



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la capacidad neutralizante de un antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular.

Jhon Edison Martínez Ramírez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Evaluación de la capacidad neutralizante de un antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular.

Jhon Edison Martínez Ramírez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Farmacología

Director:

Ph.D. MsC. MD. Mario Francisco Guerrero Pabón

Asesor:

Francisco Javier Ruiz Gómez

Línea de Investigación:

- Medicamentos biológicos
- Farmacología experimental del sistema nervioso

Grupo de Investigación:

FARMOL (Grupo de Investigación en Farmacología Molecular)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2021

“Para ser nosotros mismos hemos de tenernos a nosotros mismos, hemos de poseer, de reposer si es preciso, nuestras historias biográficas. Hemos de "recolectar" nosotros mismos, recolectar el drama interior, la narración, la nuestra, la de nosotros mismos. El individuo necesita esa narración, una narración interior continua, para mantener su identidad, su yo.”

Oliver Sacks.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Jhon Edison Martínez Ramírez

Fecha: 26/11/2021

Agradecimientos

Inicio mis agradecimientos a dos grandes instituciones que me acogieron y me abrieron las puertas para el desarrollo del proyecto y de mi crecimiento personal.

Ya que para mí es un elogio y un orgullo, ser parte de la tradición y el prestigio de la Universidad Nacional de Colombia. Institución que, por segunda ocasión, me ha dado las más grandes lecciones de la vida. Agradezco también al Instituto Nacional de Salud de Colombia, por el entrenamiento y las competencias, que me permitieron desarrollarme bajo los estándares más altos de la investigación. Este crecimiento no hubiera sido posible sin la guía del Profesor Mario Francisco Guerrero Pabón de la Universidad Nacional de Colombia, Director y maestro de esta tesis, a quien agradezco la dedicación y la paciencia. Así como un agradecimiento a Francisco Javier Ruiz Gómez, profesional especializado, quien fue mi mentor en el Instituto Nacional de Salud, dando alcance y libertad a mi investigación y apoyando las ideas que guiaron hasta la culminación de este proyecto. De igual manera al grupo de Hacienda Galindo y Serpentario de la Dirección de Producción, del Instituto Nacional de Salud. Por las experiencias y dedicación en mi formación. A Mónica Paola Sarmiento Pérez, Luz Mila Pinzón Muñoz y Carlos Antonio Castro Sandoval, por la dedicación y tutoría durante estos 4 años.

Agradezco al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias). Por el financiamiento del proyecto celebrado por medio del Instituto Nacional de Salud, para el desarrollo de todas las pruebas.

También agradezco a mi compañera de vida María Alejandra López Mendoza, confidente de los días felices, de los días largos. Por el amor, por la motivación y por la incondicionalidad, misma que me permitió sortear las dificultades y dar este gran paso.

Finalmente agradezco a mis padres, Edgar Martínez Sánchez y María Elena Ramírez. Por su constante apoyo y deseos de verme alcanzar los logros más altos. A mis Hermanos

Ricardo Martínez Ramírez y Oscar David Martínez Ramírez, por todas los consejos y buenas intenciones en el desarrollo mi maestría y a mi sobrina, Mariana Martínez Ramos, por encontrar en mí, motivación, inspiración y un ejemplo a seguir.

Resumen

Evaluación de la capacidad neutralizante de un antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular.

El veneno de las serpientes de coral, del género *Micrurus*, es conocido por generar un efecto neurotóxico. Este efecto es similar entre las diferentes especies de este género, sin embargo, aún no se conoce completamente la eficacia de la neutralización cruzada de los antivenenos. En el presente estudio evaluamos los efectos de los venenos de tres serpientes de coral colombianas, de las especies *M. lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis*. Determinando la capacidad de inhibir la neurotransmisión, en una preparación de nervio frénico y diafragma de ratas Wistar. Se evaluaron los efectos del veneno a dosis de 1, 10 y 50 µg/ml y se evaluó la capacidad neutralizante del antiveneno anticoral polivalente (AAP) del Instituto Nacional de Salud (INS), frente a la dosis de 10 µg/ml de cada especie. Los 3 venenos generaron bloqueos neuromusculares dependientes de las dosis en comparación con los controles. Siendo el veneno de *M. lemniscatus* el que tuvo una actividad neurotóxica más rápida, seguido de *M. sangilensis* y finalmente de *M. medemi*. Así mismo los 3 venenos fueron neutralizados con éxito por el AAP del INS. Siendo el veneno de *M. medemi* el que más porcentaje de neutralización tuvo, seguido del veneno de *M. sangilensis* y finalmente del veneno de *M. lemniscatus*. Demostrando así que el AAP del INS tiene una capacidad neutralizante y polivalente. A pesar de ser fabricado con venenos de serpientes de coral distintas a las involucradas en este estudio.

Palabras clave: *Micrurus*, bloqueo neuromuscular, veneno, preparación neuromuscular, placa neuromotora, unión neuromuscular.

Abstract

Evaluation of the neutralizing capacity of a polyvalent anticoral antivenom in a neuromuscular preparation.

Coral snake's venoms of the genus *Micrurus* are characterized by peripheral paralysis neurotoxicity. A similar neurotoxic effect is induced by the venom of most members of this genus, yet the efficaciousness of cross species venom/anti-venom treatment has not been thoroughly investigated. In this study we evaluated the effects of the venom of three Colombian coral snakes, species *M. lemniscatus*, *M. medemi*, and *M. sangilensis*, and its ability to inhibit neurotransmission in the phrenic nerve and diaphragm of Wistar rats. Venom effects were evaluated in doses of 1, 10, and 50 μg / ml. Further, the neutralizing capacity of the polyvalent anticoral antivenom (PAA) of the National Institute of Health (NIH) was evaluated against a venom dose of 10 μg / ml of each species. All 3 venoms generated a significant, dose-dependent, neuromuscular block compared to controls with *M. lemniscatus* exhibiting the fastest neurotoxic response followed by *M. sangilensis*, and *M. medemi*. Finally, the NIH PAA was able to completely neutralize *M. medemi* and partially neutralize both *M. sangilensis* and *M. lemniscatus*. Thus, we have demonstrated that the INS AAP has neutralizing and polyvalent capacity despite being manufactured with venoms from coral snakes not involved in this study.

Key words: *Micrurus*, neuromuscular blockade, venom, neuromuscular preparations, Neuromuscular junction.

Contenido

Pág.

Resumen	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de Laminas	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	20
Introducción	22
1. Definición del problema de investigación	24
1.1 Planteamiento del problema.....	26
1.2 Pregunta de investigación	27
1.3 Justificación.....	27
1.4 Objetivos	29
1.4.1 Objetivo General.....	29
1.4.2 Objetivos específicos.....	29
2. Evaluación de la capacidad neutralizante de un antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular	30
2.1 Biología de las serpientes de coral colombianas.	30
2.1.1 <i>Micrurus lemniscatus</i>	31
2.1.2 <i>Micrurus medemi</i>	32
2.1.3 <i>Micrurus sangilensis</i>	33
2.2 Efectos neurotóxicos del veneno de serpientes del género <i>Micrurus</i>	34
2.2.1 Fosfolipasas α_2 (PLA ₂)	35
2.2.2 Toxinas de tres dedos (3FTx)	35
2.3 Evaluación de la capacidad neutralizante de un antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular.....	36
2.4 Metodología	38
2.4.1 Extracción y conservación del veneno de investigación.....	38
2.4.2 Animales.....	38
2.4.3 Evaluación de la capacidad neurotóxica en una preparación neuromuscular	38
2.4.4 Evaluación de la capacidad neutralizante del antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular	39
2.4.5 Análisis estadístico	40
3. Resultados	41
3.1 Evaluación de la capacidad neurotóxica del veneno de <i>Micrurus lemniscatus</i> y de la acción neutralizante del AAP.	41
3.2 Evaluación de la capacidad neurotóxica del veneno de <i>Micrurus medemi</i> y de la acción neutralizante del AAP.	44
3.3 Evaluación de la capacidad neurotóxica del veneno de <i>Micrurus sangilensis</i> y de la acción neutralizante del AAP.	48
3.4 T ₅₀	51

4. Discusión.....	53
5. Conclusiones y recomendaciones	55
5.1 Conclusiones	55
5.2 Recomendaciones	56
6. Financiamiento.....	57
7. Bibliografía.....	58
8. Anexos.....	64

Lista de figuras

- Fig. 1** Evaluación de la capacidad contráctil de la preparación neuromuscular frénico – diafragma de rata, en ausencia (control) y presencia de: (1) El veneno de la especie *M. lemniscatus*, 1, 10 y 50 µg/ml (ML) y (2) el veneno de la especie *M. lemniscatus* (10 µg/ml) más el antiveneno anticoral 1 ml (1:1,3) polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).....42
- Fig. 2** Expresión logarítmica de la evaluación de la capacidad de contracción de la preparación neuromuscular, bajo el efecto del veneno de la especie *M. lemniscatus*, y bajo el efecto de la incubación del Antiveneno anticoral polivalente del INS con una concentración de 10ug/ml del veneno de la misma especie.43
- Fig. 3** Expresión de la capacidad de inhibición de la contracción, del veneno de *M. medemi*, evaluada al minuto 60 de la prueba. ** En estas dos barras se puede comparar el efecto del veneno a una concentración de 10 µg/ml y el efecto neutralizante del Antiveneno Anticoral Polivalente (AAP) incubado bajo la misma concentración de veneno. En la primera barra al minuto 60 ya había causado una inhibición de la contracción del 100% mientras que en la segunda el músculo aún tiene más del 60% de su capacidad contráctil en presencia del antiveneno.....44
- Fig. 4** Evaluación de la capacidad contráctil de la preparación neuromuscular frénico – diafragma de rata, en ausencia (control) y presencia de: (1) El veneno de la especie *M. medemi*, 1, 10 y 50 µg/ml (ML) y (2) el veneno de la especie *M. medemi* (10 µg/ml) más el antiveneno anticoral 1 ml (1:1,3) polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).....46
- Fig. 5** Expresión logarítmica de la evaluación de la capacidad de contracción de la preparación neuromuscular, bajo el efecto del veneno de la especie *M. medemi*, y bajo el efecto de la incubación del Antiveneno anticoral polivalente del INS con una concentración de 10ug/ml del veneno de la misma especie.47
- Fig. 6** Expresión de la capacidad de inhibición de la contracción, del veneno de *M. medemi*, evaluada al minuto 60 de la prueba. **En estas dos barras se puede comparar el efecto del veneno a una concentración de 10 µg/ml y el efecto neutralizante del Antiveneno Anticoral Polivalente (AAP) incubado bajo la misma concentración de veneno. En la primera barra al minuto 60 ya había causado una inhibición de la contracción permitiendo solo un 33,7% de la contracción, mientras que, en la segunda barra, el

músculo aún tiene más del 70% de su capacidad contráctil en presencia del antiveneno.	47
Fig. 7 Evaluación de la capacidad contráctil de la preparación neuromuscular frénico – diafragma de rata, en ausencia (control) y presencia de: (1) El veneno de la especie <i>M. lemniscatus</i> , 1, 10 y 50 µg/ml (ML) y (2) el veneno de la especie <i>M. lemniscatus</i> (10 µg/ml) más el antiveneno anticoral 1 ml (1:1,3) polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).	49
Fig. 8 Expresión logarítmica de la evaluación de la capacidad de contracción de la preparación neuromuscular, bajo el efecto del veneno de la especie <i>M. sangilensiss</i> , y bajo el efecto de la incubación del Antiveneno anticoral polivalente del INS con una concentración de 10ug/ml del veneno de la misma especie.....	50
Fig. 9 Expresión de la capacidad de inhibición de la contracción, del veneno de <i>M. medemi</i> . evaluada al minuto 60 de la prueba. **En estas dos barras se puede comparar el efecto del veneno a una concentración de 10 µg/ml y el efecto neutralizante del Antiveneno Anticoral Polivalente (AAP) incubado bajo la misma concentración de veneno. En la primera barra al minuto 60, el efecto del veneno solo permitió una capacidad de contracción del 46%, mientras que en la segunda el músculo aún tiene más del 75% de su capacidad contráctil en presencia del antiveneno.....	50
Fig. 10 Comparación de los T50 (intervalo de tiempo en el que la contracción baja al 50% en causar una inhibición total de la contracción) calculado para las especies <i>Micrurus lemniscatus</i> (ML) a 10 y 50 µg/ml, de la especies <i>Micrurus medemi</i> (MM) y <i>Micrurus sangilensis</i> (MS) a 50 µg/ml.	51

Lista de tablas

Tabla 1. Porcentajes de contracción presentes en el tejido y porcentajes de inhibición comparados con el control al minuto 60 y 120 de la prueba con veneno de <i>M. lemniscatus</i> .	41
Tabla 2. Porcentajes de contracción presentes en el tejido y porcentajes de inhibición comparados con el control al minuto 60 y 120 de la prueba con veneno de <i>M. medemi</i> .	45
Tabla 3. Porcentajes de contracción presentes en el tejido y porcentajes de inhibición comparados con el control al minuto 60 y 120 de la prueba con veneno de <i>M. sangilensis</i> .	48
Tabla 4. Datos expresados en porcentaje de los resultados obtenidos en el DathaPad del Programa Labchart Pro 8 para los ensayos de <i>Micrurus medemi</i> .	64
Tabla 5. Datos expresados en porcentaje de los resultados obtenidos en el DathaPad del Programa Labchart Pro 8 para los ensayos de <i>Micrurus lemniscatus</i> .	68
Tabla 6. Datos expresados en porcentaje de los resultados obtenidos en el DathaPad del Programa Labchart Pro 8 para los ensayos de <i>Micrurus sangilensis</i> .	71
Tabla 7. Graph Pad Analisis estadístico <i>Micrurus lemniscatus</i> (2way Anova).	77
Tabla 8. Graph Pad Analisis estadístico <i>Micrurus lemniscatus</i> (2way Anova – Multiple comparisons).	78
Tabla 9. Graph Pad Analisis estadístico <i>Micrurus medemi</i> (2way Anova).	79
Tabla 10. Graph Pad Analisis estadístico <i>Micrurus medemi</i> (2way Anova- Multiple comparisons).	81
Tabla 11. Graph Pad Analisis estadístico <i>Micrurus sangilensis</i> (2way Anova).	82
Tabla 12. Graph Pad Analisis estadístico <i>Micrurus lemniscatus</i> (2way Anova-Multiple comparisons).	83

Lista de Laminas

Lámina 1. Aval comité de ética Cemin, Instituto Nacional de Salud.....	85
Lámina 2. Inserto Antiveneno Anticoral Polivalente INS.	86

Lista de Fotografías

- Fotografía 1.** *Micrurus lemniscatus* (Coral) fotografía de Juan Pablo Hurtado. Grupo de estudio de animales ponzoñosos y sus venenos. INS31
- Fotografía 2.** *Micrurus medemi* (Coral de Villavicencio) fotografía de Juan Pablo Hurtado. Grupo de estudio de animales ponzoñosos y sus venenos. INS32
- Fotografía 3.** *Micrurus sangilensis* (Coral) fotografía de Juan Pablo Hurtado. Grupo de estudio de animales ponzoñosos y sus venenos. INS33

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
C°	Temperatura	C°	$C^{\circ} = K^{\circ} - 273$
Mg	masa	mg	10^{-3} g
g	masa	g	
ms	Tiempo		
ML	volumen	mL	10^{-3} L
mV	Potencial eléctrico	mV	10^{-3} V
V	Potencial eléctrico	V	$\frac{\text{kg} * \text{m}^2}{\text{A} * \text{s}^2}$
Hz	Potencial eléctrico	Hz	1 ciclo/seg

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μg	Masa	μg	10^{-6} g
μL	Volumen	μL	10^{-6} L

Abreviaturas

Abreviatura Término

ACh	Acetilcolina
CaCl ₂	Cloruro de sodio
CSV	Concentración de la solución de veneno
CV	Cantidad de veneno
E	Exceso de una preparación para cubrir imprevistos
FD	Factor de dilución
HCl	Cloruro de hidrógeno
KCl	Cloruro de potasio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio, solución estándar
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NFD	Nervio Frénico y Diafragma
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
T50	Tiempo que tarda en veneno en inhibir el 50% en una preparación neuromuscular.
T100	Tiempo que tarda en veneno en inhibir el 100% en una preparación neuromuscular
3FTx	Toxinas de tres dedos -Three finger toxin

Introducción

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema global de salud pública, categorizado como enfermedad tropical desatendida (Chippaux, 2017). El ofidismo afecta entre 1.8 y 2.7 millones de personas en todo el mundo, causando entre 81.000 y 138.000 muertes anuales. (Kasturiratne et al., 2008; Silva et al., 2017; Warrell, 2010; Williams et al., 2010)

En un país tan mega diverso como Colombia, con condiciones de vida que contemplan la ruralidad y la agricultura, este tipo de accidentes pueden ascender hasta los 5434 casos por año. Cifra reflejada en el año 2018. (SIVIGILA. 2019) (Rojas Bárcenas, 2018).

Colombia posee más de 310 especies de serpientes, con dos familias de importancia médica: Los víperidos o víboras de foseta, que cuentan con 20 especies. Y los elápidos, o serpientes de coral, con 31 especies. Ambas familias solo representan el 16% de las especies de serpientes presentes en Colombia. La familia de los vipéridos puede causar diferentes síntomas, como hemorragias, necrosis del tejido, daño renal agudo, edemas, coagulopatías, entre otros. Por otra parte, los elápidos (Serpientes de coral) causan pocos o ningún signo local, pero cuentan con venenos neurotóxicos que inhiben la transmisión de la placa neuromotora resultando en parálisis de los músculos y finalmente en muerte por parálisis del diafragma y los músculos intercostales, impidiendo así la respiración. (Pineda, D., & Rengifo, 2002).

Estos accidentes ofídicos ocurren en su mayoría, en la ruralidad, asociado principalmente a tareas agrícolas, causando impacto en la salud ocupacional (Gómez, 2011) y gran impacto en la salud pública a nivel nacional.

Según el tipo de accidente ofídico, este se le atribuye una clasificación de leve, moderado o severo. En el caso de los elápidos, su clasificación siempre será de moderada a severa. Algunos de estos venenos causan parálisis respiratoria en 20 minutos, como es el caso de la especie *Micrurus surinamensis*, (Pardal et al., 2010).

