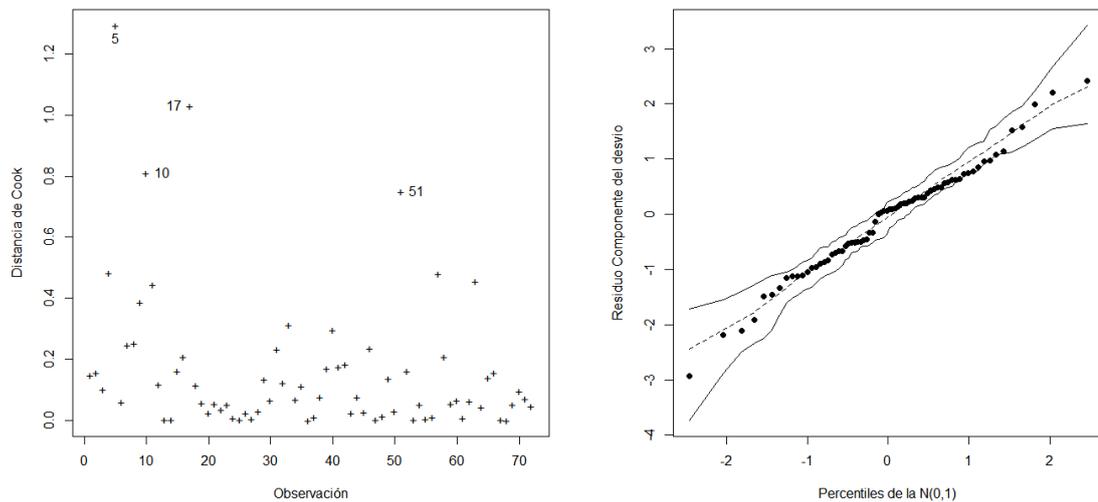


Figura-13: Gráficos de Diagnóstico.

Teniendo en cuenta la verificación de los supuestos del modelo y el análisis de influencia, tiene sentido y validez la interpretación de los parámetros estimados en el mismo. Procedimiento que se realiza a continuación.

3.2.4. Interpretación de resultados

Como se mencionó anteriormente y teniendo en cuenta la verificación del modelo, se concluye que existe efecto de las variables tiempo de almacenamiento, temperatura de almacenamiento y forma de preservación sobre la razón de neutralización coagulante. Estos efectos dependen de los valores que toman las otras variables debido a la presencia de interacciones entre las variables forma de preservación y tiempo de almacenamiento, y las variables forma de preservación y temperatura de almacenamiento. Lo anterior quiere decir que el efecto de la forma de preservación depende tanto del tiempo de almacenamiento como de la temperatura de almacenamiento; que el efecto del tiempo de almacenamiento depende de la forma de preservación, y que el efecto de la temperatura de almacenamiento depende de la forma de preservación.

La razón promedio esperada de neutralización coagulante estimada por tratamiento es:

Tratamiento	Tiempo	Preservación	Temperatura	$\hat{\mu}_k$
1	3	INS	4	31.1004
2	6	INS	4	22.0378
3	3	INS_L	4	11.4687
4	6	INS_L	4	16.1849
5	3	PRO	4	3.5483
6	6	PRO	4	5.0075
7	3	INS	22	31.8495
8	6	INS	22	44.9468
9	3	INS_L	22	9.8667
10	6	INS_L	22	35.0288
11	3	PRO	22	2.8154
12	6	PRO	22	1.6894
13	3	INS	45	14.0208
14	6	INS	45	19.7865
15	3	INS_L	45	9.9982
16	6	INS_L	45	35.4560
17	3	PRO	45	2.8018
18	6	PRO	45	5.3899

A continuación se presenta una tabla con los respectivos contrastes para analizar el efecto de la forma de preservación sobre la razón de neutralización coagulante, en donde, por ejemplo el cociente de respuestas medias estimadas para el contraste INS vs. INS_L (Ti 3 - Tem 4) es:

$$\frac{\text{Respuesta media estimada de INS_L}(Ti\ 3 - Tem\ 4)}{\text{Respuesta media estimada de INS}(Ti\ 3 - Tem\ 4)}$$

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
INS Vs INS_L (Ti 3 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_1) = exp(-0.99760)$	0.3688
INS Vs INS_L (Ti 3 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_8) = exp(-0.99760 - 0.17426)$	0.3098
INS Vs INS_L (Ti 3 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_{10}) = exp(-0.99760 + 0.65947)$	0.7131
INS Vs INS_L (Ti 6 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_8) = exp(-0.99750 + 0.92255)$	0.9378
INS Vs INS_L (Ti 6 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_6) = exp(0.24931)$	0.7793
INS Vs INS_L (Ti 6 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_{10}) = exp(0.58442)$	1.7940
INS Vs PRO (Ti 3 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_2) = exp(-2.17075)$	0.1141
INS Vs PRO (Ti 3 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_9) = exp(-2.17075 - 0.023135)$	0.0905
INS Vs PRO (Ti 3 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_{11}) = exp(-2.17075 + 0.56049)$	0.1998
INS Vs PRO (Ti 6 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_7) = exp(-2.17075 + 0.30979)$	0.1555
INS Vs PRO (Ti 6 - Tem 22)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_7 + \hat{\beta}_9) = exp(-2.09231)$	0.1234
INS Vs PRO (Ti 6 - Tem 45)	$exp(\hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_7 + \hat{\beta}_{11}) = exp(-1.30047)$	0.2724
INS_L Vs PRO (Ti 3 - Tem 4)	$exp(\hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_1) = exp(-2.17075 + 0.99760)$	0.3095
INS_L Vs PRO (Ti 3 - Tem 22)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_8 + \hat{\beta}_9) = exp(-0.76754)$	0.4642
INS_L Vs PRO (Ti 3 - Tem 45)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_{10} + \hat{\beta}_{11}) = exp(-1.27213)$	0.2802
INS_L Vs PRO (Ti 6 - Tem 4)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_7) = exp(-1.23213)$	0.1676
INS_L Vs PRO (Ti 6 - Tem 22)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_7 - \hat{\beta}_8 + \hat{\beta}_9) = exp(-1.843)$	0.1583
INS_L Vs PRO (Ti 6 - Tem 45)	$exp(-\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 - \hat{\beta}_6 + \hat{\beta}_7 - \hat{\beta}_{10} + \hat{\beta}_{11}) = exp(-1.88489)$	0.1519