El único tratamiento exitoso para este tipo de envenenamiento, es la administración de suero antiofídico polivalente (SAP) o antiveneno anticoral polivalente (AAP). Medicamento biológico que no siempre se encuentra disponible o se administran de manera tardía, dejando secuelas o empeorando los pronósticos. Por esto, se han planteado otros tratamientos para controlar el envenenamiento en las fases iniciales. Basados en fármacos anticolinesterásicos o agonistas de acetil colina. Buscando mejorar las condiciones del paciente, revertir parcialmente el efecto o estabilizar el paciente hasta lograr la administración del antiveneno anticoral polivalente. (Camargo et al., 2011; De Abreu et al., 2008; Floriano et al., 2019)

La dinámica de distribución geográfica de las serpientes y sus tipos de venenos, exigen una polivalencia en los antivenenos. Por tal razón, la Organización mundial de la salud, ha sugerido una estandarización global de los métodos para analizar la actividad biológica de los venenos. Con un resultado enfocado en crear antivenenos más eficaces y seguros. (Harvey et al., 1994; WHO, 1981). La evaluación de esta capacidad neutralizante puede determinarse por medio de pruebas de reacción cruzada o en modelos In-vitro e In-Vivo. Entender la efectividad de los antivenenos también permite un posible replanteamiento en su formulación. Existen para estos casos: dosis efectivas 50, como también existen modelos de baño de órgano aislado. Este último modelo permite emular las condiciones fisiológicas de una preparación neuromusculares (PNM). Empleando principalmente nervio-músculo del biventer cervicis de pollos (Ginsborg & Warriner, 1960) y preparaciones del nervio frénico del hemidiafragma (PND) de ratas y ratones (Bulbring, 1946).

Estas metodologías *in-vitro* permiten medir la respuesta de la intoxicación del tejido nervioso, registrando la tensión muscular bajo los efectos de diferentes fármacos o toxinas. (C. M. Smith, 1963). Así como el efecto de venenos de serpiente de coral, cuantificando porcentajes de inhibición de la contracción. Por medio de esta técnica se evaluó la capacidad neurotóxica de 3 especies de coral (*Micrurus lemniscatus*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus medemi*) y la capacidad neutralizante del antiveneno anticoral polivalente del INS.

1. Definición del problema de investigación

En Colombia se pueden conseguir sueros antiofídicos de laboratorios privados o de origen extranjero, provenientes de países como Costa Rica (Instituto Clodomiro Picado) o de Brasil (Instituto Butantan), y algunos sueros de México (Bioclon). Pero el principal fabricante en Colombia es el Instituto Nacional de Salud (INS), el cual produce actualmente tres tipos de sueros hiperinmunes: El Suero antiofídico Polivalente, (SAP), el Antiveneno Anticoral Polivalente, (AAP) y el Suero Antilonómico (SA).

Estos medicamentos biológicos se fabrican usando como base las toxinas de origen animal, a las cuales se les realizan pruebas de letalidad: dosis letal 50 (DL50). Una vez establecidas, se aplica a dosis subclínicas en equinos. Esta presentación de antígeno en dosis repetitivas permite que el animal desarrolle una respuesta inmune contra el veneno. (León et al., 2011) Seguido de una extracción de sangre, separación de plasma y purificación de las inmunoglobulinas G del equino por medio de precipitación con sulfato de amonio y filtración estéril. Posteriormente se formulan y definen las concentraciones efectivas que definirá cada vial de antiveneno. (Castillo-Beltrán et al., 2018)

Para la elaboración del AAP, se utilizan veneno de 4 especies de serpientes, *Micrurus isozonus*, *Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii* y *Micrurus surinamensis*. Estas especies son las más representativas, tanto en número de casos, como por su distribución geográfica y filogenética. Según la clasificación morfológica de color para Colombia, comprenden serpientes del grupo monadal (*M. dumerilii*), que corresponde a una banda negra entre dos rojas; de triadas, que corresponde a tres bandas negras entre dos rojas separadas por líneas blancas (*M. surinamensis* y *M. isozonus*.); bicolor (*M. mipartitus*). (Castillo-Beltrán et al., 2018)

El APP ha demostrado tener una amplia capacidad neutralizante contra un total de 7 especies, incluyendo *M. lemniscatus* y *M. medemi*. Sin embargo, no se conoce su capacidad neutralizante contra *M. sangilensis*, ni se han evaluado sus efectos

neurotóxicos o neutralización en sistemas de baño de órgano aislado. Esto es importante conocerlo, ya que se sabe que sueros como el producido por el Instituto Clodomiro Picado, no tiene capacidad neutralizante contra especies como la de *M. mipartitus* de Colombia (Castillo-Beltrán et al., 2018).

En estudios, como el realizado por Renjifo et al. 2012, se empleó esta técnica analizando el veneno de dos especies de coral colombianas: *Micrurus mipartitus* y *Micrurus dissoleucus*. De este género de serpientes se sospecha principalmente la acción de dos neurotoxinas: La fosfolipasa alfa dos que actúa como una beta-neurotoxina presináptica, interrumpiendo la liberación de acetilcolina, y una alfa-toxina de tres dedos o 3 FTX, con acción postsináptica que actúa ligándose al sitio de acción de la acetilcolina en el receptor nicotínico. De esta manera se inhibe la transmisión de la neurona a la placa neuromotora, lo cual clínicamente causaría la falla respiratoria por parálisis del diafragma. (Renjifo et al., 2012a).

Este estudio evaluó los venenos a diferentes concentraciones (3, 10 y 50 µg/ml), por un intervalo de tiempo de 3 horas. Solo se logró inhibir un 100% de la contractibilidad con el veneno de *Micrurus mipartitus*, efecto que no se logró con el veneno de *Micrurus dissoleucus*, incluso a dosis de 50ug/ml, en este lapso de tiempo. Sin embargo, *Micrurus dissoleucus* demostró una disminución del porcentaje de contracción, bajo la estimulación de transductores y pulsos eléctricos. Histológicamente se encontró un efecto miotóxico adicional al efecto neurotóxico. Estos hallazgos demuestran que puede existir una alta diversidad en los venenos de las especies conocidas, y la gran variabilidad que presentan regiones como Colombia. (Renjifo et al., 2012a).

Las especies a elección para este estudio representan serpientes del sur de la Orinoquia y la Amazonia, donde pertenece la serpiente de la especie *M. lemniscatus*. Esta alcanza tamaños grandes en comparación con otras corales. La serpiente de la especie *M. medemi*, endémica de Villavicencio, en el noroccidente de la región Orinoquia, y la *M. sangilensis*. Endémica del municipio de San Gil en Santander, en la región Andina Colombiana. (Auerbach, 2005. D. Lynch et al., 2016).

1.1 Planteamiento del problema

La necesidad surge de la atención del accidente ofídico como un problema de salud pública. Al año en Colombia ocurren alrededor de 5300 accidentes ofídicos. Se conoce que el accidente causado por serpientes de la familia *Elapidae*, llega a estar entre el 1 y 2% de estos accidentes. (SIVIGILA. 2019). Este envenenamiento produce signos neurotóxicos, por medio del bloqueo de la placa neuromotora, derivando en parálisis muscular. Por lo cual este tipo de accidentes se clasifican siempre como graves. Pueden evolucionar rápidamente hasta una parálisis respiratoria y muerte, de manera muy temprana. En ocasiones los signos clínicos pueden manifestarse hasta 7 horas después. (Bucarety et al., 2016) o en el caso de *M. lemniscatus*, hasta 14 horas después del accidente ofídico. (Manock et al., 2008).

El sistema de vigilancia en salud pública en Colombia (SIVIGILA) ha registrado alrededor de 5000 casos por año, cuya mayoría se encuentran en las regiones Caribe y Andina, más específicamente, en los departamentos de Antioquia, Norte de Santander, Córdoba, Cesar, Meta y Chocó. Por ejemplo, en el primer semestre de 2019 se registraron 2555 casos de accidente ofídico. Por semana epidemiológica se registró en promedio 105 casos. Con un aumento significativo de casos en las semanas epidemiológicas 18 a 22. (Instituto Nacional de Salud (INS), 2019). La mayor incidencia se observó en departamentos de la Amazonía, Orinoquía y Chocó en el Pacífico. La incidencia nacional fue de 5,1 por 100.000 habitantes. (Instituto Nacional de Salud (INS), 2019).

Por tanto, dicho accidente requiere de un tratamiento rápido con suero antiofídico anticoral que asegure la mayor polivalencia posible. El APP fabricado por el Instituto Nacional de Salud (INS), ha demostrado neutralización cruzada en otras especies (Castrillón et al. 2017).

Por esto, se propone evaluar los venenos de las 3 especies mencionadas. Estos venenos no están incluidos en la elaboración del AAP del INS, por lo cual se busca determinar una reacción cruzada. Considerando que son especies representativas en zonas con densidad demográfica significativa y que habitan cerca a ciudades, y considerando dos de estas especies son endémicas.

1.2 Pregunta de investigación

Determinar a partir de los resultados de actividad neurotóxica de los venenos planteados ¿Cuál es la capacidad neurotóxica de los venenos de las serpientes colombianas *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* y su respuesta frente a un antiveneno anticoral polivalente?

1.3 Justificación

El veneno de serpientes de coral está compuesto principalmente por neurotoxinas de tipo beta y alfa. Pertenecientes, a Fosfolipasa Alfa Dos y Toxinas de Tres Dedos, respectivamente. El porcentaje de estas toxinas, varía dentro de la composición según la especie, el hábitat y la dieta, (Campbell, J. A., Lamar, 2004; Ciscotto et al., 2011; Kopper et al., 2013; Lomonte et al., 2016; Moraes et al., 2003)

Esta variación hace que sea necesario llegar a un suero neutralizante con una polivalencia para el territorio nacional. Así como la OMS sugiere que estos antivenenos se fabriquen con especies propias del país, se debe evaluar la capacidad de revertir los efectos en especies endémicas (Gutiérrez, 2018; Gutiérrez et al., 2017; Tanaka et al., 2010). Teniendo en cuenta que, en muchos casos, se desconoce la especie exacta de serpiente de coral involucrada en el accidente. Las especies planteadas para este estudio, se pueden hallar en Santander o el Meta, las cuales se encuentran entre las entidades territoriales con mayor reporte de casos (Instituto Nacional de Salud (INS), 2019). Aunque se puede evaluar la reacción cruzada con pruebas de Western Blot (Rossan et al., 2001), estas pruebas no permiten detectar la velocidad con que actúan los venenos sobre una unión neuromuscular.

La preparación neuromuscular en un sistema de órgano aislado, permite evaluar cantidades pequeñas de veneno. Optimizando el uso de los mismos, ya que las serpientes de coral son animales con una longitud promedio de 30 cm, cuyo volumen de veneno es de aproximadamente 0,05 ml. Por lo cual, es necesario tener un número de especímenes suficientes y en las condiciones adecuadas, emulando una dieta

adecuada, humedad, sustrato, temperatura y horas de luz. Factores que impactan la longevidad y productividad de veneno de las serpientes de Coral (Chacón et al., 2012; Mendes et al., 2019). Sin embargo, se puede tardar un año en conseguir cantidades de veneno adecuadas para investigación. Es por eso que la estandarización adecuada de la técnica de órgano aislado, basada en el nervio frénico y diafragma de ratas, establece pautas para continuar con la determinación de la actividad neurotóxica para muchas otras especies de serpientes. (Camargo et al., 2011; Floriano et al., 2020a)

El uso de suero antiofídico constituye el único tratamiento eficaz contra ofidiotoxicosis (OMS 2010), No obstante, la producción y desarrollo de estos presenta bastantes retos, como la obtención del veneno suficiente para su fabricación. Así mismo, se debe considerar tener amplios espacios de tiempo entre las extracciones de veneno, esto determina una mejor salud para las serpientes involucradas, y mayores volúmenes de veneno, que den lugar a la fabricación del antiveneno. (Mendes et al., 2019)

El APP se desarrolló en los últimos años el con el fin de atender las necesidades del país respecto a la salud pública, (Instituto Nacional de Salud., 2016), y el desarrollo de estos medicamentos biológicos debe continuar en constante mejora, evaluación y optimización para asegurar un medicamento de calidad y de amplia cobertura farmacológica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de neutralización del antiveneno anticoral polivalente del INS, frente a algunos venenos de corales colombianas.

1.4.2 Objetivos específicos.

- Determinar la actividad neurotóxica de tres venenos de corales colombianas del género *Micrurus* en una preparación neuromuscular.
- Determinar la actividad neutralizante del antiveneno anticoral polivalente del INS frente a tres venenos de corales colombianas del género *Micrurus* en una preparación neuromuscular.

2. Evaluación de la capacidad neutralizante de un antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular.

2.1 Biología de las serpientes de coral colombianas.

Las serpientes de coral pertenecen a la familia de los Elápidos, siendo el género *Micrurus* (Wagler 1824) el más representativo para Colombia con 30 especies y el género *Hydrophis* con 1 especie, genero altamente distribuido a nivel global.(Durban et al., 2018). El nombre del género deriva de la palabra griega *mikros* que significa “pequeño” y *oura* que significa “cola”, debido a la cola corta que resulta de medir desde la cloaca hasta la punta de la cola. Este género está compuesto por alrededor de unas 66 especies distribuidas desde el sudeste de Estados Unidos, a través de México, Centroamérica, la gran parte de Suramérica y hasta la parte central de Argentina. Pueden tener tamaños entre los 30 cm hasta 1.5 m. Las corales son de hábitos semifosoriales y acuáticos y su dieta está compuesta principalmente por otras serpientes. (Campbell, J. A., Lamar, 2004; Jorge Da Silva & D. Aird, 2001; Urdaneta et al., 2004)

Serpientes de monadas

Las especies de coral se pueden dividir en función a su coloración. El grupo monadal o de una sola banda, está caracterizado por poseer una banda negra bien definida entre dos bandas rojas. (Campbell, J. A., Lamar, 2004). Este patrón es el dominante en las serpientes de coral del norte y del centro de américa, así como en muchas especies de Suramérica. Algunas de estas especies, tienen patrones melanizados, donde la coloración roja se ha vuelto parcial o totalmente oscura. Como es el caso de la *Micrurus medemi*. (Campbell, J. A., Lamar, 2004)

Serpientes de triadas

La presencia de 3 anillos negros entre dos rojos define al patrón de triadas. A este grupo pertenecen algunas de las serpientes de coral más grandes.

Otras coloraciones comprenden los patrones bicolors, estas serpientes tienen anillos que puede ser blancos, amarillos o naranjas, seguidos por anillos negros. Con algunos cambios de color en los anillos presentes en la cola o en las bandas de la cabeza, como el caso de la especie *Micrurus mipartitus*. (Campbell, J. A., Lamar, 2004)

2.1.1 *Micrurus lemniscatus*

Esta especie se encuentra distribuida en Colombia en las regiones de la Orinoquía y la Amazonía, llegando a alturas de hasta 1000 msnm. Habitan en bosque húmedo de tierras bajas, áreas despejadas, bosques secundarios. Incluso llegando a encontrarse en áreas próximas al perímetro urbano, así como en zonas acuáticas o bastante húmedas. Es una de las serpientes de coral más grandes de Colombia, llegando a medir entre 60 a 90 cm. El individuo más grande registrado midió 114,5 cm. Su patrón de coloración está compuesto por triadas de anillos negros. (Campbell, J. A., Lamar, 2004; Goularte et al., 1995)



Fotografía 1 *Micrurus lemniscatus* (Coral) fotografía de Juan Pablo Hurtado. Grupo de estudio de animales ponzoñosos y sus venenos. INS

2.1.2 *Micrurus medemi*.



Fotografía 2 . *Micrurus medemi* (Coral de Villavicencio) fotografía de Juan Pablo Hurtado. Grupo de estudio de animales ponzoñosos y sus venenos. INS

Esta especie se encuentra distribuida en las proximidades del área urbana de Villavicencio, próxima a la base de la cordillera oriental de los Andes, siendo endémica para esta zona. Por lo cual es conocida como coral de Villavicencio. Se han registrado tamaños de 66,6 cm. Habita en bosques lluviosos de baja montaña. Su patrón de coloración se encuentra compuesto por móradas de anillos negros, en presencia de anillos rojos melanizados. (Campbell, J. A., Lamar, 2004)

2.1.3 *Micrurus sangilensis*.



Fotografía 3 *Micrurus sangilensis* (Coral) fotografía de Juan Pablo Hurtado. Grupo de estudio de animales ponzoñosos y sus venenos. INS

Especie endémica del país, distribuida en el norte entre las cordilleras central y oriental, principalmente localizada en el departamento de Santander; de allí se origina el nombre de esta especie derivada de San Gil en Santander, sumando el sufijo en latín *-ensis*, que significa “lugar”. Sin embargo, puede habitar en Boyacá y el norte de Cundinamarca, encontrándose en altitudes entre 1018 y 1737 msnm. Habita en ambientes de bosque tropical seco, bosque seco de baja montaña y bosque seco de baja humedad. Se han reportado especies de hasta 60 cm (Roze, 1996). Tiene una coloración de triadas, siendo la cola bicolor con anillos negros y blancos (Campbell, J. A., Lamar, 2004).

2.2 Efectos neurotóxicos del veneno de serpientes del género *Micrurus*

Los venenos de serpientes son un compuesto de enzimas y proteínas producto de una glándula especializada, que en su mayoría (70-90%) está compuesto de proteínas. Las cuales pueden tener actividad enzimática y generar efectos a nivel local y sistémico. (Gopalakrishnakone et al., 2017; Whaler, 1978).

Estos compuestos cuentan con la capacidad de causar amplios efectos fisiológicos, como cardiotoxicidad, miotoxicidad, hemólisis, efecto hemorrágico actividad edematógena, neurotoxicidad, entre otras. (León et al., 2011), que buscan dañar y alterar las funciones del metabolismo de la presa, ya sea con el objetivo de paralizarla o matarla.

Los efectos de los venenos de las serpientes, se pueden agrupar y asociar a dos grandes familias: aquellos neurotóxicos se atribuyen principalmente a la familia de los elápidos (*Elapinae e Hydrophiinae*) y los efectos hemotóxicos a la familia de los víperidos (*Viperinae y Crotalinae*). Aunque ambas familias pueden compartir algunas proteínas y enzimas, su porcentaje en la composición varía ampliamente. Siendo los elápidos, la familia de serpientes con un mayor porcentaje de neurotoxinas en la composición de su veneno, el cual actúa directamente en la unión de la placa neuromuscular. (Gopalakrishnakone et al., 2017)

Entre estas neurotoxinas se encuentran las beta neurotoxinas; Fosfolipasas alfa 2 (PLA2), y las alfa neurotoxinas como la Toxina de 3 dedos (3FTX), siendo las más abundantes de la composición proteica en los venenos de los elápidos, (Jorge Da Silva & D. Aird, 2001; León et al., 2011; Rey-Suárez et al., 2016; Tanaka et al., 2010)

2.2.1 Fosfolipasas α_2 (PLA₂)

Las PLA₂ poseen un efecto neurotóxico a nivel pre-sináptico. Reconociendo sitios en los canales de +K en la membrana plasmática. Estas interacciones, cambian la conformación de ambas cadenas; alterando la membrana bifosfolipídica. Lo cual altera el equilibrio iónico en el interior de la neurona, rompiendo las membranas de las vesículas que almacenan acetilcolina (ACh), (Barber et al., 2013; Dutertre et al., 2017; Gopalakrishnakone et al., 2017; León et al., 2011).

2.2.2 Toxinas de tres dedos (3FTx)

Las toxinas de 3 dedos (3FTX), han sido descritas en venenos de Elápidos y colúbridos (Kini, 2011; Rey-Suárez et al., 2019) La mayoría de alfa neurotoxinas de los elápidos son 3FTX (Nirthanan & Gwee, 2004). Estas toxinas bloquean los receptores del musculo tipo nACHR a nivel post-sináptico, ligándose a lugares ortostéricos del receptor en la placa neuromotora, inhibiendo competitivamente los sitios de unión de los neurotransmisores como la acetilcolina (ACh). Esto limita la acción de la d-tubocurarina. Por tal razón, estas toxinas se conocen como “curamiméticas” (Goularte et al., 1995). Ya que presentan una alta afinidad con los receptores ortostéricos de 15 a 20 veces mayor. causando uniones en su mayoría irreversibles. (Kini, 2011).

2.3 Evaluación de la capacidad neutralizante de un antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular

Existen considerables estudios enfocados a evaluar los efectos de fármacos y xenobioticos sobre las funciones fusimotoras y la actividad aferente de las fibras musculares (Souza et al., 2020). Dentro de estos se observan montajes de tejidos musculares aislados como nervio-músculo del cervicis (Ginsborg & Warriner, 1960) preparaciones del nervio frénico y hemidiafragma (Bulbring, 1946), o musculo semitendinoso o sartorio de rana (I. Smith, 1972). Aun así, los resultados obtenidos de las fibras musculares de rana, difícilmente puede diferenciar entre los efectos sistémicos y los efectos directos de un fármaco. Ya que los músculos de los anfibios a diferencia de los de los mamíferos, no poseen un control fusimotor separado. (Ganguly et al., 1978).

Esto ayudó a determinar y a preferir el desarrollo de una preparación in vitro sencilla, frente a la actividad directa o indirecta en el músculo estriado, principalmente de los mamíferos. Por eso, preparaciones como el montaje en cámaras de baño de órgano aislado, usando nervio frénico de roedores, han resultado en una herramienta farmacológica de importancia. Anatómicamente, esta región posee una unión neuromuscular formada por sinapsis entre un nervio motor y un musculo esquelético. Esta representación de esta unión es fácil de delimitar y aislar, y a su vez permite evaluar la acción de fármacos y extractos a nivel pre, post y en la hendidura sináptica y observar sus efectos bajo la técnica miográfica. (Souza et al., 2020).

Finalmente, las preparaciones de nervio-músculo de biventer cervicis de pollos, también permiten distinguir entre agentes bloqueadores neuromusculares que causan despolarización y aquellos que no. Ambos reducen las contracciones causadas por la estimulación nerviosa. Pero los fármacos despolarizantes también provocan una contractura del músculo. Así mismo, como la preparación de nervio frénico y diafragma, permite enfocar el estímulo directamente, o probar simultáneamente entre la reducción de la contracción producida por estímulo nervioso, o producida por actividad despolarizantes. (Harris et al., 2020; Harvey et al., 1994)

La preparación nervio muscular en aves, se obtiene mediante el uso de la parte inferior del borde innervado del biventer cervicis. Ya que esta innervación se encuentra encerrada por el tendón entre los dos bordes inferiores. Por lo cual es posible dirigir un estímulo eléctrico en contacto con este tendón, para generar la contracción del músculo. (Ginsborg & Warriner, 1960).

Esta técnica es la adecuada para evaluar el uso de suero antiofídico, considerado el único tratamiento eficaz, y su capacidad neutralizante en la preparación neuromuscular. (Gómez-Betancur et al., 2019)

2.4 Metodología

2.4.1 Extracción y conservación del veneno de investigación.

Se usaron venenos de 3 especies de serpientes de coral: *Micrurus lemniscatus*, proveniente de la región de Villagarzón (Putumayo), *Micrurus sangilensis*, de la región de Sutamarchán (Boyacá) y *Micrurus medemi*, proveniente de la región de Villavicencio (Meta). Estos venenos fueron provistos por el banco de venenos del serpentario del Instituto Nacional de Salud. La extracción de veneno se realizó de manera manual, e inmediatamente se preservó en nitrógeno líquido. Posteriormente se liofilizó y almacenó a temperaturas de $-40 \pm 5^{\circ}\text{C}$, De acuerdo a lo establecido por la OMS (WHO., 2017) y la Dirección de Producción del Instituto Nacional de Salud.

2.4.2 Animales

Se usaron ratas Wistar hembras de 5 a 8 semanas entre 230 y 270 gr de peso del provenientes del Bioterio del Departamento de Farmacia, de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

2.4.3 Evaluación de la capacidad neurotóxica en una preparación neuromuscular

La evaluación se hizo por medio de una preparación de nervio frénico y diafragma (Bulbring, 1946) de ratas hembras, de 5 a 8 semanas, entre 230 y 270 gr de peso. Haciendo una disección basada en el protocolo de Zanetti et al., 2018. El tejido fue sumergido en un baño de órgano de 15 ml con solución de Krebs compuesta por NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,49 mM, NaH₂PO₄ 0,42 mM, NaHCO 11,9 mM, y glucosa 11,1 mM, a 37°C, aireada con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) y con un pH entre 7,2 y 7,4. (Bedoya-Medina et al., 2019; Floriano et al., 2019; Harvey et al., 1994; Herrera et al., 2016; Hodgson, Wayne C., Wickramaratna, 2002; León et al., 2011; Taylor et al., 2016)

Cada tejido se dejó en un reposo de 20 min, con 5 lavados antes de generar un estímulo eléctrico. Para este último se usó un voltaje de 2v, con una duración del impulso de 1 ms a una frecuencia de 1 Hz, generando un pulso cada 120 segundos.

En estudios como el realizado por Floriano et al., 2019, se realizaron pruebas con veneno de *M. lemniscatus* de Altamira, Brasil. Usando concentraciones de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 µg/ml. Donde solo las concentraciones de 10 a 30 µg/ml lograron un bloqueo total en menos de 60 minutos. En estudios realizados en especies de serpientes de Colombia, como el ensayo de Renjifo et al., 2012. Se evaluaron concentraciones de 3, 10 y 50 µg/ml. En una de las dos especies evaluadas se logró una inhibición del 100% de la contracción, usando las concentraciones de 10 y 50 µg/ml. Pero esta inhibición solo se logró en un tiempo cercano a los 180 minutos. Para la otra especie, las concentraciones de 10 µg/ml lograron inhibiciones del 50% al minuto 180, en comparación con los controles. Basado en estos experimentos, se determinó usar concentraciones de 1 µg/ml, 10 µg/ml y 50 µg/m de veneno de cada especie, (n=3). Buscando lograr una inhibición de la contracción de un 100% o evaluar la respuesta de los venenos objeto de estudio, por un tiempo máximo de 120 minutos. La respuesta se registró con transductores de fuerza MLT0201, y se hizo un registró de las contracciones con el software LabChart Pro 8. Este estudio fue llevado a cabo en el laboratorio de Órgano aislado del grupo de Hacienda Galindo y Serpentario del INS.

2.4.4 Evaluación de la capacidad neutralizante del antiveneno anticoral polivalente en una preparación neuromuscular

El antiveneno anticoral polivalente (AAP) provisto por el INS, viene en presentación de caja con un vial por 10 ml, este contiene una solución inyectable de inmunoglobulina G (Ig G), purificada, proveniente de equinos inmunizados con venenos de serpientes del Género *Micrurus*, de las especies *M. dumerilii*, *M. isozonus*, *M. mipartitus*, y *M. surinamensis*. Su composición permite que cada 10 ml de antiveneno neutralicen como mínimo: 2mg del veneno de las especies *Micrurus dumerilii*, *Micrurus mipartitus*, *Micrurus isozonus*, y *Micrurus surinamensis*,(Castillo-Beltrán et al., 2018) (Anexo, Lamina 2).

Para este estudio se evaluó la capacidad de 1ml de Antiveneno con capacidad neutralizante de 0,2mg. Frente la concentración intermedia evaluada de 10 µg/ml (0,15 mg

en un total de 15 ml). Con una relación de miligramos frente a la capacidad neutralizante del antiveneno de 1:1,3. Esta preparación se incubó por un periodo de 30 minutos a 37°C, previa a la exposición del tejido bajo el mismo protocolo de estimulación eléctrica.

2.4.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el error estándar de la media (SEM), del número de experimentos independientes para cada muestra (n=3). Los cambios en la fuerza de tensión de las preparaciones neuromusculares fueron expresados en porcentaje, teniendo en cuenta el valor basal como valor cero y en comparación con los controles. Las comparaciones estadísticas se hicieron efectuando un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA). Seguidos del análisis de Tukey-Kramer, o una T-de Student, cuando se compararon dos tratamientos. Asumiendo una $p < 0.05$ como significancia estadística en todos los casos. El análisis se realizó con Graphpad Prism 9.2.0. (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Resultados

3.1 Evaluación de la capacidad neurotóxica del veneno de *Micrurus lemniscatus* y de la acción neutralizante del AAP.

El veneno de *M. lemniscatus* a dosis de 1, 10 y 50 µg/ml, causó bloqueos en las preparaciones neuromusculares dependientes de las concentraciones, con inhibición total de la capacidad contráctil en las concentraciones de 10 y 50 µg/ml, en menos de 40 minutos de muestreo. Las dosis de 1 µg/ml causó un bloqueo de la contracción restando hasta un 91,13% de inhibición en el minuto final o minuto 120 (tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de contracción presentes en el tejido y porcentajes de inhibición comparados con el control al minuto 60 y 120 de la prueba con veneno de *M. lemniscatus*.

	% Contracción Vs Control min 60	% Bloqueo Vs Control Min 60	% Contracción Vs Control Min 120	% Bloqueo Vs Control Min 120
ML 1 µg/ml	42,66	57,34	8,87	91,13
ML 10 µg/ml	0,00	100,00	0,00	100,00
ML 50 µg/ml	0,00	100,00	0,00	100,00
ML 10 µg/ml + 1 ml AAP	85,61	14,39	60,58	39,42

La capacidad neutralizante del antiveneno, se obtuvo por medio del montaje descrito en la metodología. Donde se le permitió al tejido una estabilización previa a la adición del veneno y el antiveneno incubados 30 minutos a 37°C. Se observó que la dosis de 10 µg/ml expuesta a un (1) ml de antiveneno (1:1,3), con capacidad neutralizante de 0.2 mg de veneno, no

tuvo un descenso tan marcado, en comparación con el tejido expuesto a la misma concentración de veneno en ausencia del antiveneno.

Este efecto neutralizante del antiveneno, mantuvo el 85,61% de la contracción en el tejido, en comparación con el control al minuto 60. Así mismo una neutralización del veneno al minuto 120, que permitió al tejido conservar el 60,58% de su capacidad contractil. Esto en comparación con el tejido expuesto a la misma dosis, pero sin presencia de antiveneno, cuya capacidad de contracción se redujo hasta el 0% antes de llegar al minuto 60 y por ende en el minuto 120, como lo muestra la Figura 1.

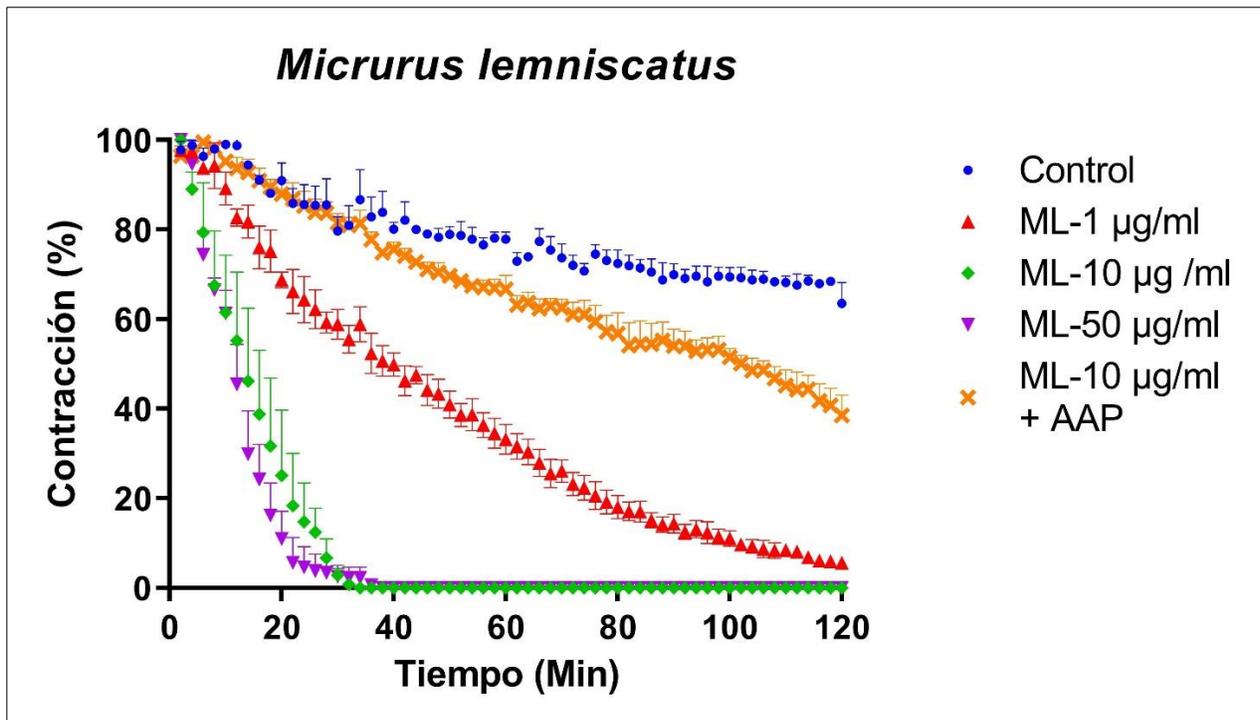


Fig. 1 Evaluación de la capacidad contráctil de la preparación neuromuscular frénico – diafragma de rata, en ausencia (control) y presencia de: (1) El veneno de la especie *M. lemniscatus*, 1, 10 y 50 µg/ml (ML) y (2) el veneno de la especie *M. lemniscatus* (10 µg/ml) más el antiveneno anticoral 1 ml (1:1,3) polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).

En la figura observamos las dosis de 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ con un comportamiento muy similar en el tiempo. Por otra parte, la curva de 1 $\mu\text{g/ml}$ se acerca a un 91,13% de la inhibición al minuto 120. A diferencia de la curva generada por la respuesta de incubación del antiveneno anticorral polivalente contra la dosis conocida de 10 $\mu\text{g/ml}$. Que en comparación de la curva original de $\mu\text{g/ml}$, no alcanza una inhibición del 100%. Adicional tiene una aproximación mayor a la curva control que la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$.

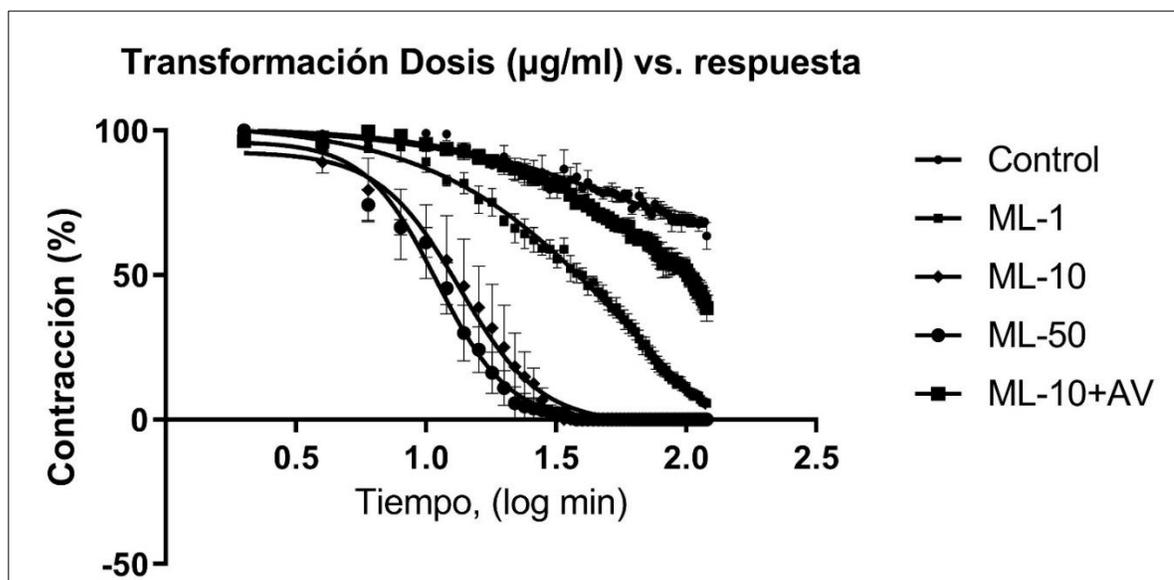


Fig. 2 Expresión logarítmica de la evaluación de la capacidad de contracción de la preparación neuromuscular, bajo el efecto del veneno de la especie *M. lemniscatus*, y bajo el efecto de la incubación del Antiveneno anticorral polivalente del INS con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ del veneno de la misma especie.