Como resultado se observa que la mejor forma de preservación es INS, ya que INS_L tiene razones de neutralización coagulante promedio estimada 63.12%, 69.02% y 28.69%, menores que los presentados por INS cuando el tiempo de almacenamiento es de 3 meses y a temperaturas 4, 24 y 45 respectivamente; para tiempo de almacenamiento de 6 meses la diferencia entre INS_L e INS es tan solo 6.22% menor que el de INS almacenado a 6 meses y temperatura 4, un comportamiento similar se consigue a temperatura 22 ya que se espera que esta sea 22.07% menor, para el contraste entre INS e INS_L a 6 meses y temperatura 45 se observa un aumento de 79.40% en lo referente a INS_L.

Comparando INS y PROBIOL, las diferencias en la razón de neutralización coagulante promedio estimada se incrementan, ya que para 3 meses dicha diferencias son de 88,59%, 90,95% y 80,02% menores a las presentadas por INS almacenado a 3 meses a temperatura 4, 22 y 45 respectivamente; para el tiempo de almacenamiento de 6 meses se observan razones de neutralización coagulante de 84,45%, 87,66% y 72,76% menores, a temperatura 4, 22 y 45°C, respectivamente, en diferencia a las presentadas por INS bajo estas mismas condiciones.

Por otra parte, entre INS_L y PROBIOL, es mejor el comportamiento de INS_L, dado que se observaron razones de neutralización coagulante promedio estimadas para PROBIOL de 69,05%, 53,58% y 71,98% menores a las presentadas por INS_L en el tiempo de almacenamiento de 3 meses para temperaturas 4, 22 y 45°C, respectivamente, esto en comparación con INS_L bajo las mismas condiciones, por último se analizan las razones de neutralización coagulante promedio estimadas para el

caso de almacenamiento de 6 meses con diferencias de 83,24 %, 84,17 % y 84,81 % menores a las encontradas bajo las mismas condiciones en INS_L.

La siguiente tabla contiene los respectivos contrastes para analizar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la razón de neutralización coagulante para cada una de las formas de preservación.

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
Tem 4 Vs Tem 22 (INS)	$\exp(\hat{\beta}_4) = \exp(0.0238)$	1.0241
Tem 4 Vs Tem 22 (INS_L)	$\exp(\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_8) = \exp(0.0238 - 0.17426)$	0.8603
Tem 4 Vs Tem 22 (PROB)	$\exp(\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_9) = \exp(0.0238 - 0.23135)$	0.8126
Tem 4 Vs Tem 45 (INS)	$\exp(\hat{\beta}_5) = \exp(-0.79668)$	0.4508
Tem 4 Vs Tem 45 (INS_L)	$\exp(\hat{\beta}_5 + \hat{\beta}_{10}) = \exp(-0.79668 + 0.65947)$	0.8716
Tem 4 Vs Tem 45 (PROB)	$\exp(\hat{\beta}_5 + \hat{\beta}_9) = \exp(-0.79668 + 0.56049)$	0.7895
Tem 22 Vs Tem 45 (INS)	$\exp(\hat{\beta}_5 - \hat{\beta}_4) = \exp(-0.79668 - 0.0238)$	0.4402
Tem 22 Vs Tem 45 (INS_L)	$\exp(-\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_5 - \hat{\beta}_8 + \hat{\beta}_{10}) = \exp(0.01325)$	1.0133
Tem 22 Vs Tem 45 (PROB)	$\exp(-\hat{\beta}_4 + \hat{\beta}_5 - \hat{\beta}_9 + \hat{\beta}_{11}) = \exp(-0.001921216)$	0.9718

De la anterior tabla se observa que, a menor temperatura de almacenamiento se tiene una mayor razón de neutralización coagulante promedio estimada. Particularmente, para el modo de preservación INS a temperatura 22 se consiguió una razón de neutralización coagulante promedio estimada de 2.41 % más que lo obtenido en temperatura 4. En el caso de INS_L y PROBIOL se obtienen razones de neutralización coagulante promedio estimada de 13.97 % y 18.74 % respectivamente menores que a temperatura 4. Para las comparaciones referentes a temperaturas 4 y 45 se observa una razón de neutralización coagulante promedio estimada para INS, INS_L y PROBIOL de 54.92 %, 12.84 % y 21.05 % respectivamente menores a las observadas a temperatura 4. Para el último conjunto de comparaciones, las cuales hacen referencia temperaturas 22 y 45, para las formas de preservación se observa que para INS a temperatura 45 se espera una razón de neutralización coagulante promedio estimada de un 65.98 % menos que a temperatura 22, para la forma de preservación INS_L se obtiene una razón de neutralización coagulante promedio estimada 1.33 % mayor que la observada a temperatura 22, para el caso de PROBIOL se obtuvo una razón de neutralización coagulante promedio estimada 2.82 % menor que la presentada por este a temperatura 22.

Por último se presenta la tabla que contiene los contrastes respectivos para el análisis del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la razón de neutralización coagulante para cada forma de preservación.

Contraste	Cociente de Respuestas Medias Estimadas	Resultado
Tiempo 3 Vs Tiempo 6 (INS)	$exp(\hat{\beta}_3) = exp(0.34446)$	1.4112
Tiempo 3 Vs Tiempo 6 (INS_L)	$exp(\hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_6) = exp(0.34446 + 0.92255)$	3.5502
Tiempo 3 Vs Tiempo 6 (PROBIOL)	$exp(\hat{\beta}_3 + \hat{\beta}_7) = exp(0.34446 + 0.39979)$	1.9237

De los resultados anteriores se concluye que, en general a tiempo 6 se obtiene una razón de neutralización coagulante promedio estimada mayor que a tiempo 3, para el caso de INS se está obteniendo un 41,12% a diferencia del tiempo 3, lo mismo sucede en la forma de preservación INS_L en la cual la razón de neutralización coagulante promedio estimada está aumentando 3,5 veces, finalmente, PROBIOL a tiempo 6 está teniendo un aumento de 92,37% en contraste con lo observado en tiempo 3, resultados que concuerdan con lo descrito en la sección descriptiva presentada antes.