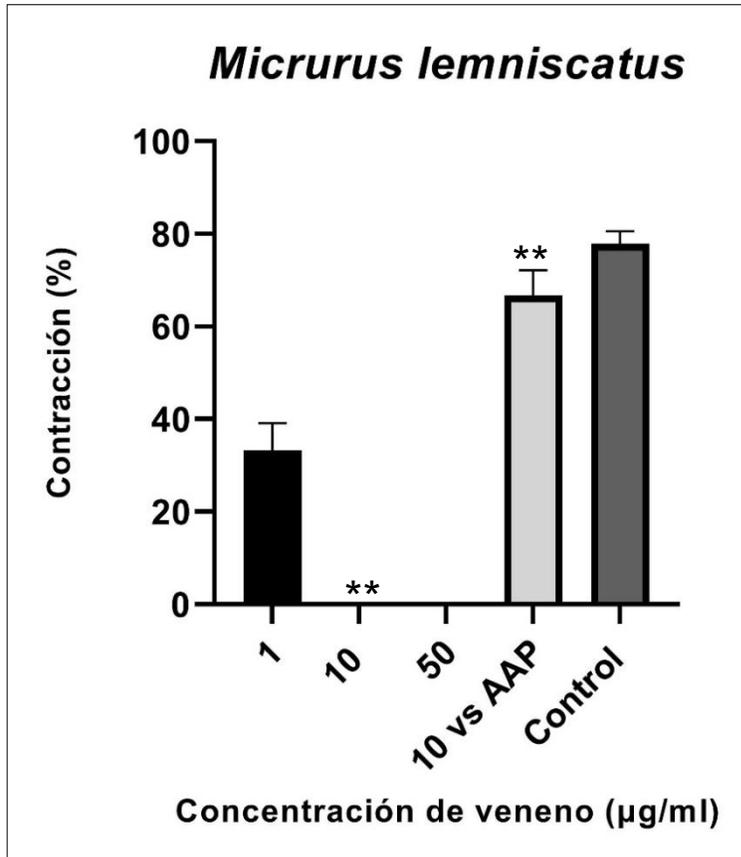


Fig. 3 Expresión de la capacidad de inhibición de la contracción, del veneno de *M. lemniscatus*, evaluada al minuto 60 de la prueba. ** En estas dos barras se puede comparar el efecto del veneno a una concentración de 10 µg/ml y el efecto neutralizante del Antiveneno Anticoral Polivalente (AAP). Incubado bajo la misma concentración de veneno. En la primera barra al minuto 60, ya había causado una inhibición de la contracción del 100%, mientras que en la segunda el músculo aún tiene más del 60% de su capacidad contráctil en presencia del antiveneno.

3.2 Evaluación de la capacidad neurotóxica del veneno de *Micrurus medemi* y de la acción neutralizante del AAP.

El veneno de *M. medemi*, causó bloqueos en las preparaciones neuromusculares dependientes de las concentraciones de 1, 10 y 50 µg/ml. Con una inhibición parcial en la concentración de 50 µg/ml, llegando a bloquear el 98,52% de la capacidad contráctil del tejido. La dosis de 10 µg/ml mostró un bloqueo de la contracción mostrando hasta un 56,74% de inhibición en el minuto 60 y restando hasta un 68,86% la capacidad contráctil en el minuto final o minuto 120 (tabla 1).

Tabla 2 Porcentajes de contracción presentes en el tejido y porcentajes de inhibición comparados con el control al minuto 60 y 120 de la prueba con veneno de *M. medemi*

	% Contracción Vs Control min 60	% Bloqueo Vs Control Min 60	% Contracción Vs Control Min 120	% Bloqueo Vs Control Min 120
MM 1 µg/ml	72,68	27,32	36,98	63,02
MM 10 µg/ml	43,26	56,74	31,14	68,86
ML 50 µg/ml	11,35	88,65	1,48	98,52
ML 10 µg/ml + 1 ml AAP	96,44	3,56	96,44	3,56

Se observó que la dosis de 10 µg/ml en presencia del antiveneno, no descendió en comparación con el tejido expuesto a la misma concentración de veneno en ausencia de antiveneno. El efecto neutralizante del antiveneno, le permitió a el tejido mantener el 96,44% de la contracción en comparación con el control al minuto 60. Así mismo una neutralización del veneno al minuto 120, que permitió al tejido conservar el mismo 96,44% de su capacidad contractil en comparación con el control.

El tejido expuesto a la dosis de 10µg/ml, y en ausencia del antiveneno, no logró mantener la capacidad contractil tan alta, esta se redujo en menos del 10% en el minuto 60 y continuo de esta manera hasta el minuto 120. (Fig 4)

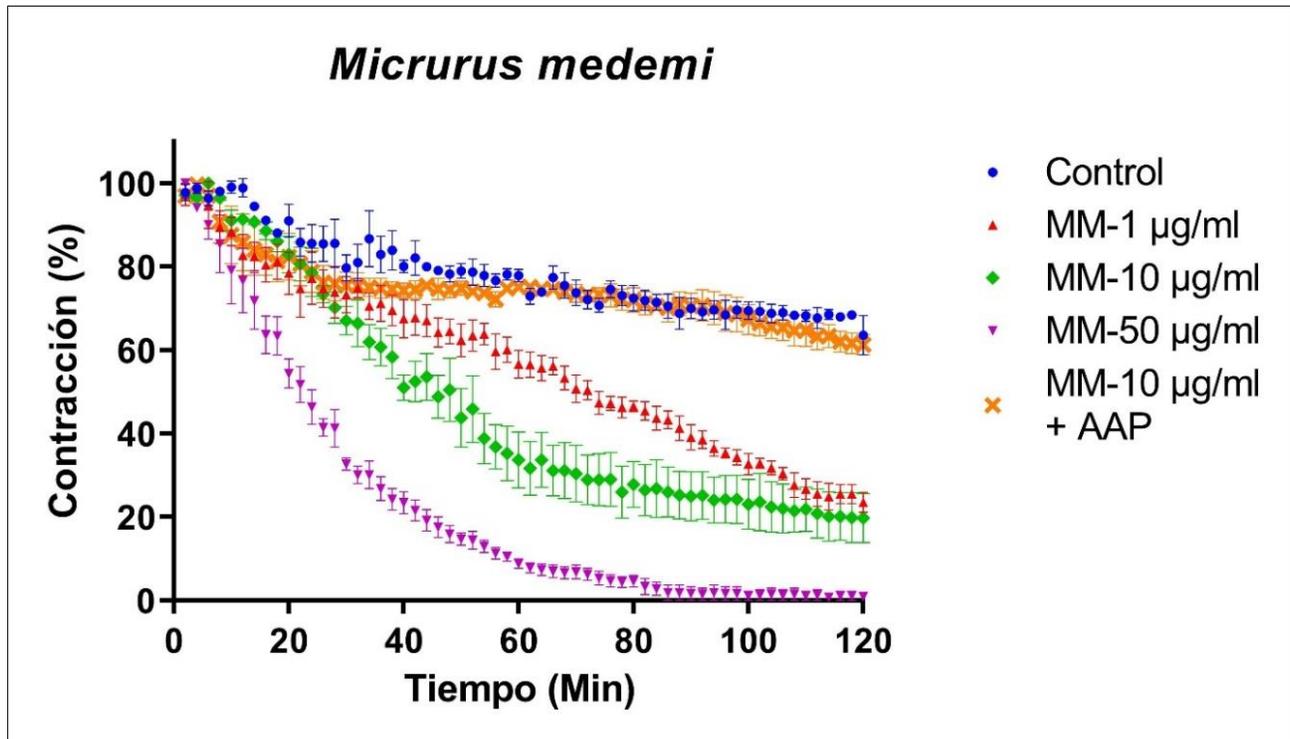


Fig. 4 Evaluación de la capacidad contráctil de la preparación neuromuscular frénico – diafragma de rata, en ausencia (control) y presencia de: (1) El veneno de la especie *M. medemi*, 1, 10 y 50 µg/ml (ML) y (2) el veneno de la especie *M. medemi* (10 µg/ml) más el antiveneno anticoral 1 ml (1:1,3) polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).

En la figura 4, también observamos que la respuesta de la máxima concentración de veneno, fue diferente a la curva generada por *M. lemniscatus* en la misma concentración. Para el caso de *M. medemi*, le tomó más tiempo llegar al 90% de la inhibición de la contracción. La respuesta de las dosis de 10 y 1 µg/ml también muestran un mayor efecto dependiente de concentración al minuto 60, donde 10 µg/ml inhibió más del 50% de la capacidad contráctil, a diferencia del veneno a una dosis de 1 µg/ml. Finalmente la curva de la preparación que contenía veneno y antiveneno, es bastante similar al control. Conservando el 96,44% de la contracción comparada con el control, para el minuto 60 y 120.

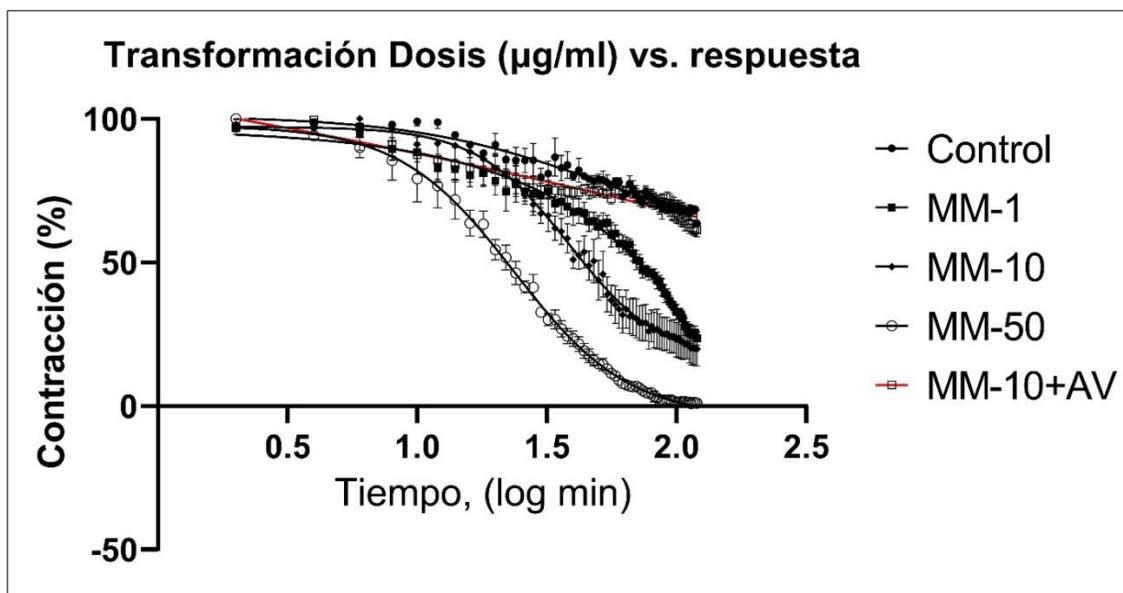


Fig. 5 Expresión logarítmica de la evaluación de la capacidad de contracción de la preparación neuromuscular, bajo el efecto del veneno de la especie *M. medemi*, y bajo el efecto de la incubación del Antiveneno anticorral polivalente del INS con una concentración de 10µg/ml del veneno de la misma especie.

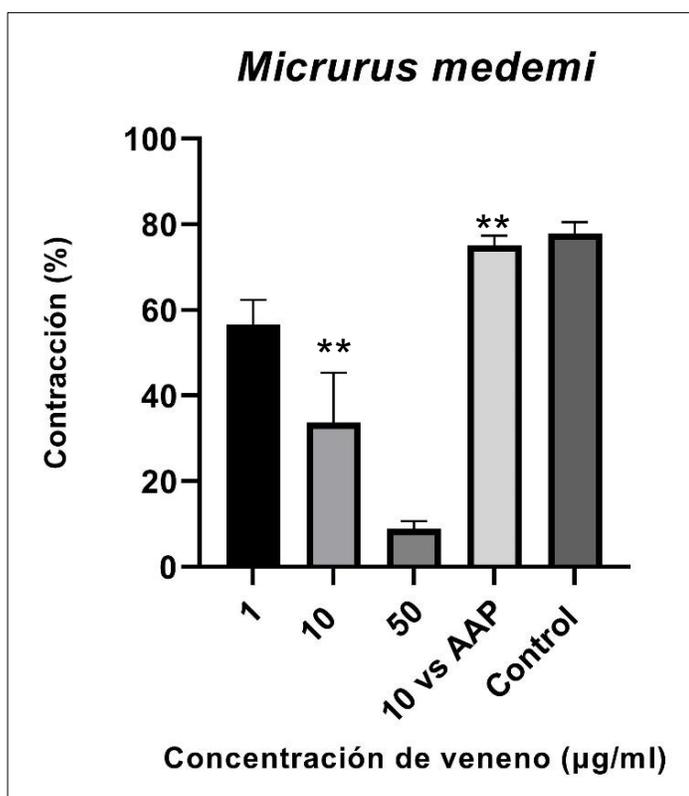


Fig. 6 Expresión de la capacidad de inhibición de la contracción, del veneno de *M. medemi*, evaluada al minuto 60 de la prueba. **En estas dos barras se puede comparar el efecto del veneno a una concentración de 10 µg/ml y el efecto neutralizante del Antiveneno Anticorral Polivalente (AAP) incubado bajo la misma concentración de veneno. En la primera barra al minuto 60 ya había causado una inhibición de la contracción permitiendo solo un 33,7% de la contracción, mientras que, en la segunda barra, el músculo aún tiene más del 70% de su capacidad contráctil en presencia del antiveneno.

3.3 Evaluación de la capacidad neurotóxica del veneno de *Micrurus sangilensis* y de la acción neutralizante del AAP.

El veneno de *M. sangilensis*, a dosis de 1, 10 y 50 µg/ml, causó bloqueos en las preparaciones neuromusculares dependientes de las concentraciones, con inhibición total de la capacidad contráctil en la concentración de 50 µg/ml, en menos de 60 minutos de muestreo. Las dosis de 1 µg/ml mostró un bloqueo de la contracción que disminuyó en un 34,85% la capacidad de contracción al minuto 60 y hasta un 67,65 al minuto 120.

Tabla 3 Porcentajes de contracción presentes en el tejido y porcentajes de inhibición comparados con el control al minuto 60 y 120 de la prueba con veneno de *M. sangilensis*.

	% Contracción Vs Control min 60	% Bloqueo Vs Control Min 60	% Contracción Vs Control Min 120	% Bloqueo Vs Control Min 120
MS 1 µg/ml	65,15	34,85	32,35	67,65
MS 10 µg/ml	59,61	40,39	20,19	79,81
MS 50 µg/ml	0,00	100,00	0,00	100,00
MS 10 µg/ml + 1 ml AAP	92,44	7,56	77,01	22,99

Se observó que la dosis de 10 µg/ml expuesta a un (1) ml de antiveneno (1:1,3), con capacidad neutralizante de 0,2 mg de veneno, no descendió en comparación con el tejido expuesto a la misma concentración de veneno en ausencia de antiveneno. El efecto neutralizante del antiveneno, le permitió a el tejido mantener el 92,44% de la contracción en comparación con el control al minuto 60. Así mismo, una neutralización del veneno conservó el 77% de la capacidad contractil al minuto 120, en comparación con el tejido expuesto a la misma dosis. Que en ausencia del antiveneno, solo conservó el 59,61% de capacidad contractil al minuto 60 y apenas un 20,19% al minuto 120. (Tabla 3).

En la figura 7 observamos que solo la dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ logra una inhibición completa de la contracción y poco antes del minuto 60. A su vez se observa que las dosis de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ tienen un comportamiento similar. Igualmente, la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ incubada con Antiveneno Anticoral Polivalente. Que demuestra una línea muy cercana al control.

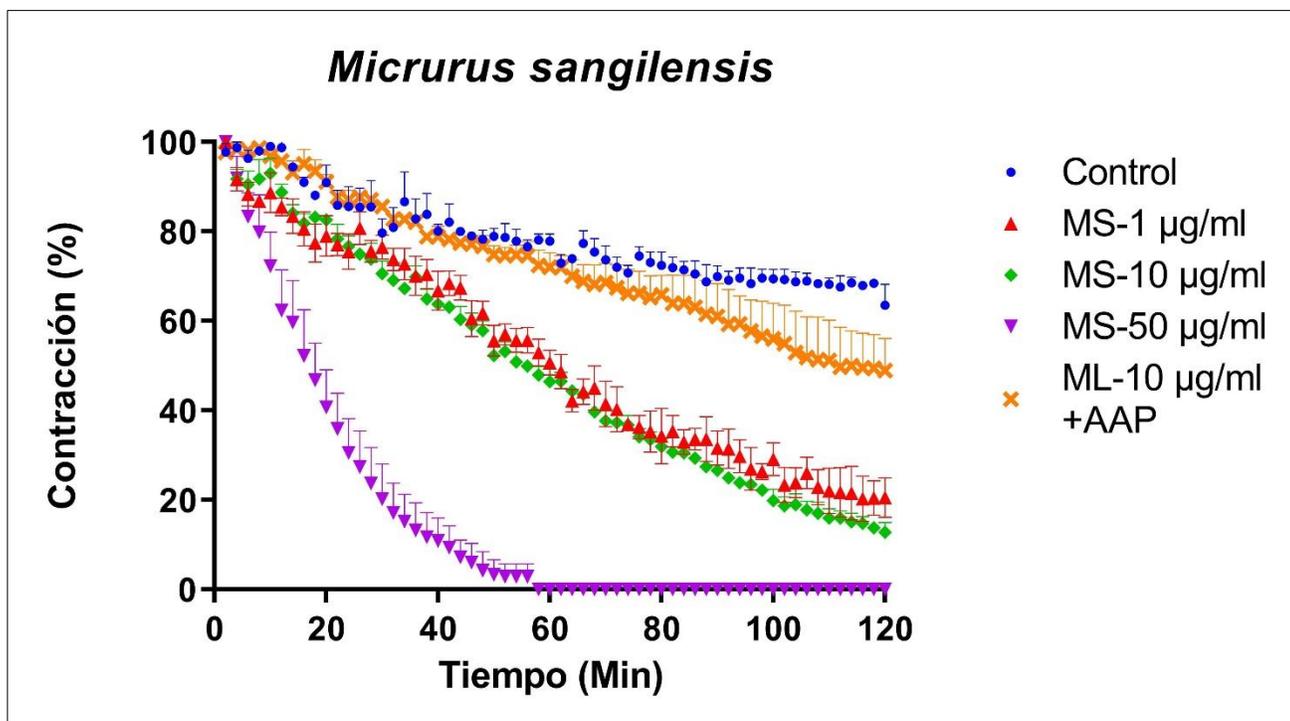


Fig. 7 Evaluación de la capacidad contráctil de la preparación neuromuscular frénico – diafragma de rata, en ausencia (control) y presencia de: (1) El veneno de la especie *M. sangilensis*, 1, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ (ML) y (2) el veneno de la especie *M. sangilensis* (10 $\mu\text{g/ml}$) más el antiveneno anticoral 1 ml (1:1,3) polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).