3.3. Potencial de neutralización hemolítico indirecto

Como se mencionó inicialmente, el análisis del porcentaje de neutralización hemolítico se realizó en base a análisis netamente descriptivos debido a la falta de variabilidad en los resultados.

3.3.1. Análisis Descriptivo

Para esta variable se tienen 102 observaciones, las cuales se encuentran distribuidas de la siguiente forma dentro de las variables explicativas.

	3 meses			6 meses		
Temperatura	4	22	45	4	22	45
INS	6	4	6	6	6	6
INS_L	6	4	6	6	6	6
PRO	6	4	6	6	6	6

En las Figuras 14, 15, 16 y 17 se presentan los gráficos Box-Plot por cada variable explicativa discriminando por el resto de variables. Como se observa en la Figura 14, la forma de preservación INS e INS_L en general siempre adquirieron un porcentaje de neutralización hemolítico de 100% exceptuando algunas observaciones que presentan valores bastante alejados del comportamiento general. En el grupo que tuvo un tiempo de almacenado de 3 meses parece haber algo de variabilidad en INS y INS_L. Por otra parte, se observa que la forma de preservación PROBIOL sí está generando variabilidad y en general tiene porcentajes de neutralización hemolítica muy inferiores a los de INS e INS_L, dichos porcentajes oscilan el 60%.

En la Figura 15 se observa que en general el porcentaje de neutralización hemolítico es mayor a los 6 meses de almacenamiento, además en este tiempo se presenta menor variabilidad. Es de anotar que en dicho tiempo de almacenamiento, la gran mayoría de observaciones alcanzaron un porcentaje de neutralización del 100 %. También se observa que el comportamiento parece ser el mismo a diferentes temperaturas.

En la Figura 16 se observa que a los 6 meses de almacenamiento tanto INS como INS_L alcanzaron un 100 % de neutralización hemolítico en todas sus observaciones; a los 3 meses de almacenamiento hubo observaciones de INS e INS_L que no alcanzaron el 100%. En la forma de preservación PROBIOL se observa que se alcanzan porcentajes de neutralización muy inferiores a los de INS e INS_L, dichos porcentajes oscilan el 55 % con valores PRO mayores para el tiempo de almacenamiento de 6 meses.

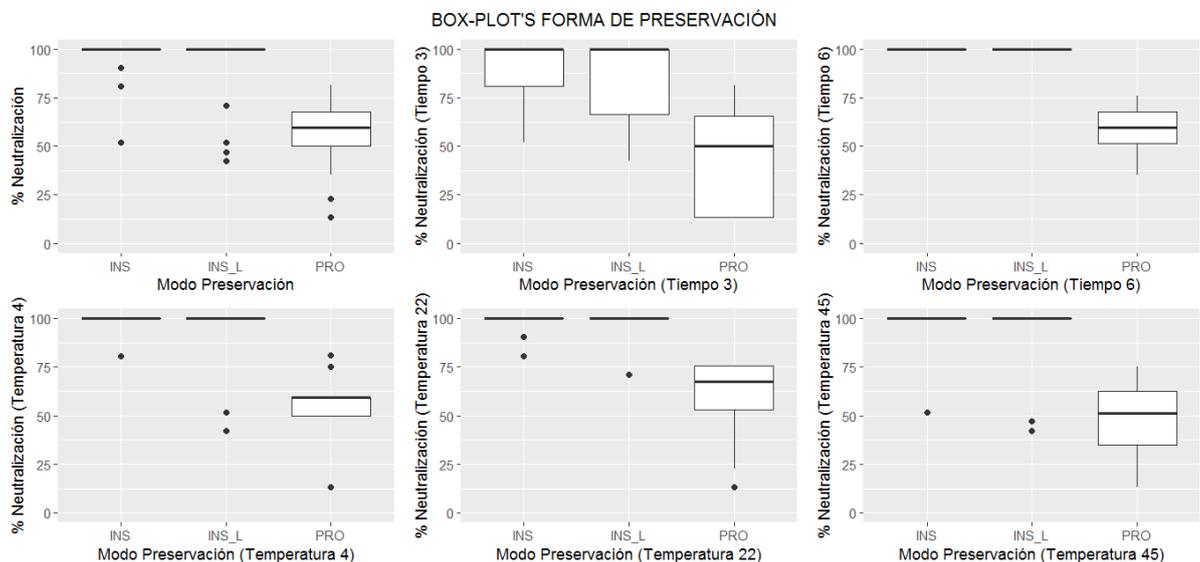


Figura-14: Box-Plot's de la variable Forma de Preservación.

En la Figura 17 se observa que no parece haber diferencias grandes en los porcentajes de neutralización hemolítica alcanzados a diferentes temperaturas, es decir, sin importar a que temperatura se almacene el antiveneno el comportamiento va a ser similar dentro de cada tiempo de almacenamiento y dentro de cada forma de preservación. También se observan las diferencias ya mencionadas a favor de 6 meses vs. 3 meses de almacenamiento y a favor de INS e INS_L vs. PROBIOL.

En la Figura 18 se observa que los porcentajes de neutralización hemolítica promedio son mayores para las observaciones almacenadas durante 6 meses sin importar la temperatura de almacenamiento ni la forma de preservación. Por otra parte se observa que las formas de preservación INS e INS_L presentan un mejor comportamiento que PROBIOL con porcentajes de neutralización hemolítico promedio al rededor del 95%, lo

anterior sin importar el tiempo de almacenamiento ni la temperatura. También se observa que la temperatura de almacenamiento no está afectando notablemente el porcentaje de neutralización hemolítico promedio, a excepción del grupo almacenado a un tiempo de 6 meses, donde sí parece haber diferencias con una predominancia de la temperatura 22°C, seguida por temperatura 4°C y por último la temperatura 45°C.