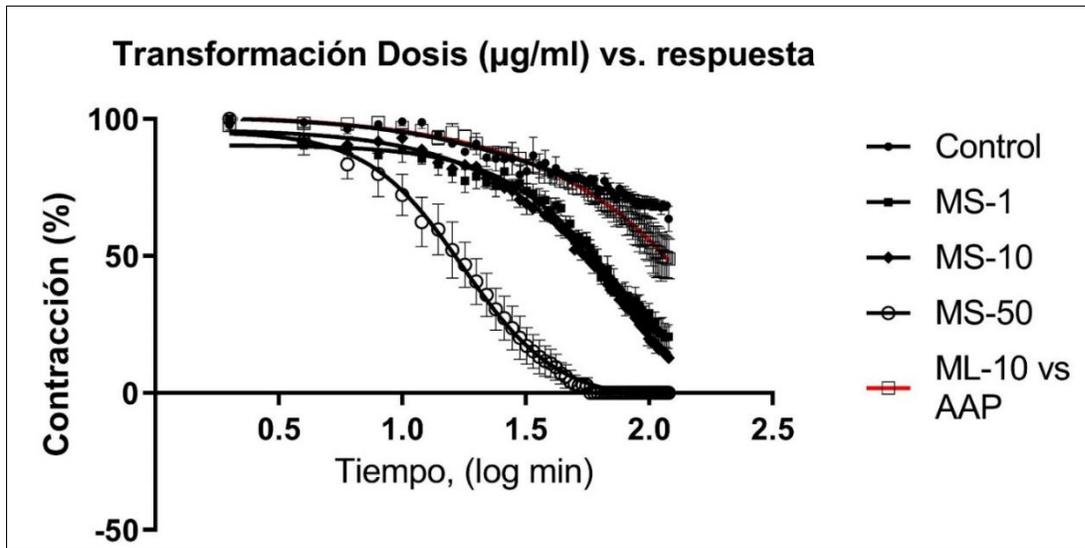


Fig. 8 Expresión logarítmica de la evaluación de la capacidad de contracción de la preparación neuromuscular, bajo el efecto del veneno de la especie *M. sangilensis*, y bajo el efecto de la incubación del Antiveneno anticoral polivalente del INS con una concentración de 10µg/ml del veneno de la misma especie.

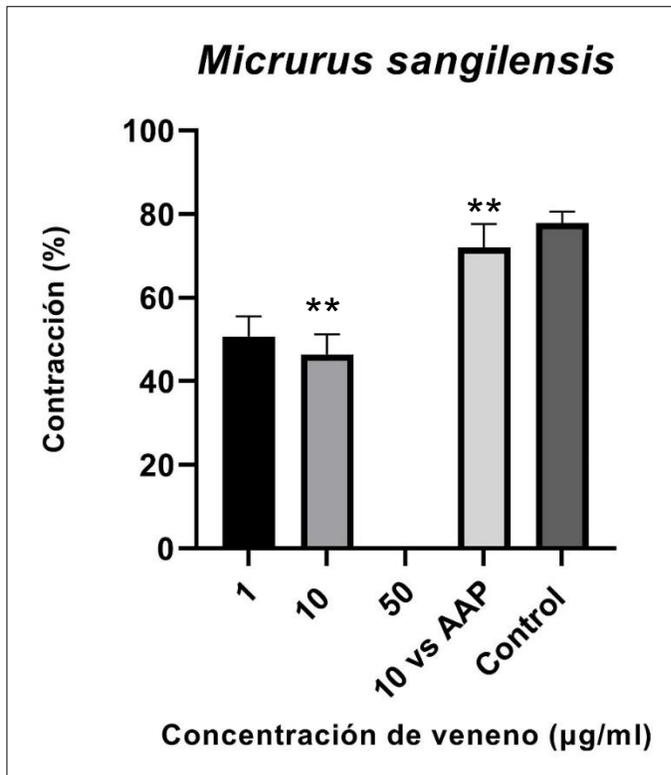


Fig. 9 Expresión de la capacidad de inhibición de la contracción, del veneno de *M. sangilensis*, evaluada al minuto 60 de la prueba. **En estas dos barras se puede comparar el efecto del veneno a una concentración de 10 µg/ml y el efecto neutralizante del Antiveneno Anticoral Polivalente (AAP) incubado bajo la misma concentración de veneno. En la primera barra al minuto 60, el efecto del veneno solo permitió una capacidad de contracción del 46%, mientras que en la segunda el músculo aún tiene más del 75% de su capacidad contráctil en presencia del antiveneno.

3.4 T₅₀

EL valor de T₅₀ corresponde al intervalo de tiempo en el que la contracción baja al 50% de la inhibición total de la contracción. Todos los resultados se obtuvieron en condiciones ex vivo bajo un protocolo operativo estandarizado, donde se esperaba un bloqueo neuromuscular por parte de los venenos de las serpientes del género *Micrurus*. Algunos venenos lograron inhibiciones del 100% de la contracción en el periodo de 120 minutos. El veneno de *Micrurus lemniscatus* logró una inhibición total, a una concentración de 10 µg/ml al minuto 32 ± 2 minuto (n=3). Permitiendo calcular una T₅₀ (Fig. 10), para esa concentración, de 16 minutos ± 1 minuto. De igual manera, causó un bloqueo total al minuto $27,3 \pm 9,2$ minutos, a una concentración de 50 µg/ml (n=3) permitiendo calcular una T₅₀, para esa concentración, de 16 minutos ± 1 minuto. El veneno de *Micrurus medemi* logró una inhibición total, a una concentración de 50 µg/ml al minuto $96 \pm 20,8$ minuto. (n=3). Permitiendo calcular una T₅₀, para esa concentración, de 48 minutos $\pm 10,44$ minuto. A su vez, El veneno de *Micrurus sangilensis* logró una inhibición total, a una concentración de 50 µg/ml al minuto $50,6 \pm 6,4$ minuto. (n=3). Permitiendo calcular una T₅₀, para esa concentración, de 25,3 minutos $\pm 3,21$ minutos. (Fig. 10).

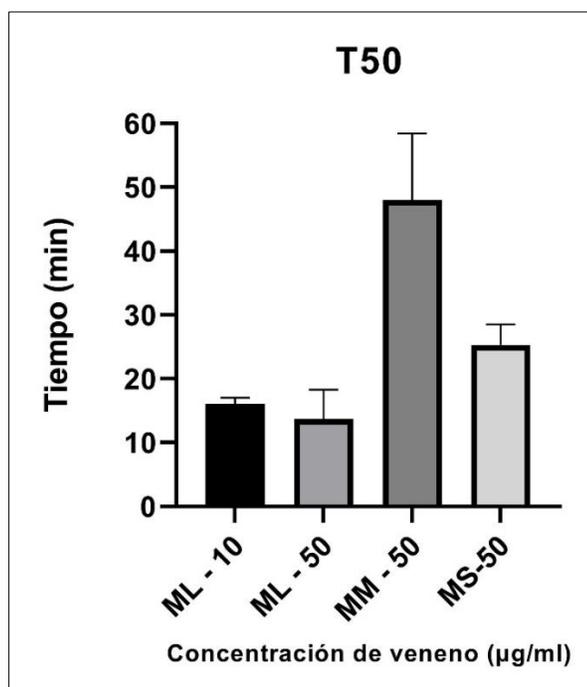


Fig. 10 Comparación de los T₅₀ (intervalo de tiempo en el que la contracción baja al 50% en causar una inhibición total de la contracción) calculado para las especies *Micrurus lemniscatus* (ML) a 10 y 50 µg/ml, de la especie *Micrurus medemi* (MM) y *Micrurus sangilensis* (MS) a 50 µg/ml.

Se puede observar que el veneno de la especie *M. lemniscatus*, logró un bloqueo neuromuscular 3,5 veces más rápido en comparación con *M. medemi* y 1,8 veces más rápido en comparación con *M. sangilensis*, a una concentración de (50 µg/ml). Incluso a menores concentraciones (10 µg/ml), logró un bloqueo 3 veces más rápido que *M. medemi* y 1,5 veces más rápido que *M. sangilensis*.

4. Discusión

El envenenamiento por serpientes de coral resulta en un bloqueo progresivo de la placa neuromuscular dependiente de la dosis, como lo indican los resultados de este estudio. En comparación con otras especies de coral latinoamericanas, el antiveneno anticoral polivalente, logró un factor protector en una relación muy cercana a 1 (1:1,3).

Otros estudios en corales de Latinoamérica, debieron elevar 20 veces la dosis recomendada para lograr el efecto neutralizante como el estudio de De Abreu et al., 2008, con la especie *Micrurus altirostris*. Esto destaca la capacidad neutralizante el antiveneno anticoral del INS.

El uso de suero antiofídico es la terapia definitiva para el tratamiento del envenenamiento sistémico por serpientes de coral. Una administración temprana es importante para prevenir la inhibición de la contracción muscular. La capacidad de revertir este efecto es considerablemente menos efectiva una vez el bloqueo neuromuscular ha sido establecido, como lo menciona Bucarechi et al., 2016. Por lo cual, el Gold Estándar de la prueba es la pre incubación. Sin embargo, en caso de tener veneno suficiente disponible para diferentes pruebas, resulta útil adicionar el antiveneno, una vez se ha logrado el bloqueo. Evaluar este esquema es más representativo de un caso clínico; donde primero ocurre el envenenamiento. Por otro lado, estudios como Floriano et al., 2019 demuestran que la pre incubación permiten detectar la capacidad neutralizante. En ese estudio se demostró que el antiveneno del Instituto Butantan, de Brasil, necesito una dosis 10 veces más alta de la recomendada en el inserto, para neutralizar el veneno de *Micrurus lemniscatus*. Demostrando una capacidad neutralizante mayor para el antiveneno del INS respecto a la misma especie. Esto basado también, en la capacidad neutralizante de ese antiveneno (1ml neutraliza 1.5 mg de veneno de *M. frontalis*).

Mayor disponibilidad de veneno también permite conducir otro tipo de pruebas en este modelo, por ejemplo, es posible evaluar la contractibilidad muscular, aplicando estimulación eléctrica en presencia de Acetilcolina y el veneno en estudio. Esto para determinar si existen efectos sobre la respuesta postsináptica a la ACh. Cuando no hay

alteración en la contractibilidad muscular, el efecto se consideraría pre sináptico. (Bolívar-Barbosa & Rodríguez-Vargas, 2020; Crachi et al., 1999; Su et al., 1983)

Esta técnica de Órgano aislado resulta un complemento importante para las pruebas de DL50, a pesar de disminuir el uso de animales para las pruebas, su complejidad y requerimientos de equipos de baño de órgano especializado, aun no la convierte en una prueba que pueda reemplazar las dosis letales 50.

Para los venenos que causan efectos neurotóxicos en los pacientes, es importante determinar otros parámetros como la DL50 o la velocidad de inhibición de la contracción, por medio de una T50. En estudios como el de Renjifo et al., 2012, no se logró hallar la DL50 en una especie (*M. dissoleucus*), aun usando dosis altas de 50 µmg/ml en la preparación. Pero para la especie de *M. mipartitus* se logró una T50 de 48,2 ± 5,7 minutos a una dosis de 10 µg/ml, reportado como una T50 baja en comparación con otras corales. La presente investigación reportó una T50 de 32 ± 2 minutos a la misma concentración de 10 µg/ml. Lo cual refleja las DL50 reportadas para ambas especies en el estudio de Castillo-Beltrán et al., 2018. Donde son 33,62 µg/ratón para *M. mipartitus* y de 22,87 µg/ratón para *M. lemniscatus*, siendo esta última especie más letal.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La composición de los venenos de serpientes de coral, y de los venenos evaluados en este proyecto, contienen enzimas y proteínas que cumplen un efecto neurotóxico capaz de bloquear la respuesta en la placa neuromotora como lo demostró este ensayo, y la capacidad de este bloqueo es dependiente de la dosis, demostrando un patrón y una escala que conserva las proporciones de las dosis con los tiempos de descenso de las curvas

Las diferencias entre las especies, permiten observar diferentes velocidades de acción. Siendo el veneno de *M. lemniscatus*, el más rápido en inhibir la capacidad contráctil. Seguido del veneno de las especies *M. sangilensis* y finalmente *M. medemi*. Sin embargo, estos bloqueos fueron neutralizados efectivamente por el AAP del INS, con una dosis de neutralización muy cercana a la especificada en el inserto para otras especies (1:1,3). Demostrando una mejor respuesta para la especie de *M. Medemi*, seguida de *M. sangilensis* y finalmente *M. lemniscatus*. Obedeciendo a la letalidad de los mismos. Estos hallazgos sugieren que no es necesario agregar estos venenos al pool de fabricación del antiveneno.

5.2 Recomendaciones

La replicación de la técnica de órgano aislado y preparación neuromuscular, no es tan masiva como las pruebas de letalidad in vivo, estas últimas siguen siendo confiables para determinar los efectos neurotóxicos de los venenos y la capacidad de neutralización de los antivenenos. Aunque la OMS las recomienda, los montajes en órgano aislado requieren equipos costosos, convirtiéndola en técnicas más avanzadas y difíciles de replicar para los laboratorios productores de antivenenos. Por lo cual se debe asegurar primero el personal idóneo y los equipos de laboratorio necesarios para llevar esta prueba a cabo. (WHO, 2016)

Pero que una vez dominados, representan grandes ventajas para evaluar las diferentes respuestas del músculo estriado en presencia de toxinas y antídotos, e incluso permitiendo evaluar efectos de posibles tratamientos directamente. (Floriano et al., 2020b)

6. Financiamiento

En el marco de lo descrito, el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias) aprobó el proyecto 2104777-58348, actual Contrato 686 de 2018 COLCIENCIAS-INS: “*Caracterización bioquímica y biológica del veneno de las corales colombianas *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lenmiscatus* y su neutralización con el antiveneno anticoral polivalente producido por el INS*” que permitió el desarrollo y culminación de este proyecto de tesis.

7. Bibliografía

- Barber, C. M., Isbister, G. K., & Hodgson, W. C. (2013). Alpha neurotoxins. *Toxicon*, *66*, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.019>
- Bedoya-Medina, J., Mendivil-Perez, M., Rey-Suarez, P., Jimenez-Del-Rio, M., Núñez, V., & Velez-Pardo, C. (2019). L-amino acid oxidase isolated from *Micrurus mipartitus* snake venom (MipLAAO) specifically induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells mostly via oxidative stress-dependent signaling mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 1052–1062. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.174>
- Bolívar-Barbosa, J. A., & Rodríguez-Vargas, A. L. (2020). Neurotoxic activity of micrurus snake venom and methods for its analysis. A literature review. *Revista Facultad de Medicina*, *68*(3), 453–462. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v68n3.75992>
- Bucarety, F., De Capitani, E. M., Vieira, R. J., Rodrigues, C. K., Zannin, M., Da Silva, N. J., Casais-E-Silva, L. L., & Hyslop, S. (2016). Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: A review of literature reports. *Clinical Toxicology*, *54*(3), 222–234. <https://doi.org/10.3109/15563650.2015.1135337>
- BULBRING, E. (1946). Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, *1*, 38–61. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1946.tb00025.x>
- Camargo, T. M., de Roodt, A. R., da Cruz-Höfling, M. A., & Rodrigues-Simioni, L. (2011). The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrhocryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms. *Journal of Venom Research*, *2*, 24–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858249> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3132105>
- Campbell, J. A., Lamar, W. W. (2004). The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. In *Wilderness & Environmental Medicine* ((Vol. 1, N, Vol. 1). [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2005\)16\[e13a:br\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2005)16[e13a:br]2.0.co;2)
- Castillo-Beltrán, M. C., Hurtado-Gómez, J. P., Corredor-Espinel, V., & Ruiz-Gómez, F. J. (2018). A polyvalent coral snake antivenom with broad neutralization capacity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007250>
- Chacón, D., Rodríguez, S., Arias, J., Solano, G., Bonilla, F., & Gómez, A. (2012). Maintaining Coral Snakes (*Micrurus nigrocinctus*, Serpentes: Elapidae) for venom production on an alternative fish-based diet. *Toxicon*, *60*(3), 249–253.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.332>

- Chippaux, J. P. (2017). Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1), 1–2. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>
- Ciscotto, P. H. C., Rates, B., Silva, D. A. F., Richardson, M., Silva, L. P., Andrade, H., Donato, M. F., Cotta, G. A., Maria, W. S., Rodrigues, R. J., Sanchez, E., De Lima, M. E., & Pimenta, A. M. C. (2011). Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1810–1825. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.07.011>
- Crachi, M. T., Hammer, L. W., & Hodgson, W. C. (1999). A pharmacological examination of venom from the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *Toxicon*, 37(12), 1721–1734. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00114-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00114-2)
- De Abreu, V. A., Leite, G. B., Oliveira, C. B., Hyslop, S., Furtado, M. D. F. D., & Simioni, L. R. (2008). Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. *Clinical Toxicology*, 46(6), 519–527. <https://doi.org/10.1080/15563650701647405>
- Durban, J., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2018). Venom gland transcriptomics and microRNA profiling of juvenile and adult yellow-bellied sea snake, *Hydrophis platurus*, from Playa del Coco (Guanacaste, Costa Rica). *Toxicon*, 153(August), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.08.016>
- Dutertre, S., Nicke, A., & Tsetlin, V. I. (2017). Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms. *Neuropharmacology*, 127, 196–223. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.011>
- Floriano, R. S., Schezaro-Ramos, R., Silva, N. J., Bucarechi, F., Rowan, E. G., & Hyslop, S. (2019). Neurotoxicity of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (South American coralsnake) venom in vertebrate neuromuscular preparations in vitro and neutralization by antivenom. *Archives of Toxicology*, 93(7), 2065–2086. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02476-9>
- Floriano, R. S., Torres-Bonilla, K. A., Rojas-Moscoso, J. A., Dias, L., Rocha, T., Silva, N. J., Hyslop, S., & Rowan, E. G. (2020a). Cardiovascular activity of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (South American coralsnake) venom. *Toxicon*, 186(August), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.019>
- Floriano, R. S., Torres-Bonilla, K. A., Rojas-Moscoso, J. A., Dias, L., Rocha, T., Silva, N. J., Hyslop, S., & Rowan, E. G. (2020b). Cardiovascular activity of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (South American coralsnake) venom. *Toxicon*, 186(August), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.019>
- GANGULY, D. K., NATH, D. N., ROSS, H. -G, & VEDASIROMONI, J. R. (1978). Rat Isolated Phrenic Nerve-Diaphragm Preparation for Pharmacological Study of Muscle Spindle Afferent Activity: Effect of Oxotremorine. *British Journal of Pharmacology*, 64(1), 47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb08639.x>
- GINSBORG, B. L., & WARRINER, J. (1960). the Isolated Chick Biventer Cervicis Nerve-

- Muscle Preparation. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 15(3), 410–411. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1960.tb01264.x>
- Gómez-Betancur, I., Gogineni, V., Salazar-Ospina, A., & León, F. (2019). Perspective on the therapeutics of anti-snake venom. *Molecules*, 24(18), 1–29. <https://doi.org/10.3390/molecules24183276>
- Gopalakrishnakone, P., Inagaki, H., Vogel, C., Mukherjee, A. K., & Rahmy, T. R. (2017). *Snake Venoms*.
- Goularte, F. C., Cruz-Höfling, M. A., Cogo, J. C., Gutiérrez, J. M., & Rodrigues-Simioni, L. (1995). The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon*, 33(5), 679–689. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00178-B](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00178-B)
- Gutiérrez, J. M. (2018). Antivenoms: Life-saving drugs for envenomings by animal bites and stings. *Toxicon*, 150(May), 11–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.003>
- Gutiérrez, J. M., Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, Á., Vargas, M., Villalta, M., Sánchez, A., Sanz, L., Lomonte, B., León, G., & Calvete, J. J. (2017). Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. *Toxins*, 9(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/toxins9050163>
- Harris, R. J., Youngman, N. J., Zdenek, C. N., Huynh, T. M., Nouwens, A., Hodgson, W. C., Harrich, D., Dunstan, N., Portes-Junior, J. A., & Fry, B. G. (2020). Assessing the binding of venoms from aquatic elapids to the nicotinic acetylcholine receptor orthosteric site of different prey models. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21197377>
- Harvey, A. L., Harvey, A. L., Barfaraz, A., Thomson, E., Faiz, A., Preston, S., & Venoms, R. (1994). Screening of Snake Venoms for Neurotoxic and Myotoxic Effects Using Simple in Vitro Preparations From Rodents and Chicks. *Toxicon*, 32(3), 257–265.
- Herrera, M., Cássia, R. De, Collaço, D. O., Villalta, M., Segura, Á., Vargas, M., Wright, C. E., Paiva, O. K., Matainaho, T., Jensen, S. D., León, G., Williams, D. J., Rodrigues-simioni, L., & María, J. (2016). Neutralization of the neuromuscular inhibition of venom and taipoxin from the taipan (*Oxyuranus scutellatus*) by Fab2 and whole IgG antivenoms. *Toxicology Letters*, 241, 175–183.
- Hodgson, Wayne C., Wickramaratna, J. C. (2002). Animal Toxins of Asia and Australia: IN VITRO NEUROMUSCULAR ACTIVITY OF SNAKE VENOMS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29, 807–814.
- Jorge Da Silva, N., & D. Aird, S. (2001). Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. In *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* (Vol. 128, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(00\)00215-5](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(00)00215-5)
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., De Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. G., & De Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*, 5(11), 1591–1604.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Kini, R. M. (2011). Evolution of three-finger toxins - A versatile mini protein scaffold. *Acta Chimica Slovenica*, 58(4), 693–701.
- Kopper, R. A., Harper, G. R., Zimmerman, S., & Hook, J. (2013). Comparison of total protein and phospholipase A2 levels in individual coral snake venoms. *Toxicon*, 76, 59–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.011>
- León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, Á., Estrada, R., & Gutiérrez, J. M. (2011). Immune response towards snake venoms. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 10(5), 381–398. <https://doi.org/10.2174/187152811797200605>
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Fernández, J., Sasa, M., Pla, D., Vargas, N., Bénard-Valle, M., Sanz, L., Corrêa-Netto, C., Núñez, V., Alape-Girón, A., Alagón, A., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2016). Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*, 122, 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.008>
- Mendes, G. F., Stuginski, D. R., Loibel, S. M. C., Morais-Zani, K. De, Da Rocha, M. M. T., Fernandes, W., Sant'anna, S. S., & Grego, K. F. (2019). Factors that can influence the survival rates of coral snakes (*Micrurus corallinus*) for antivenom production. *Journal of Animal Science*, 97(2), 972–980. <https://doi.org/10.1093/jas/sky467>
- Moraes, F. V., Sousa-e-Silva, M. C. C., Barbaro, K. C., Leitão, M. A., & Furtado, M. F. D. (2003). Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, 41(1), 71–79. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00211-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00211-8)
- Nirthanan, S., & Gwee, M. C. E. (2004). Three-Finger α -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(1), 1–17. <https://doi.org/10.1254/jphs.94.1>
- Renjifo, C., Smith, E. N., Hodgson, W. C., Renjifo, J. M., Sanchez, A., Acosta, R., Maldonado, J. H., & Riveros, A. (2012a). Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: An evolutionary perspective. *Toxicon*, 59(1), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.017>
- Renjifo, C., Smith, E. N., Hodgson, W. C., Renjifo, J. M., Sanchez, A., Acosta, R., Maldonado, J. H., & Riveros, A. (2012b). Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: An evolutionary perspective. *Toxicon*, 59(1), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.017>
- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Fernández, J., & Lomonte, B. (2016). Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. *Journal of Proteomics*, 136, 262–273. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.006>
- Rey-Suárez, P., Saldarriaga-Córdoba, M., Torres, U., Marin-Villa, M., Lomonte, B., & Núñez, V. (2019). Novel three-finger toxins from *Micrurus dumerilii* and *Micrurus*

- mipartitus coral snake venoms: Phylogenetic relationships and characterization of Clarkitoxin-I-Mdum. *Toxicon*, 170(July), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.017>
- Rojas Bárcenas, A. M. (2018). Accidente ofídico en Colombia. *Informes de Evento*, 1(1), 33. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ACCIDENTE_OFIDICO_2018.pdf
- Rossan, A., Da Silva, B. P., Yamagushi, I. K., Morais, J. F., Higashi, H. G., Raw, I., Ho, P. L., & Silveira de Oliveira, J. (2001). Cross reactivity of different specific Micrurus antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. *Toxicon*, 39(7), 949–953. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00233-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00233-6)
- Silva, A., Kuruppu, S., Othman, I., Goode, R. J. A., Hodgson, W. C., & Isbister, G. K. (2017). Neurotoxicity in Sri Lankan Russell's Viper (*Daboia russelii*) Envenoming is Primarily due to U1-viperitoxin-Dr1a, a Pre-Synaptic Neurotoxin. *Neurotoxicity Research*, 31(1), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9650-4>
- Smith, C. M. (1963). Neuromuscular Pharmacology: Drugs and Muscle Spindles. *Annual Review of Pharmacology*, 3(1), 223–242. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.03.040163.001255>
- Smith, I. (1972). *Energetics of activation infrog and toad muscle*. 583–599.
- Souza, J. De, Oshima-franco, Y., & Freitas, N. P. De. (2020). *A preparação nervo frênico-diafragma (camundongos / ratos) e a técnica miográfica como ferramenta farmacológica*.
- Su, M. J., Coulter, A. R., Sutherland, S. K., & Chang, C. C. (1983). The presynaptic neuromuscular blocking effect and phospholipase A2 activity of textilotoxin, a potent toxin isolated from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis*. *Toxicon*, 21(1), 143–151. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90057-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90057-0)
- Tanaka, G. D., Furtado, M. D. F. D., Portaro, F. C. V., Sant'Anna, O. A., & Tambourgi, D. V. (2010). Diversity of Micrurus snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000622>
- Taylor, P., Salazar, E., Barrios, M., Salazar, A. M., Abad, M. J., Urdanibia, I., Shealy, D., Arocha-Piñango, C. L., & Guerrero, B. (2016). Role of the inflammatory response in the hemorrhagic syndrome induced by the hemolymph of the caterpillar *Lonomia achelous*. *Toxicon*, 121, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.018>
- Urdaneta, A. H., Bolaños, F., & Gutiérrez, J. M. (2004). Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 138(4), 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.08.018>
- Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
- WHALER, B. C. (1978). Venoms: Chemistry and Molecular Biology. *Biochemical Society*

Transactions, 6(2), 474–476. <https://doi.org/10.1042/bst0060474>

WHO. (2017). Annex 5. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series. *World Health Organization Technical Report Series, No. 964*, 197–388.

WHO. (1981). *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms*.

WHO. (2016). *Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins*. October, 89.

Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrell, D. A., White, J., Winkel, K. D., & Gopalakrishnakone, P. (2010). The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 89–91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61159-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61159-4)

Zanetti, G., Negro, S., Pirazzini, M., & Caccin, P. (2018). Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN). *Bio-Protocol*, 8(5), 1–12. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2759>

8. Anexos.

Tabla 4. Datos expresados en porcentaje de los resultados obtenidos en el DathaPad del Programa Labchart Pro 8 para los ensayos de *Micrurus medemi*.

Tie mpo	Control			MM-1			MM-10			MM-50			MM-10+AV		
2	99, 45	100	93, 9	100	91, 82	10 0	99, 2	97, 67	94, 41	10 0	10 0	10 0	94, 02	98, 41	98, 44
4	10 0	100	96, 25	98, 46	10 0	97, 09	99, 2	97	93, 61	93, 38	94, 72	94, 35	10 0	98, 94	10 0
6	97, 25	99, 02	92, 97	103 ,09	83, 93	97, 09	10 0	10 0	10 0	92, 28	94, 72	83, 05	95, 82	10 0	95, 33
8	98, 35	99, 02	96, 72	87, 66	83, 64	97, 09	96, 38	98, 67	94, 41	96, 69	86, 97	72, 88	80, 87	98, 41	93
10	96, 15	100 ,98	100	84, 57	85, 39	95, 16	89, 53	96	87, 61	93, 02	79, 58	64, 97	74, 29	97, 34	91, 05
11	96, 15	97, 06	103 ,28	84, 57	73, 41	90, 31	89, 53	93	91, 61	90, 07	76, 76	63, 28	72, 49	94, 69	90, 27
12	93, 4	94, 12	95, 78	76, 47	82, 47	88, 38	89, 12	91, 33	91, 61	83, 46	72, 18	59, 89	71, 9	90, 97	89, 11
14	89	92, 16	92, 03	74, 54	78, 38	88, 38	84, 29	91	90, 41	66, 54	69, 72	54, 8	73, 09	89, 38	86, 38
16	86, 8	88, 24	89, 21	81, 48	73, 7	88, 38	81, 07	88, 33	88, 81	71, 32	63, 38	55, 37	71, 9	88, 31	83, 66
18	84, 59	90, 2	98, 12	78, 01	69, 9	87, 41	74, 62	84	90, 01	58, 82	57, 04	47, 46	71, 3	86, 72	89, 11
20	81, 84	83, 33	92, 5	75, 31	62, 6	86, 44	73, 01	82	86, 81	58, 46	53, 17	43, 5	70, 1	85, 66	85, 99
22	78, 54	84, 31	93, 9	79, 94	65, 23	86, 44	68, 18	79, 67	88, 01	53, 68	45, 77	39, 55	68, 91	83	84, 44

24	80, 19	82, 35	93, 9	72, 23	68, 44	83, 53	69, 79	76, 67	73, 63	44, 12	42, 96	37, 29	68, 31	81, 41	78, 99
26	79, 09	80, 39	97, 19	75, 7	62, 31	83, 53	62, 94	72	75, 62	50	38, 73	35, 03	67, 71	80, 88	79, 38
28	75, 79	77, 45	85, 93	73, 77	65, 52	80, 63	60, 92	67, 33	72, 83	29, 78	33, 8	34, 46	69, 51	80, 34	76, 65
30	75, 79	77, 45	89, 68	70, 68	75, 16	78, 69	56, 9	66	76, 42	26, 47	33, 8	29, 94	69, 51	80, 34	76, 27
32	79, 64	80, 39	100	69, 14	65, 81	76, 75	54, 88	61, 33	69, 63	24, 26	35, 56	30, 51	71, 9	79, 28	73, 93
34	79, 64	77, 45	91, 56	71, 07	63, 77	78, 69	53, 67	59, 33	69, 23	22, 43	32, 04	25, 99	72, 49	79, 81	72, 37
36	81, 29	77, 45	92, 97	66, 83	64, 94	76, 75	50, 45	56, 67	68, 03	19, 49	28, 52	24, 86	73, 09	78, 22	72, 37
38	80, 19	77, 45	82, 65	62, 97	62, 89	76, 75	45, 21	55, 67	52, 05	18, 38	27, 46	24, 29	73, 69	77, 69	71, 6
40	79, 64	76, 47	90, 15	68, 37	60, 26	74, 82	42, 8	56, 33	58, 44	16, 91	25, 7	22, 03	74, 29	78, 22	70, 82
42	81, 29	78, 43	80, 3	66, 83	60, 55	73, 85	42, 39	60	58, 44	14, 71	23, 59	19, 21	74, 29	78, 75	73, 54
44	80, 74	78, 43	77, 96	62, 2	59, 39	70, 94	38, 77	51, 67	56, 04	12, 87	21, 13	18, 64	74, 29	79, 28	70, 43
46	79, 09	74, 51	81, 24	63, 74	59, 68	69, 97	35, 55	55, 33	60, 44	12, 5	19, 37	15, 82	73, 69	78, 22	71, 6
48	80, 19	75, 49	81, 24	60, 65	56, 46	69, 97	29, 91	51, 33	50, 05	11, 76	16, 55	15, 82	73, 09	78, 22	73, 15
50	81, 84	72, 55	81, 71	60, 65	58, 8	70, 94	30, 31	50	57, 24	10, 66	17, 96	14, 69	73, 69	76, 09	72, 37
52	80, 74	72, 55	80, 3	61, 81	60, 85	69	27, 09	47, 67	41, 66	9,9 3	14, 79	14, 12	73, 09	75, 56	72, 37
54	77, 99	73, 53	78, 43	56, 41	54, 42	68, 03	26, 28	41	43, 25	8,4 6	13, 03	12, 43	73, 69	74, 5	68, 48
56	79, 09	75, 49	79, 83	57, 57	56, 46	66, 1	22, 25	42, 33	41, 26	8,4 6	10, 56	12, 43	74, 89	76, 09	73, 15

58	77, 44	75, 49	80, 77	52, 55	54, 13	63, 19	20, 24	40	40, 86	6,9 9	8,8	10, 73	75, 48	77, 16	72, 76
60	76, 34	69, 61	72, 8	55, 25	52, 08	62, 22	19, 03	36, 33	39, 66	6,6 2	6,6 9	10, 17	76, 08	77, 16	71, 99
62	74, 14	72, 55	75, 15	55, 25	50, 62	61, 25	20, 64	41, 67	38, 86	5,8 8	5,9 9	10, 17	75, 48	76, 63	71, 99
64	77, 44	72, 55	82, 18	56, 8	52, 37	59, 32	19, 03	36, 33	38, 06	5,5 1	5,2 8	10, 17	76, 68	75, 03	72, 37
66	76, 89	69, 61	79, 83	52, 94	48, 57	58, 35	17, 82	36, 67	38, 86	4,7 8	5,6 3	9,6	76, 08	74, 5	71, 21
68	77, 44	67, 65	76, 08	48, 7	46, 24	57, 38	17, 01	35	39, 26	4,4 1	5,9 9	10, 17	77, 28	73, 44	70, 04
70	75, 24	67, 65	73, 27	50, 24	46, 53	54, 47	17, 42	31, 67	37, 66	4,0 4	5,6 3	9,0 4	76, 08	73, 44	70, 43
72	74, 14	68, 63	69, 52	46, 38	43, 02	52, 54	17, 01	31, 67	38, 06	2,9 4	4,5 8	8,4 7	76, 68	71, 84	71, 21
74	77, 44	70, 59	75, 61	45, 22	45, 94	50, 6	16, 61	32, 33	38, 06	2,2 1	4,5 8	7,3 4	78, 47	71, 84	68, 87
76	76, 89	68, 63	73, 74	46	42, 15	50, 6	14, 6	27, 33	36, 06	2,2 1	4,2 3	6,7 8	77, 28	70, 25	68, 87
78	76, 89	66, 67	73, 74	46, 77	44, 19	48, 66	17, 42	29, 67	36, 46	2,5 7	3,8 7	7,3 4	77, 88	69, 72	68, 48
80	75, 79	67, 65	72, 33	44, 45	42, 15	49, 63	15, 4	27	36, 86	0	3,1 7	6,7 8	76, 68	67, 59	69, 26
82	75, 24	69, 61	69, 52	43, 68	38, 64	48, 66	15, 4	25, 67	39, 26	0	2,8 2	5,6 5	73, 69	68, 66	69, 26
84	76, 34	67, 65	67, 64	43, 68	39, 52	46, 72	16, 21	25	36, 86	0	0	5,6 5	76, 68	67, 06	66, 54
86	74, 69	61, 77	69, 99	40, 98	36, 3	46, 72	15, 4	25	35, 26	0	0	5,6 5	76, 68	67, 59	68, 87
88	74, 69	67, 65	67, 64	38, 28	34, 26	44, 79	15	24, 67	35, 26	0	0	5,0 8	76, 68	66, 53	68, 48
90	73, 04	66, 67	67, 64	40, 6	34, 26	40, 91	16, 21	23, 67	35, 66	0	0	4,5 2	77, 88	64, 94	69, 26

92	74, 14	67, 65	67, 17	39, 82	33, 38	36, 07	15	23	34, 06	0	0	5,6 5	77, 88	64, 94	67, 32
94	75, 24	63, 73	66, 23	37, 51	33, 38	35, 1	15	23	34, 86	0	0	5,0 8	77, 28	62, 81	66, 54
96	73, 59	67, 65	67, 64	37, 12	30, 75	35, 1	15, 4	22	35, 26	0	0	5,0 8	76, 68	62, 81	66, 15
98	73, 59	66, 67	68, 11	34, 42	27, 54	36, 07	13, 39	21, 67	34, 06	0	0	3,3 9	74, 29	62, 28	65, 37
100	73, 59	65, 69	68, 58	34, 04	30, 46	34, 13	13, 39	20, 67	36, 86	0	0	3,9 5	72, 49	62, 28	64, 59
102	73, 04	65, 69	67, 64	33, 65	28, 41	33, 16	12, 99	20, 67	33, 66	0	0	4,5 2	71, 3	61, 75	63, 81
104	72, 49	66, 67	67, 64	32, 49	27, 54	31, 23	12, 99	20	33, 26	0	0	3,9 5	71, 3	60, 69	64, 2
108	69, 74	67, 65	67, 64	33, 65	24, 91	24, 45	13, 79	19, 33	31, 27	0	0	4,5 2	71, 9	60, 16	61, 87
110	70, 84	67, 65	66, 23	31, 72	24, 03	24, 45	13, 79	19, 67	32, 06	0	0	3,3 9	71, 9	59, 09	63, 04
112	71, 39	68, 63	62, 95	31, 34	23, 74	21, 54	12, 18	18, 33	32, 06	0	0	3,9 5	69, 51	58, 56	61, 87
114	70, 84	66, 67	68, 11	31, 34	22, 86	20, 57	10, 97	18	31, 27	0	0	2,2 6	68, 91	60, 16	61, 09
116	67, 54	68, 63	67, 64	30, 18	22, 86	23, 48	12, 18	17	31, 27	0	0	3,3 9	67, 11	59, 09	59, 92
118	68, 64	69, 61	67, 17	30, 18	22, 86	23, 48	10, 97	17, 33	31, 27	0	0	3,3 9	66, 52	58, 56	59, 92
120	54, 33	69, 61	66, 7	28, 25	21, 69	20, 57	11, 78	16, 33	31, 27	0	0	2,8 2	65, 92	58, 03	59, 92

Tabla 5 Datos expresados en porcentaje de los resultados obtenidos en el DathaPad del Programa Labchart Pro 8 para los ensayos de *Micrurus lemniscatus*.