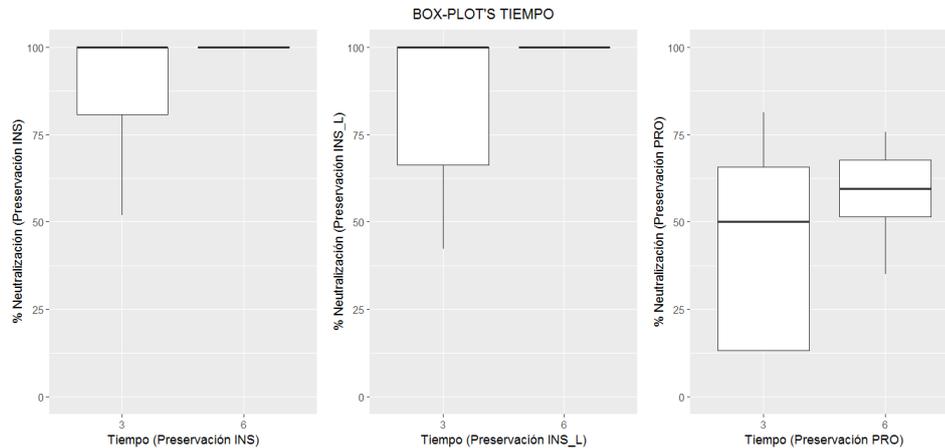


Figura 16: Box-Plot's de la variable Tiempo de Almacenamiento, discriminando por forma de preservación.

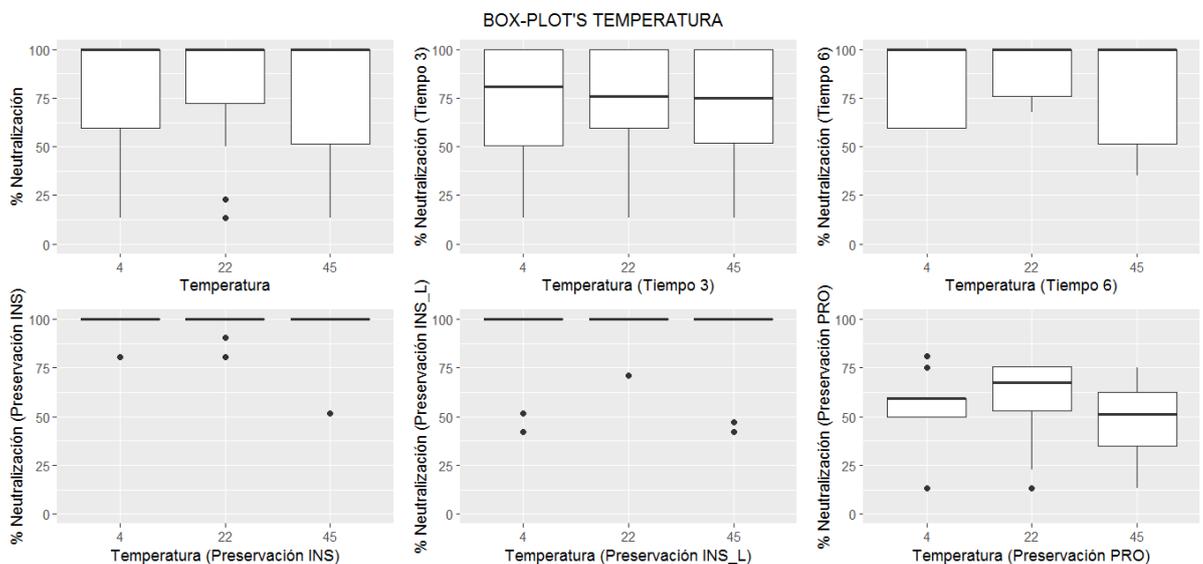


Figura 17: Box-Plot's de la variable Temperatura de Almacenamiento.

En conclusión, del análisis descriptivo, se observa que existe un mejor comportamiento de la forma de preservación INS e INS_L (por lo general del 100 % de neutralización). Además, se observó que a mayor tiempo de almacenamiento, mayor porcentaje de neutralización hemolítico. Por otra parte, la temperatura no está afectando de manera notable el porcentaje de neutralización hemolítico.

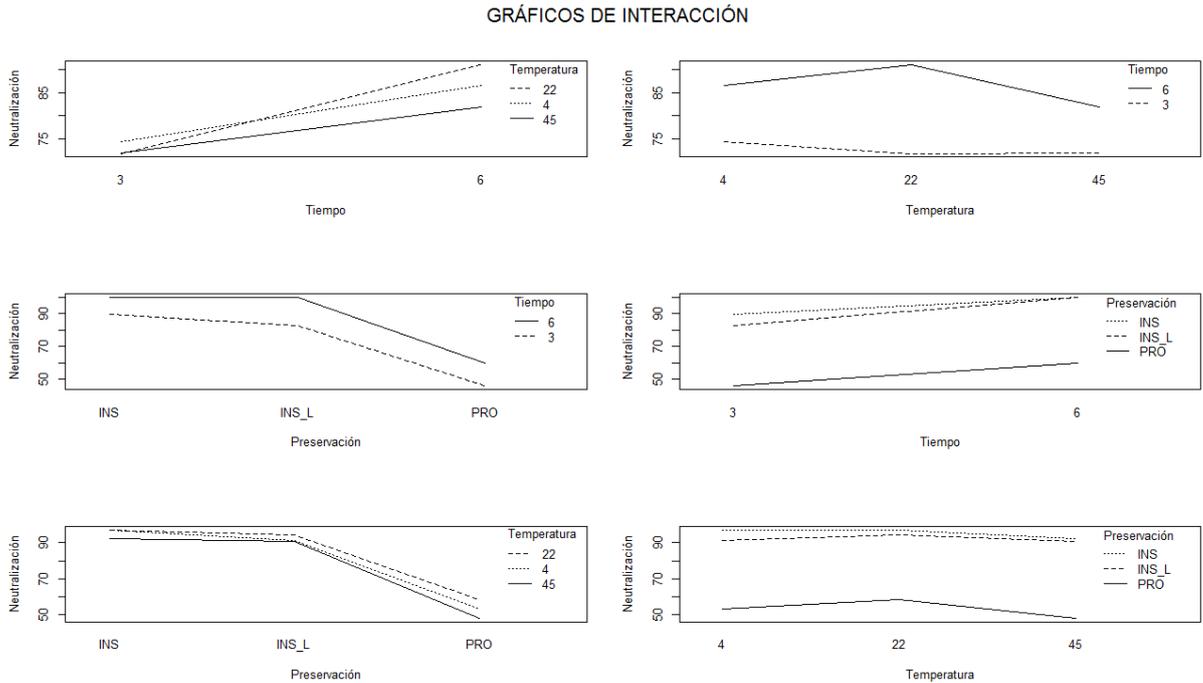


Figura 18: Gráficos de Interacciones dobles.

3.4. Títulos de anticuerpos

Como se explicó en la metodología, se realizará un Análisis de Varianza Múltiple con fines de describir el comportamiento del resultado completo de las pruebas E.L.I.S.A., las variables respuestas son los 9 títulos (ABS1024000, ABS512000, ABS256000, ABS128000, ABS64000, ABS32000, ABS16000, ABS8000, ABS4000), los factores son la temperatura y el tiempo, y el factor de bloqueo es el modo de preservación. Así, el modelo lineal para este caso es:

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + \beta_k + \epsilon_{ijkl}$$

Donde μ es la media general resultante de la aplicación de los tratamientos, a_i es el efecto aditivo del nivel i del factor a (Temperatura), b_j es el efecto aditivo del nivel j del factor b (Tiempo de Preservación), ab_{ij} es la interacción, parámetro que mide la desviación de la aditividad del efecto de los factores y $y_{ijkl} = (y_{ijkl1}, \dots, y_{ijklp})^t$ es la réplica multivariante de las variables observables, es decir, el nivel de absorbancia de los títulos.

Para la construcción de estos análisis, como se mencionó con anterioridad, se considerarán 9 variables respuestas correspondientes a los resultados de la prueba ELISA, un bloqueo por el tipo de preservación (INS, INS_L y Probiol), dos factores con

sus niveles, es decir, la temperatura a 4, 22 y 45°C y el tiempo a 3 y 6 meses. Se tienen en su totalidad 324 observaciones. 108 por cada bloque, y al interior de este 54 observaciones por cada tiempo de preservación y nuevamente al interior de este 2 réplicas por cada temperatura, es decir 18 observaciones. A continuación se presenta la distribución para una variable respuesta, la totalidad de los datos se ve reflejada al considerar nueve distribuciones como la que se muestra.

	TÍTULO A 4.000					
	3 meses			6 meses		
Temperatura	4	22	45	4	22	45
INS	2	2	2	2	2	2
INS_L	2	2	2	2	2	2
PRO	2	2	2	2	2	2

3.4.1. Análisis descriptivo

Como se puede evidenciar en la figura 19, los resultados de las pruebas E.L.I.S.A. por cada uno de los títulos en general presenta un comportamiento similar, aunque existen detalles para destacar. Por ejemplo, siempre existe un cambio importante en los resultados en los antivenenos que fueron preservados por 3 meses y a 22 grados centígrados sin importar el medio de preservación, este cambio es siempre hacia niveles de absorbancia mayor excepto por el título a 4000, que es el único caso que sus valores disminuyen, por esta misma razón puede mencionarse además que existe más variabilidad en los resultados de los antivenenos preservados a 3 meses, esto debido quizás a problemas de medición mencionados por la consultante. Adicionalmente, se puede mencionar que a niveles de títulos mayores los resultados de absorbancia son más similares entre si y más bajos a comparación de los niveles de absorbancia de los títulos más bajos, es decir, son más altas las absorbancias de los títulos más bajos.

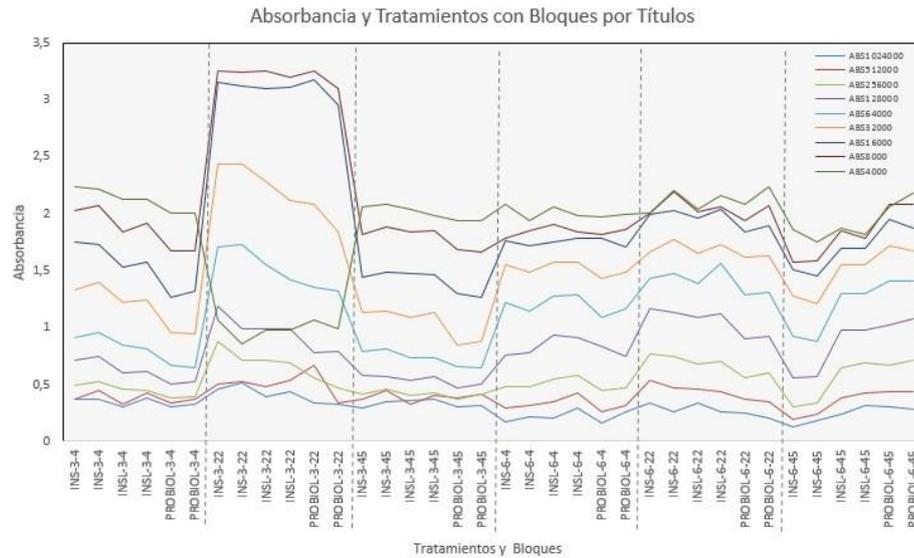


Figura 19: Absorbancias de los títulos por tratamientos

A continuación se llevará un pequeño análisis por cada uno de los bloques que se tuvieron en cuenta, es decir, los medios de preservación INS, INS_L y PROBIOL. En la figura-20, puede mencionarse un comportamiento específico de los resultados de niveles de absorbancia. A través de los títulos se evidencia que no existe una diferenciación marcada entre las temperaturas de 4 y 45°C, respectivamente, pero si para los 22°C, en este sentido se muestran mayores niveles de absorbancia para los antivenenos con tres meses de preservación en los títulos de 16.000 y 8.000 principalmente. En cuanto a comportamiento por temperaturas, siempre son mayores los niveles de absorbancia para 22°C, seguidos de los preservados a 4°C y por último a 45°C, sin importar el título estudiado. Además, también es importante mencionar que se presenta una diferenciación entre los niveles de absorbancia por temperatura a los 6 meses de preservación casi sin solapamientos. Por último, para el título en 4.000 es notable que el único tratamiento que arroja comportamiento anómalo con respecto al resto, es aquel realizado a los 3 meses de preservación y a 22°C, pues presenta niveles de absorbancia menores a comparación del restante.