Tiempo	ML-1			ML-10			ML-50			ML-10+AV		
2	100	95,94	97,21	100	100	100	100	100	100	100	97,08	92,17
4	95,82	100,02	96,27	85,93	84,62	96,62	99,58	100	84,38	92,2	99,03	98,16
6	91,64	96,35	93,45	61,23	77,69	99,32	80,02	63,6	79,38	98,51	100	100
8	84,12	98,8	100,03	51,76	59,23	91,55	68,36	61,2	70	98,14	100	96,77
10	83,28	95,94	88,29	40,85	58,85	84,8	68,36	51,2	64,38	96,66	96,1	93,09
11	79,94	86,56	81,71	34,24	46,16	85,14	53,8	27,6	55	95,54	96,59	88,94
12	77,43	89,01	78,9	23,62	37,31	77,7	26,32	15,2	48,13	89,6	98,54	90,32
14	67,4	83,71	77,02	17,87	32,69	65,88	22,16	11,6	38,75	87	96,1	89,86
16	65,72	80,44	79,37	12,13	21,54	61,49	9,67	8,4	30,63	86,26	92,2	89,86
18	65,31	71,47	69,5	7,82	13,46	54,06	3,84	6	23,13	83,66	94,15	86,18
20	58,62	75,55	64,34	2,65	11,16	41,22	0	0	16,88	80,69	93,18	86,64
22	58,2	74,73	60,11	7,53	4,62	32,1	0	0	13,75	82,54	91,72	81,57
24	54,86	69,84	61,99	3,8	11,16	22,3	0	0	11,25	80,69	89,77	81,11
26	54,86	62,91	60,11	0,64	4,62	14,87	0	0	10	85,51	86,84	78,8
28	52,35	63,31	61,05	3,51	0	5,07	0	0	7,5	83,29	83,92	77,42
30	52,77	61,68	52,13	0	0	2,37	0	0	6,88	84,03	81	77,88
32	56,53	66,58	53,54	0	0	0	0	0	6,88	87	80,51	76,5
34	46,91	61,27	48,84	0	0	0	0	0	1,88	81,06	76,61	75,58
36	45,66	57,2	49,31	0	0	0	0	0	0	75,86	74,18	74,66
38	45,66	54,75	49,31	0	0	0	0	0	0	78,46	72,71	75,58
40	45,66	52,3	40,86	0	0	0	0	0	0	75,49	70,77	76,04
42	45,66	51,49	45,55	0	0	0	0	0	0	74,74	70,28	73,27
44	40,23	51,08	41,33	0	0	0	0	0	0	74	68,33	70,97

46	40,2 3	49,85	39,92	0	0	0	0	0	0	73,6 3	66,3 8	71,4 3
48	37,7 2	47	38,04	0	0	0	0	0	0	71,7 7	67,3 6	70,0 5
50	36,8 8	43,74	35,22	0	0	0	0	0	0	71,0 3	67,3 6	67,2 8
52	36,0 5	45,78	34,28	0	0	0	0	0	0	68,8	66,3 8	67,2 8
54	32,2 8	41,7	35,22	0	0	0	0	0	0	69,1 7	63,9 4	68,2
56	31,8 7	41,29	30,53	0	0	0	0	0	0	69,1 7	62,9 7	68,6 6
58	28,1	39,66	31,94	0	0	0	0	0	0	71,7 7	61,0 2	67,2 8
60	28,1	37,21	29,59	0	0	0	0	0	0	65,0 9	59,0 7	65,4 4
62	28,9 4	35,99	26,3	0	0	0	0	0	0	66,2	59,0 7	65,9
64	27,2 7	33,54	23,01	0	0	0	0	0	0	61,7 4	59,0 7	66,3 6
66	22,6 7	31,91	22,07	0	0	0	0	0	0	64,7 2	59,5 6	64,5 2
68	26,4 3	30,28	21,6	0	0	0	0	0	0	65,8 3	59,0 7	62,6 7
70	23,0 9	27,83	18,79	0	0	0	0	0	0	64,3 4	55,6 6	63,1 3
72	21,8 3	27,42	17,85	0	0	0	0	0	0	64,7 2	54,6 9	63,6
74	21	25,79	15,03	0	0	0	0	0	0	64,3 4	52,2 5	61,7 5
76	20,1 6	23,34	14,09	0	0	0	0	0	0	61	49,8 1	60,8 3
78	18,9 1	22,12	13,15	0	0	0	0	0	0	62,1 2	47,3 8	60,8 3
80	17,6 5	20,49	13,15	0	0	0	0	0	0	58,0 3	43,9 7	60,3 7
82	17,6 5	20,9	12,68	0	0	0	0	0	0	61,7 4	44,4 5	57,1 4
84	16,4	17,23	11,74	0	0	0	0	0	0	59,8 9	45,4 3	58,0 7
86	16,8 2	14,78	10,8	0	0	0	0	0	0	62,1 2	47,8 7	55,7 6
88	17,2 4	15,6	10,33	0	0	0	0	0	0	59,8 9	46,8 9	55,3
90	15,1 5	13,15	9,39	0	0	0	0	0	0	59,1 4	47,3 8	55,3
92	16,4	13,15	9,86	0	0	0	0	0	0	57,2 9	48,8 4	52,5 4
94	16,4	12,74	7,99	0	0	0	0	0	0	58,4	49,3 3	51,6 1
96	14,3 1	11,52	8,46	0	0	0	0	0	0	59,1 4	49,8 1	50,6 9
98	14,3 1	10,7	7,99	0	0	0	0	0	0	55,4 3	49,8 1	49,3 1

100	12,2 2	9,48	7,52	0	0	0	0	0	0	53,5 7	49,3 3	47,4 7
102	12,2 2	8,66	7,05	0	0	0	0	0	0	53,5 7	47,8 7	44,2 4
104	11,8	9,07	5,17	0	0	0	0	0	0	52,8 3	46,8 9	46,0 8
108	11,3 8	8,66	5,17	0	0	0	0	0	0	52,0 9	44,9 4	43,3 2
110	9,71	9,48	6,11	0	0	0	0	0	0	52,0 9	42,9 9	40,5 5
112	9,29	9,48	5,64	0	0	0	0	0	0	52,0 9	41,5 3	39,1 7
114	8,46	7,03	5,17	0	0	0	0	0	0	49,8 6	43,9 7	39,1 7
116	8,04	6,21	4,23	0	0	0	0	0	0	48,3 7	42,0 2	35,0 2
118	6,37	6,21	5,17	0	0	0	0	0	0	47,2 6	41,0 4	34,1
120	5,95	5,81	5,17	0	0	0	0	0	0	46,5 2	38,1 2	30,8 8

Tabla 6 . Datos expresados en porcentaje de los resultados obtenidos en el DathaPad del Programa Labchart Pro 8 para los ensayos de *Micrurus sangilensis*.

Tiem p min	Control			MS-1			MS-10			MS-50			ML-10+AV		
2	99, 4 5	10 0	93, 9	10 0	10 0	10 0	10 0	10 0,0 2	10 0	10 0	10 0	10 0	98, 8 2	95, 0 3	99, 2 9
4	10 0	10 0	96, 25	86, 7 4	95, 7 5	92, 5 9	87, 4	94, 58	93, 2 4	82, 2 3	94, 9 4	98, 6	98, 8 2	10 0	96, 4 3
6	97, 2 5	99, 02	92, 97	83, 1 7	92, 0 3	89, 9 5	84, 6 2	92, 88	94, 1 4	75, 9 1	80, 5 5	93, 7 2	10 0	98, 7 6	95, 7 2
8	98, 3 5	99, 02	96, 72	84, 4 5	88, 8 4	87, 3	83, 8 6	92, 88	98, 6 5	70, 3 8	72, 7 6	96, 5 1	10 0	97, 5 2	98, 5 7
10	96, 1 5	10 0,9 8	10 0	81, 3 9	87, 7 8	96, 8 3	87, 4	92, 54	99, 1	64, 0 7	65, 3 7	87, 4 3	98, 8 2	95, 0 3	96, 7 9
12	96, 1 5	97, 06	10 3,2 8	81, 6 4	88, 3 1	86, 7 7	85, 9 1	92, 2	88, 2 9	51, 4 3	55, 2 5	80, 4 5	96, 4 5	94, 4 1	96, 4 3
14	93, 4	94, 12	95, 78	75, 7 8	87, 2 5	87, 3	80, 2 7	86, 41	85, 5 9	51, 8 2	49, 0 3	78, 3 6	97, 0 4	88, 2	94, 2 9
16	89	92, 16	92, 03	73, 2 3	86, 1 9	82, 5 4	77, 7 1	82, 67	85, 1 4	41, 5 6	42, 4 1	72, 7 7	96, 4 5	88, 8 2	10 0
18	86, 8	88, 24	89, 21	70, 4 3	85, 1 3	76, 7 2	81, 8 1	85, 73	81, 9 8	41, 5 6	35, 8	63	94, 6 8	88, 8 2	97, 1 5

20	84, ,5 9	90, 2	98, 12	71, ,4 5	87, ,2 5	78, ,3 1	80, ,5 2	84, 37	82, ,8 8	34, ,4 5	30, ,3 5	57, ,4 1	91, ,1 3	88, ,2	93, ,9 3
22	81, ,8 4	83, 33	92, 5	73, ,7 4	81, ,9 4	75, ,6 6	76, ,1 7	84, 71	74, ,3 3	27, ,7 4	28, ,0 2	51, ,8 3	88, ,7 6	87, ,5 8	86, ,8
24	78, ,5 4	84, 31	93, 9	69, ,6 6	83	74, ,0 8	78, ,4 7	79, 61	72, ,0 7	25, ,7 6	20, ,2 4	45, ,5 4	90, ,5 3	83, ,2 3	87, ,5 1
26	80, ,1 9	82, 35	93, 9	83, ,1 7	85, ,6 6	73, ,5 5	75, ,1 4	77, 23	72, ,5 2	23, ,7 9	15, ,5 7	42, ,7 5	89, ,9 4	85, ,7 2	87, ,5 1
28	79, ,0 9	80, 39	97, 19	74	80, ,3 4	72, ,4 9	75, ,1 4	79, 27	67, ,1 2	19, ,0 5	12, ,8 4	39, ,2 6	88, ,1 7	85, ,7 2	87, ,5 1
30	75, ,7 9	77, 45	85, 93	77, ,8 2	80, ,3 4	71, ,4 3	68, ,4 8	76, 21	67, ,1 2	14, ,3 1	10, ,5 1	35, ,7 7	85, ,2 1	84, ,4 7	87, ,1 5
32	75, ,7 9	77, 45	89, 68	72, ,2 1	78, ,7 5	70, ,3 7	70, ,7 9	74, 85	61, ,7 1	12, ,7 3	8, 56	30, ,1 9	83, ,4 3	81, ,3 7	83, ,5 9
34	79, ,6 4	80, 39	10 0	72, ,9 8	78, ,7 5	66, ,6 7	66, ,6 9	69, 06	66, ,2 2	9, 97	8, 17	27, ,3 9	83, ,4 3	81, ,9 9	82, ,8 7
36	79, ,6 4	77, 45	91, 56	71, ,9 6	76, ,6 3	61, ,9 1	74, ,6 3	68, 72	66, ,2 2	9, 18	5, 06	25, ,3	82, ,2 5	81, ,9 9	82, ,1 6
38	81, ,2 9	77, 45	92, 97	66, ,6	77, ,1 6	67, ,7 3	65, ,4 1	68, 72	60, ,8 1	7, 99	4, 67	22, ,5 1	76, ,9 2	81, ,3 7	78, ,2 3
40	80, ,1 9	77, 45	82, 65	62, ,7 8	75, ,5 6	61, ,9 1	62, ,5 9	65, 32	63, ,5 1	6, 41	5, 06	21, ,1 1	74, ,5 6	79, ,5 5	82, ,5 1

42	79 ,6 4	76, 47	90, 15	64 ,8 2	73 ,9 7	66 ,6 7	65 ,1 5	63, 96	60 ,3 6	4, 83	4, 28	19 ,0 2	76 ,3 3	79 ,5	78 ,9 5
44	81 ,2 9	78, 43	80, 3	70 ,1 7	70 ,2 5	61 ,9 1	60 ,0 2	65, 66	55 ,4 1	4, 04	2, 73	14 ,8 3	75 ,1 5	78 ,8 8	78 ,2 3
46	80 ,7 4	78, 43	77, 96	56 ,4	68 ,6 6	56 ,6 2	59 ,2 6	63, 62	54 ,5 1	4, 04	0	14 ,1 3	73 ,9 7	79 ,5	78 ,2 3
48	79 ,0 9	74, 51	81, 24	65 ,8 4	62 ,8 1	56 ,6 2	57 ,9 7	61, 58	54 ,0 6	0	0	12 ,7 3	72 ,1 9	80 ,1 3	77 ,8 8
50	80 ,1 9	75, 49	81, 24	50 ,5 4	62 ,2 8	53 ,9 7	51 ,0 6	53, 07	52 ,7	0	0	9, 94	71 ,0 1	77 ,6 4	76 ,0 9
52	81 ,8 4	72, 55	81, 71	56 ,9 1	61 ,2 2	52 ,9 1	50 ,8	57, 5	51 ,3 5	0	0	8, 54	71 ,0 1	76 ,4	76 ,4 5
54	80 ,7 4	72, 55	80, 3	58 ,7	58 ,0 3	50 ,2 7	48 ,4 9	55, 46	48 ,6 5	0	0	8, 54	70 ,4 2	76 ,4	77 ,5 2
56	77 ,9 9	73, 53	78, 43	59 ,9 7	56 ,9 7	50 ,2 7	50 ,0 3	50, 69	49 ,1	0	0	8, 54	68 ,6 4	76 ,4	78 ,9 5
58	79 ,0 9	75, 49	79, 83	57 ,4 2	54 ,3 1	47 ,0 9	44 ,3 9	50, 35	49 ,1	0	0	0, 17	66 ,2 7	73 ,2 9	77 ,8 8
60	77 ,4 4	75, 49	80, 77	56 ,1 5	49	47 ,0 9	49 ,0 1	49, 33	40 ,9 9	0	0	0	65 ,6 8	73 ,9 1	76 ,4 5
62	76 ,3 4	69, 61	72, 8	56 ,4	44 ,2 2	45 ,5	45 ,9 3	50, 35	43 ,2 4	0	0	0	66 ,8 7	73 ,2 9	75 ,7 3

64	74 ,1 4	72, 55	75, 15	46 ,9 7	38 ,3 8	41 ,2 7	44 ,3 9	46, 95	41 ,8 9	0	0	0	62 ,7 2	72 ,6 7	74 ,6 6
66	77 ,4 4	72, 55	82, 18	49 ,7 8	40 ,5	42 ,3 3	43 ,6 2	45, 25	41 ,8 9	0	0	0	62 ,1 3	69 ,5 7	75 ,0 2
68	76 ,8 9	69, 61	79, 83	54 ,8 7	39 ,4 4	40 ,7 4	41 ,3 2	39, 47	38 ,2 9	0	0	0	60 ,3 6	68 ,9 5	75 ,3 8
70	77 ,4 4	67, 65	76, 08	51 ,5 6	35 ,7 2	37 ,0 4	41 ,5 7	37, 42	34 ,2 4	0	0	0	61 ,5 4	68 ,3 2	76 ,0 9
72	75 ,2 4	67, 65	73, 27	50 ,2 9	34 ,1 3	36 ,5 1	39 ,5 2	36, 4	36 ,0 4	0	0	0	58 ,5 8	67 ,7	76 ,0 9
74	74 ,1 4	68, 63	69, 52	38 ,5 6	35 ,1 9	37 ,0 4	40 ,2 9	37, 08	32 ,8 8	0	0	0	56 ,8 1	66 ,4 6	75 ,3 8
76	77 ,4 4	70, 59	75, 61	41 ,3 6	33 ,0 6	34 ,3 9	36 ,9 6	34, 7	30 ,6 3	0	0	0	58 ,5 8	64 ,6	75 ,3 8
78	76 ,8 9	68, 63	73, 74	43 ,1 5	27 ,2 2	35 ,4 5	33 ,6 3	36, 4	30 ,6 3	0	0	0	58 ,5 8	62 ,7 3	74 ,6 6
80	76 ,8 9	66, 67	73, 74	46 ,4 6	26 ,1 6	30 ,1 6	33 ,3 7	34, 02	28 ,3 8	0	0	0	59 ,1 7	64 ,6	73 ,9 5
82	75 ,7 9	67, 65	72, 33	42 ,3 8	31 ,4 7	32 ,2 8	31 ,0 7	32, 66	28 ,3 8	0	0	0	52 ,6 6	64 ,6	74 ,6 6
84	75 ,2 4	69, 61	69, 52	38 ,3	29 ,3 4	31 ,2 2	31 ,5 8	31, 3	28 ,8 3	0	0	0	55 ,6 2	60 ,2 5	76 ,0 9

86	76 ,3 4	67, 65	67, 64	38 ,3	29 ,8 8	32 ,8 1	29 ,0 2	30, 28	28 ,8 3	0	0	0	52 ,0 7	60 ,8 7	76 ,4 5
88	74 ,6 9	61, 77	69, 99	43 ,4	26 ,6 9	30 ,6 9	27 ,9 9	28, 58	25 ,6 8	0	0	0	51 ,4 8	57 ,1 4	76 ,0 9
90	74 ,6 9	67, 65	67, 64	36 ,0 1	24 ,0 3	34 ,9 2	26 ,9 7	27, 22	25 ,6 8	0	0	0	50 ,3	57 ,7 7	75 ,0 2
92	73 ,0 4	66, 67	67, 64	40 ,0 9	25 ,6 3	28 ,5 7	24 ,4	24, 84	25 ,6 8	0	0	0	49 ,7 1	53 ,4 2	74 ,6 6
94	74 ,1 4	67, 65	67, 17	36 ,7 7	24 ,5 6	28 ,0 4	24 ,4	25, 18	22 ,0 7	0	0	0	50 ,8 9	55 ,9	71 ,4 5
96	75 ,2 4	63, 73	66, 23	34 ,7 3	18 ,1 9	28 ,0 4	23 ,1 2	24, 84	22 ,5 2	0	0	0	49 ,1 1	52 ,8	71 ,4 5
98	73 ,5 9	67, 65	67, 64	29 ,1 2	22 ,9 7	26 ,9 9	23 ,1 2	24, 16	19 ,3 7	0	0	0	47 ,3 4	50 ,3 1	72 ,1 7
100	73 ,5 9	66, 67	68, 11	36 ,2 6	24 ,0 3	26 ,9 9	20 ,0 5	24, 16	15 ,3 2	0	0	0	47 ,9 3	48 ,4 5	71 ,8 1
102	73 ,5 9	65, 69	68, 58	28 ,1	15 ,5 3	26 ,4 6	18 ,7 7	22, 12	15 ,3 2	0	0	0	46 ,7 5	45 ,9 6	72 ,1 7
104	73 ,0 4	65, 69	67, 64	27 ,5 9	17 ,1 3	26 ,9 9	17 ,2 3	23, 82	15 ,7 7	0	0	0	42 ,0 1	45 ,3 4	71 ,4 5
106	72 ,4 9	66, 67	67, 64	31 ,9 3	19 ,7 8	26 ,4 6	16 ,7 2	21, 43	15 ,3 2	0	0	0	41 ,4 2	44 ,1	70 ,0 3