Debido a que estas mediciones son a base de los antivenenos INS sometidos a un proceso de liofilizado se presentan algunos comentarios similares a los obtenidos de INS de la siguiente forma; se puede detectar una clara diferencia en sus respuestas de la prueba de E.L.I.S.A. por cada título, en la figura-21 se puede evidenciar que la temperatura hace una clara segmentación en las respuestas, pues los que fueron preservados a 6 meses, se notan más uniformes, poco invariantes y mayores a los niveles de absorbancia de los que se preservaron por 3 meses. Es decir, dentro del

bloque INS_L, se tienen niveles de absorbancia mayor a valores menores de los títulos en el estudio. Cabe mencionar que se presenta absorbancia mayor para los antivenenos preservados a 22°C, independiente del tiempo en el experimento, seguido por los resultados a 4°C y posteriormente a 45°C, en este caso, se ve el gran efecto a 3 meses de los 22 °C para los títulos en 16.000 y 8.000. En contraste, se tiene que para el menor título (4.000) todos los tratamientos tienen sus respuestas en un intervalo no tan amplio a excepción de las réplicas de 3 meses a 22°C, que desciende de manera importante.

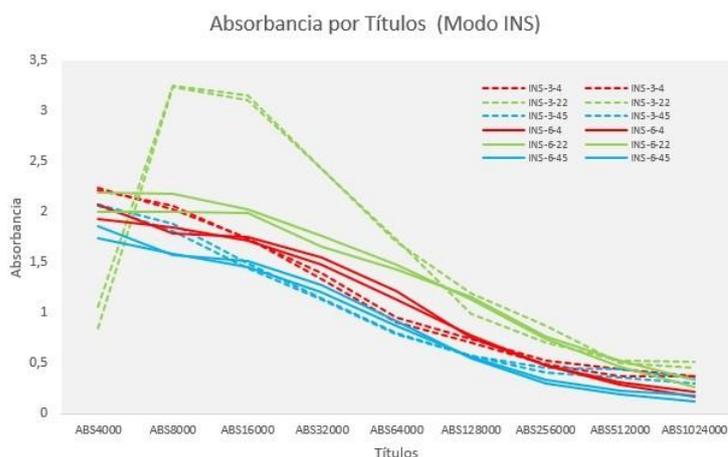


Figura-20: Absorbancia por títulos del modo INS

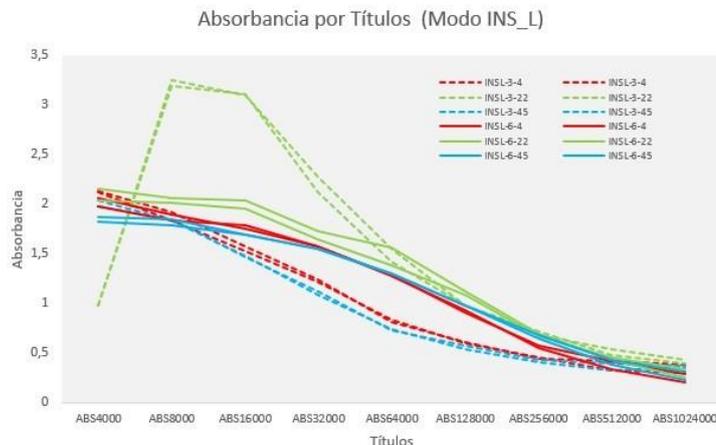


Figura-21: Absorbancia por títulos del modo INS_L

Aunque en la figura-22 se evidencia un comportamiento muy similar a los resultados de los bloques INS e INS_L, hay algunas diferencias y similitudes por cada uno de los grupos que son de gran importancia para mencionar y resaltar. En primera instancia, es común en los tres bloques que los niveles de absorbancia con 3 meses de preservación y a 22°C en los títulos de 16.000 y 8.000, también es común el comportamiento que se describe con un aumento en los niveles de absorbancia con la disminución de los niveles de los títulos, a excepción, como se ha mencionado anteriormente de los tratamientos a 3 meses y con 22°C. En este caso, las diferencias

se basan en los resultados de las réplicas a los 6 meses, pues a los 3 meses se comporta igual que en los dos bloques anteriores (INS, INS_L), se destacan mayores niveles de absorbancia para la temperatura más alta (45°C) seguido por los resultados a 22 y 4°C, a diferencia del bloque INS y similarmente al bloque INS_L, los niveles de absorbancia se notan más uniformes e invariantes a 6 meses de preservación, independiente de los títulos de los antivenenos

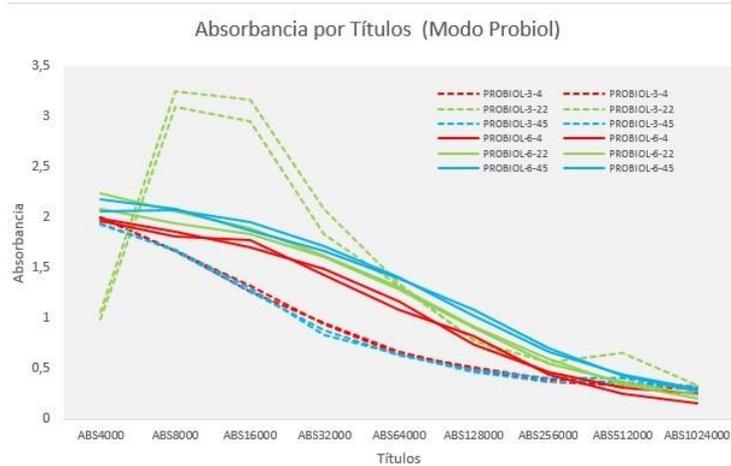


Figura 22: Absorbancia por títulos del modo Probiol

Por último, en la tabla siguiente se muestran los valores de los niveles de absorbancia promedio para cada uno de los bloques y en su respectiva división por temperatura, y de esta manera dejar en evidencia los cambios que pueden presentar al final teniendo en cuenta los títulos, sin diferenciar entre los tiempos pues ya vimos que en general solo cambian en magnitud y se comentará respecto a ellos más adelante.

		Promedios de niveles de Absorbancia por Títulos De Anticuerpos								
Modo Preser.	4.000	8.000	16.000	32.000	64.000	128.000	256.000	512.000	1.024.000	
INS	1,862	2,106	1,928	1,568	1,164	0,812	0,550	0,392	0,305	
4 ° C	2,118	1,932	1,737	1,441	1,056	0,747	0,497	0,357	0,282	
22 ° C	1,532	2,671	2,572	2,073	1,585	1,120	0,774	0,508	0,394	
45 ° C	1,937	1,715	1,475	1,190	0,851	0,570	0,379	0,311	0,240	
INS L	1,847	2,111	1,932	1,560	1,185	0,860	0,581	0,413	0,325	
4 ° C	2,076	1,873	1,662	1,406	1,055	0,765	0,508	0,380	0,296	
22 ° C	1,537	2,630	2,553	1,944	1,481	1,046	0,694	0,477	0,357	
45 ° C	1,929	1,832	1,582	1,332	1,019	0,767	0,542	0,383	0,321	
PROBIOL	1,873	2,073	1,863	1,425	1,078	0,755	0,504	0,389	0,279	
4 ° C	1,995	1,754	1,522	1,205	0,892	0,648	0,424	0,320	0,262	
22 ° C	1,595	2,588	2,467	1,791	1,317	0,851	0,547	0,430	0,277	
45 ° C	2,029	1,876	1,599	1,279	1,026	0,767	0,541	0,417	0,298	
Total	1,861	2,097	1,908	1,518	1,142	0,809	0,545	0,398	0,303	

Podemos advertir que los niveles más altos de absorbancia se presentan en los niveles más bajos de los títulos de anticuerpos, sobre todo los menores a 64.000, estos niveles oscilan entre valores como 1,142 y 2,097 siendo la respuesta a 8.000 la de mayores resultados. Cabe mencionar además que son siempre mayores los resultados de los

niveles de absorbancia cuando se ha preservado a 22°C. Y con respecto a cada uno de los modos de preservaciones, en promedio no existe gran diferencia entre los resultados en niveles de absorbancia, aunque es un poco mayor los obtenidos por medio del INS_L, es decir que el liofilizar el antiveneno aumentó muy poco (pero aumentó) los niveles de absorbancia de los títulos, a excepción del título medido a 4.000. En contraste, los menores niveles se presentan para el modo de preservación PROBIOL, esto sin diferenciar por tiempos.

Ahora bien, teniendo en cuenta los resultados por tiempo de preservación como se ve en la figura-23, los comentarios anteriores son válidos en su mayoría, y lo único que cambia es que los mayores niveles de absorbancia promedio se presentan para el modo INS en el caso de los 3 meses, y para los 6 meses, en su mayoría los niveles más altos de absorbancia los tiene el modo INS_L. Para el caso de los 3 meses, los menores niveles de absorbancias a través de los títulos lo tiene el modo PROBIOL, y en el caso de los 6 meses es el modo INS sin alteraciones.

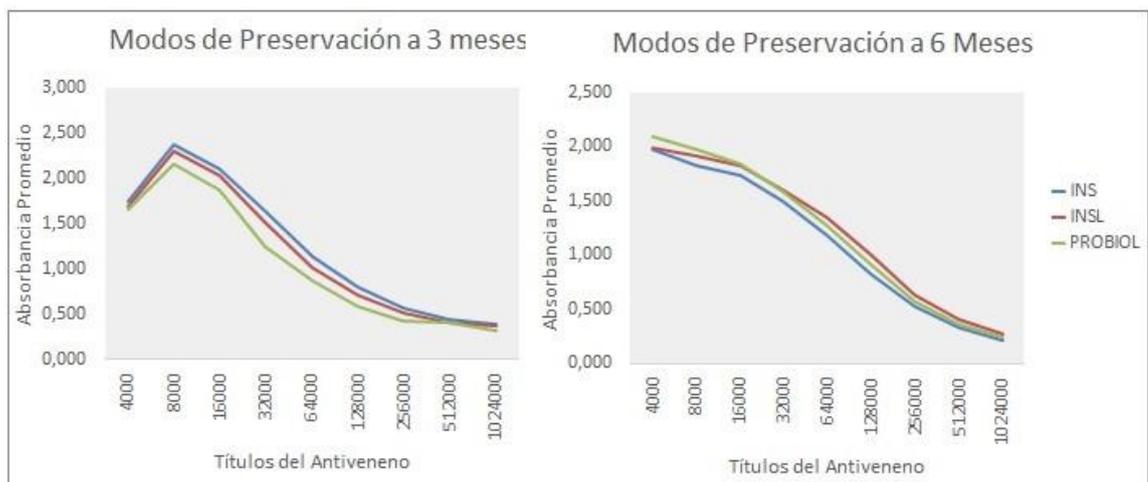


Figura 23: Absorbancia Promedio por Modo de Preservación en diferentes tiempos

3.4.2. Construcción del MANOVA

A continuación se presenta el MANOVA usando 4 test (205). Para la construcción de estos, se utilizó el software estadístico R, usando la función MANOVA. Los resultados se presentan a continuación.

	Df	Pillai	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	0.98	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.50	0.78	18	42	0.7090
tiempo	1	0.91	22.32	9	20	0.0000
temp	2	1.45	6.18	18	42	0.0000
tiempo:temp	2	1.32	4.49	18	42	0.0000
Residuals	28					

	Df	Wilks	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	0.02	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.55	0.77	18	40	0.7187
tiempo	1	0.09	22.32	9	20	0.0000
temp	2	0.01	17.44	18	40	0.0000
tiempo:temp	2	0.01	16.24	18	40	0.0000
Residuals	28					

	Df	Hotelling-Lawley	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	51.66	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.72	0.76	18	38	0.7307
tiempo	1	10.05	22.32	9	20	0.0000
temp	2	40.89	43.16	18	38	0.0000
tiempo:temp	2	45.22	47.73	18	38	0.0000
Residuals	28					

	Df	Roy	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
(Intercept)	1	51.66	114.80	9	20	0.0000
bloq	2	0.54	1.27	9	21	0.3107
tiempo	1	10.05	22.32	9	20	0.0000
temp	2	39.98	93.29	9	21	0.0000
tiempo:temp	2	44.71	104.32	9	21	0.0000
Residuals	28					

Analizando los resultados anteriores, se construyeron cuatro MANOVAs utilizando cuatro estadísticos diferentes, en los tres casos se rechaza las hipótesis $H_0: tiempo_1 = tiempo_2$ y $H_0: temperatura_1 = temperatura_2 = temperatura_3$, por lo tanto, hay diferencia en los efectos producidos por cada nivel de los factores en los 9 títulos.

3.4.3. Verificación de supuestos

Para la validación de los supuestos del MANOVA⁴⁰, se realizó un modelo de regresión lineal de cada una de las variables respuesta (los 9 títulos) con cada factor (temperatura y tiempo), obteniendo un total de 18 regresiones, y seguidamente se realizó la verificación de la normalidad de los residuales de cada regresión y la prueba de homocedasticidad de varianzas.

Para la prueba de normalidad de los errores, se realizó un test de Shapiro Wilk, en la siguiente tabla se muestra en la primera columna la regresión correspondiente, en la segunda columna se muestra el *p valor* obtenido al realizar la prueba de Shapiro Wilk, en la tercera y cuarta columna se muestra la decisión de rechazar o no la hipótesis nula

⁴⁰Multivariate Analysis of Variance(MANOVA).[internet],consultado el: 28 de septiembre/2016.Disponible en: https://sites.ualberta.ca/lkgray/uploads/7/3/6/2/7362679/22_manova.pdf

de normalidad de los errores con un nivel de significancia de 0,05 y 0,01 respectivamente

Regresión	<i>p</i> – valor	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
resp1-tiempo	0.29820627	No se rechaza	No se rechaza
resp2-tiempo	0.02681429	Se rechaza	No se rechaza
resp3-tiempo	0.87585838	No se rechaza	No se rechaza
resp4-tiempo	0.83094746	No se rechaza	No se rechaza
resp5-tiempo	0.03248904	Se rechaza	No se rechaza
resp6-tiempo	0.04298874	Se rechaza	No se rechaza
resp7-tiempo	0.11426189	No se rechaza	No se rechaza
resp8-tiempo	0.04487542	Se rechaza	No se rechaza
resp9-tiempo	0.03803441	Se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.04873068	Se rechaza	No se rechaza
resp2-temp	0.16353741	No se rechaza	No se rechaza
resp3-temp	0.78220468	No se rechaza	No se rechaza
resp4-temp	0.17209463	No se rechaza	No se rechaza
resp5-temp	0.70257638	No se rechaza	No se rechaza
resp6-temp	0.36889055	No se rechaza	No se rechaza
resp7-temp	0.80400317	No se rechaza	No se rechaza
resp8-temp	0.23779939	No se rechaza	No se rechaza
resp9-temp	0.03505038	Se rechaza	No se rechaza

Aunque muchos autores menciona que en la elaboración de un MANOVA, es muy difícil que se cumpla la normalidad de todas las regresiones, basta con que la mayoría cumpla, se puede ver que con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se tiene que en 11 regresiones no se rechaza la hipótesis de normalidad de los errores, mientras que con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ en las 19 regresiones, la prueba no rechaza esta hipótesis nula.

Por otra parte, para la validación del supuesto de homocedasticidad de los errores, se realizó un test de Bartlett, para los errores de cada una de las regresiones, obteniendo:

Regresión	<i>p</i> – valor	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
resp1-tiempo	0.547641428	No se rechaza	No se rechaza
resp1-tiempo	0.714291428	No se rechaza	No se rechaza
resp1-tiempo	0.783201078	No se rechaza	No se rechaza
resp1-tiempo	0.506308194	No se rechaza	No se rechaza
resp1-tiempo	0.017361935	Se rechaza	No se rechaza
resp1-tiempo	0.001743247	Se rechaza	Se rechaza
resp1-tiempo	0.010716625	Se rechaza	No se rechaza
resp1-tiempo	0.277741132	No se rechaza	No se rechaza
resp1-tiempo	0.443648790	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.883174579	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.831594982	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.064663051	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.103718106	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.043304423	Se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.065444943	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.119237793	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.203785160	No se rechaza	No se rechaza
resp1-temp	0.161631303	No se rechaza	No se rechaza

Se puede observar en la tabla anterior, que con un nivel de significancia de 0.05 únicamente en 4 regresiones se rechaza la hipótesis de homocedasticidad de varianzas de los errores, mientras que con un nivel de significancia de 0.01, únicamente en una regresión se rechaza esta hipótesis nula.

C. Aval Comité de Ética



CE-026

Bogotá, D.C., 13 de diciembre de 2016

Doctor(a)
PAOLA ANDREA ACERO
 Maestría en Toxicología
 Facultad de Medicina
 Universidad Nacional de Colombia
 Sede Bogotá



Ref: Aval informe final proyecto.

Respetado(a) doctor(a) Acero:

En relación a la entrega del informe final del proyecto “DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS Y CAPACIDAD NEUTRALIZANTE, PRESENTE EN LOS DIFERENTES FORMAS DE PRESERVACIÓN DE ANTIVENENOS POLIVALENTES EN COLOMBIA Y ALMACENADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS”, sometido por la estudiante”, sometido por usted de manera atenta me permito informarle que el Comité de Ética de la Facultad de Medicina en sesión del 12 de diciembre del año en curso, Acta N° 022/16, revisó su solicitud y a la luz de la normatividad que regula su actuar y le otorga el aval correspondiente.

Cordial saludo,


CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA
 Presidente Comité de Ética

 Archivo