108	69 ,7 4	67, 65	67, 64	28 ,1	15	25 ,4	14 ,9 2	22, 12	13 ,9 7	0	0	0	44 ,9 7	39 ,1 3	70 ,0 3
110	70 ,8 4	67, 65	66, 23	29 ,8 9	12 ,3 4	23 ,8 1	13 ,9	20, 07	13 ,9 7	0	0	0	44 ,3 8	40 ,3 7	68 ,9 5
112	71 ,3 9	68, 63	62, 95	30 ,1 4	11 ,2 8	23 ,8 1	15 ,1 8	19, 05	13 ,5 2	0	0	0	45 ,5 6	36 ,6 5	66 ,8 1
114	70 ,8 4	66, 67	68, 11	30 ,6 5	10 ,2 2	23 ,8 1	15 ,1 8	18, 37	11 ,7 1	0	0	0	43 ,7 9	41	65 ,3 9
116	67 ,5 4	68, 63	67, 64	26 ,8 3	10 ,2 2	23 ,8 1	14 ,1 5	17, 69	12 ,6 1	0	0	0	43 ,2	40 ,3 7	65 ,0 3
118	68 ,6 4	69, 61	67, 17	25 ,3	12 ,8 8	23 ,2 8	12 ,1	16, 67	12 ,6 1	0	0	0	43 ,7 9	40 ,3 7	64 ,3 2
120	54 ,3 3	69, 61	66, 7	26 ,0 7	11 ,8 1	23 ,8 1	12 ,3 6	16, 67	9, 46	0	0	0	43 ,2	40 ,3 7	63 ,2 5

Tabla 7 Graph Pad Analisis estadístico *Micrurus lemniscatus* (2way Anova).

ANOVA Results (2way Anova) – <i>Micrurus lemniscatus</i>					
Table Analyzed	Dose vs, response				
Two-way RM ANOVA	Matching : Across row				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Tiempo x Toxinas	7,229	<0,0001	****	Yes	
Tiempo	27,81	<0,0001	****	Yes	
Toxinas	62,98	<0,0001	****	Yes	
Subject	0,5747	0,0002	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tiempo x Toxinas	82908	236	351,3	F (236, 480) = 10,44	P<0,0001
Tiempo	318950	59	5406	F (59, 120) = 98,42	P<0,0001
Toxinas	722359	4	180590	F (4, 480) = 5368	P<0,0001
Subject	6591	120	54,93	F (120, 480) = 1,633	P=0,0002
Residual	16148	480	33,64		
Data summary					
Number of columns (Toxinas)	5				
Number of rows (Tiempo)	60				
Number of subjects (Subject)	180				
Number of missing values	0				

Tabla 8 Graph Pad Analisis estadístico *Micrurus lemniscatus* (2way Anova – Multiple comparisons).

ANOVA Results: 2way ANOVA (Multiple comparisons) – <i>Micrurus lemniscatus</i>								
Compare column means (main column effect)								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	10							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary				
Control vs. ML-1	39,88	38,21 to 41,56	Yes	****				
Control vs. ML-10	67,37	65,70 to 69,05	Yes	****				
Control vs. ML-50	69,07	67,40 to 70,75	Yes	****				
Control vs. ML-10+AV	10,82	9,143 to 12,49	Yes	****				
ML-1 vs. ML-10	27,49	25,82 to 29,16	Yes	****				
ML-1 vs. ML-50	29,19	27,51 to 30,86	Yes	****				
ML-1 vs. ML-10+AV	-29,07	-30,74 to -27,39	Yes	****				
ML-10 vs. ML-50	1,697	0,02297 to 3,371	Yes	*				
ML-10 vs. ML-10+AV	-56,56	-58,23 to -54,88	Yes	****				
ML-50 vs. ML-10+AV	-58,25	-59,93 to -56,58	Yes	****				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N 1	N 2	q	DF
Control vs. ML-1	78,21	38,33	39,88	0,6114	18	18	92,26	480,0
Control vs. ML-10	78,21	10,84	67,37	0,6114	18	18	155,8	480,0
Control vs. ML-50	78,21	9,143	69,07	0,6114	18	18	159,8	480,0
Control vs. ML-10+AV	78,21	67,40	10,82	0,6114	18	18	25,02	480,0
ML-1 vs. ML-10	38,33	10,84	27,49	0,6114	18	18	63,59	480,0
ML-1 vs. ML-50	38,33	9,143	29,19	0,6114	18	18	67,51	480,0
ML-1 vs. ML-10+AV	38,33	67,40	-29,07	0,6114	18	18	67,24	480,0
ML-10 vs. ML-50	10,84	9,143	1,697	0,6114	18	18	3,926	480,0

ML-10 vs. ML-10+AV	10,84	67,40	-56,56	0,6114	18 0	18 0	130 ,8	480 ,0
ML-50 vs. ML-10+AV	9,143	67,40	-58,25	0,6114	18 0	18 0	134 ,7	480 ,0

Tabla 9 Graph Pad Analisis estadístico *Micrurus medemi* (2way Anova).

ANOVA Results (2way Anova) – <i>Micrurus medemi</i>					
Table Analyzed	Dose vs, response				
Two-way RM ANOVA	Matching : Across row				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Tiempo x Toxinas	10,10	<0,0001	****	Yes	
Tiempo	38,45	<0,0001	****	Yes	
Toxinas	48,25	<0,0001	****	Yes	
Subject	0,6946	0,2250	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tiempo x Toxinas	76430	236	323,9	F (236, 480) = 8,204	P<0,0001
Tiempo	290972	59	4932	F (59, 120) = 112,6	P<0,0001
Toxinas	365065	4	91266	F (4, 480) = 2312	P<0,0001
Subject	5256	120	43,80	F (120, 480) = 1,110	P=0,2250
Residual	18948	480	39,47		
Data summary					
Number of columns (Toxinas)	5				
Number of rows (Tiempo)	60				
Number of subjects (Subject)	180				
Number of missing values	0				

Tabla 10 Graph Pad Analisis estadístico *Micrurus medemi* (2way Anova- Multiple

ANOVA Results: 2way ANOVA (Multiple comparisons) – <i>Micrurus medemi</i>								
Compare column means (main column effect)								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	10							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary				
Control vs. MM-1	21,46	19,64 to 23,27	Yes	****				
Control vs. MM-10	31,72	29,90 to 33,53	Yes	****				
Control vs. MM-50	55,44	53,63 to 57,25	Yes	****				
Control vs. MM-10+AV	3,771	1,958 to 5,585	Yes	****				
MM-1 vs. MM-10	10,26	8,446 to 12,07	Yes	****				
MM-1 vs. MM-50	33,98	32,17 to 35,80	Yes	****				
MM-1 vs. MM-10+AV	-17,69	-19,50 to -15,87	Yes	****				
MM-10 vs. MM-50	23,72	21,91 to 25,54	Yes	****				
MM-10 vs. MM-10+AV	-27,95	-29,76 to -26,13	Yes	****				
MM-50 vs. MM-10+AV	-51,67	-53,48 to -49,86	Yes	****				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
Control vs. MM-1	78,21	56,76	21,46	0,6623	180	180	45,82	480,0
Control vs. MM-10	78,21	46,50	31,72	0,6623	180	180	67,73	480,0
Control vs. MM-50	78,21	22,77	55,44	0,6623	180	180	118,4	480,0
Control vs. MM-10+AV	78,21	74,44	3,771	0,6623	180	180	8,053	480,0
MM-1 vs. MM-10	56,76	46,50	10,26	0,6623	180	180	21,91	480,0
MM-1 vs. MM-50	56,76	22,77	33,98	0,6623	180	180	72,57	480,0
MM-1 vs. MM-10+AV	56,76	74,44	-17,69	0,6623	180	180	37,77	480,0
MM-10 vs. MM-50	46,50	22,77	23,72	0,6623	180	180	50,66	480,0
MM-10 vs. MM-10+AV	46,50	74,44	-27,95	0,6623	180	180	59,67	480,0
MM-50 vs. MM-10+AV	22,77	74,44	-51,67	0,6623	180	180	110,3	480,0

comparisons).

Tabla 11 Graph Pad Analisis estadístico *Micrurus sangilensis* (2way Anova).

ANOVA Results (2way Anova) – <i>Micrurus sangilensis</i>					
Table Analyzed	Dose vs, response				
Two-way RM ANOVA	Matching : Across row				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Tiempo x Toxinas	7,607	<0,0001	****	Yes	
Tiempo	38,63	<0,0001	****	Yes	
Toxinas	50,80	<0,0001	****	Yes	
Subject	0,5155	0,8736	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tiempo x Toxinas	65462	236	277,4	F (236, 480) = 6,314	P<0,0001
Tiempo	332441	59	5635	F (59, 120) = 152,4	P<0,0001
Toxinas	437163	4	109291	F (4, 480) = 2488	P<0,0001
Subject	4437	120	36,97	F (120, 480) = 0,8416	P=0,8736
Residual	21085	480	43,93		
Data summary					
Number of columns (Toxinas)	5				
Number of rows (Tiempo)	60				
Number of subjects (Subject)	180				
Number of missing values	0				

Tabla 12 Graph Pad Analisis estadístico *Micrurus lemniscatus* (2way Anova-Multiple comparisons)

ANOVA Results: 2way ANOVA (Multiple comparisons) – <i>Micrurus sangilensis</i>								
Compare column means (main column effect)								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	10							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary				
Control vs. MS-1	26,12	24,21 to 28,03	Yes	****				
Control vs. MS-10	29,15	27,23 to 31,06	Yes	****				
Control vs. MS-50	62,65	60,74 to 64,56	Yes	****				
Control vs. ML-10+AV	5,813	3,900 to 7,726	Yes	****				
MS-1 vs. MS-10	3,026	1,113 to 4,939	Yes	***				
MS-1 vs. MS-50	36,53	34,61 to 38,44	Yes	****				
MS-1 vs. ML-10+AV	-20,31	-22,22 to -18,39	Yes	****				
MS-10 vs. MS-50	33,50	31,59 to 35,42	Yes	****				
MS-10 vs. ML-10+AV	-23,33	-25,25 to -21,42	Yes	****				
MS-50 vs. ML-10+AV	-56,84	-58,75 to -54,92	Yes	****				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
Control vs. MS-1	78,21	52,09	26,12	0,6986	180	180	52,88	480,0
Control vs. MS-10	78,21	49,07	29,15	0,6986	180	180	59,00	480,0
Control vs. MS-50	78,21	15,57	62,65	0,6986	180	180	126,88	480,0
Control vs. ML-10+AV	78,21	72,40	5,813	0,6986	180	180	11,77	480,0
MS-1 vs. MS-10	52,09	49,07	3,026	0,6986	180	180	6,125	480,0
MS-1 vs. MS-50	52,09	15,57	36,53	0,6986	180	180	73,94	480,0
MS-1 vs. ML-10+AV	52,09	72,40	-20,31	0,6986	180	180	41,11	480,0
MS-10 vs. MS-50	49,07	15,57	33,50	0,6986	180	180	67,82	480,0
MS-10 vs. ML-10+AV	49,07	72,40	-23,33	0,6986	180	180	47,23	480,0
MS-50 vs. ML-10+AV	15,57	72,40	-56,84	0,6986	180	180	115,00	480,0

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	AVAL TÉCNICO - ÉTICO PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	Versión: 01 2012-Jun-19
		FOR-R03.0000-003	Página 1 de 1

		Código CEMIN	28-2017
Título del Proyecto			
Caracterización bioquímica y biológica del veneno de las corales colombianas <i>Micrurus medemi</i> , <i>M. sangilensis</i> y <i>M. lemniscatus</i> y su neutralización con el Antiveneno Anticoral Polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud (INS)			
Ciudad y fecha	Bogotá D.C., 2 de junio de 2017		
Dirigido a	Francisco Javier Ruiz Gómez		
Grupo de investigación	Produccion		
Correo electrónico de contacto investigador principal o referente en el INS	fruiz@ins.gov.co		
El Comité de Ética y de Metodologías de Investigación (CEMIN) del Instituto Nacional de Salud (INS), creado mediante Resolución 395 del 4 de abril de 2017, por la cual se reglamenta el Comité de Ética y Metodologías de Investigación CEMIN; considera que el proyecto de investigación CEMIN N° 28-2017 "Caracterización bioquímica y biológica del veneno de las corales colombianas <i>Micrurus medemi</i> , <i>M. sangilensis</i> y <i>M. lemniscatus</i> y su neutralización con el Antiveneno Anticoral Polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud (INS)", reúne los requisitos técnicos y éticos para lo cual se concede aval según acta N° 8 del 2 de Junio de 2017.			
Nombre de quien ejerce las funciones	Yamileth Ortiz Gómez		
Cargo	Secretaría Ejecutiva CEMIN		
Firma			
Notas: 1. Este documento debe archivar en la carpeta del proyecto en el CEMIN 2. Debe informarse al CEMIN la fecha de inicio de ejecución del proyecto una vez esté asegurada la financiación del mismo, esta fecha contará como inicio para el seguimiento y solicitud de informes de avance y final 3. En caso de requerir modificación de aspectos éticos o técnicos del proyecto en su versión avalada, estos deben ser presentados al CEMIN para su debida autorización antes de la ejecución del proyecto.			
Firma de recibido del investigador principal o responsable en el INS Fecha de recibido: (dd/mm/aaaa)			

Lámina 1 Aval comité de ética Cemin, Instituto Nacional de Salud.

Ver anexo "Inserto Antiveneno Anticoral Polivalente"
 VI: 02 (2018-11)

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Responsable Control de Calidad	Coordinador (a) Aseguramiento de Calidad	Director (a) de Producción
	Coordinador (a) Producción y Desarrollo Tecnológico	Director (a) Técnica

Especificaciones Técnicas

Relación Cromática



Tipografía

Texto de etiqueta en fuente : Tahoma

Papel

Bond Blanco (75 g/m² ± 10 g/m²)
 Esmaltado Brillante c2s
 (90 g/m² ± 10 g/m²)

Medidas

Alto total: 19,2 cm
 Ancho total: 32,2 cm

Código

VI: 02 (2018-11)

Impresión

5/2 Tintas

Lámina 2 Inserto Antiveneno Anticoral Polivalente INS.

ANTIVENENO ANTICORAL POLIVALENTE SUERO ANTIMICRÚRICO

CONTRAINDICACIONES

Pacientes con antecedentes alérgicos o de sensibilidad a los sueros heterólogos de origen equino, deben esta bajo estricta observación médica durante la administración del suero antimicrúrico polivalente.

INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

Ninguna medicación concomitante constituye contraindicación para el uso del suero antimicrúrico polivalente; sin embargo, los medicamentos en uso por parte del paciente deben ser informados al médico tratante.

CONDICIÓN DE VENTA: Venta libre.

Elaborado por el
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Dirección de producción
Tel: 220 77 00 Ext. 1275 - 1288 - 1292
Av. Cl 26 51-20
Bogotá, D.C., Colombia
comunicaciones@ins.gov.co

Linea gratuita: 01 8000 113 400
www.ins.gov.co

VI: 02 (2018-11)

PRESENTACION

El antiveneno anticoral polivalente del Instituto Nacional de Salud - INS, se presenta en un frasco vial de 10 mL que contiene una solución inyectable de inmunoglobulina G (IgG), purificada, proveniente de equinos inmunizados con venenos de serpientes pertenecientes del Género *Micrurus* (corales verdaderas), de las siguientes especies: *Micrurus dumerilii*, *Micrurus mipartitus*, *Micrurus isozonus* y *Micrurus surinamensis*.

COMPOSICIÓN

Cada 10 mL de antiveneno, neutralizan como mínimo: 2mg del veneno de las especies *Micrurus dumerilii*, *Micrurus mipartitus*, *Micrurus isozonus* y *Micrurus surinamensis*.

FORMA FARMACÉUTICA: solución parenteral de pequeño volumen.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:

- El antiveneno anticoral del INS debe ser aplicado en infusión intravenosa.
- Debe administrarse solamente cuando el accidente ofídico fue ocasionado por una serpiente del género *Micrurus* o coral verdadera.
- NO está indicado** en accidentes ofídicos por serpientes de la familia Viperidae: *Bothrops sp.* (vibora, cuatro marices, taya equis, mapaná, terciopelo, pelo de gato), *Crotalus* (cascabel) y *Lachesis* (verrugo).
- Verificar que el contenido del vial sea traslúcido y libre de material extraño.
- Conservar el antiveneno refrigerado entre 2 y 8 °C.
- Manténgase fuera del alcance de los niños.

INDICACIÓN

El antiveneno anticoral del INS está indicado en el manejo del accidente ofídico por las serpientes coral de las siguientes especies:

Para las zonas Andina, Atlántica y Pacífica, especies: ***Micrurus dumerilii***: Coral, Coralilla, Coral Capuchina y ***Micrurus mipartitus***: Cabeza de Chocho, Candollilla, Coral Cabeza de Chocho, Coral Rabo de Ají, Coral Rabo de Candelá, Gargantilla, Matagatos, Mataganado.

Para la zona de la Orinoquía y Amazonía especies: ***Micrurus isozonus***: Coral de Franjas Iguales, Culebra Coral, Acaví (tribu Guahibo), Huayamacacha (tribu Cuiva) y ***Micrurus surinamensis***: Coral de Agua.

Por reacción cruzada neutraliza veneno de las especies ***Micrurus lemniscatus***, ***M. spixii*** y ***M. medemi***.

Prueba de hipersensibilidad

La literatura científica reporta que las pruebas de sensibilidad intradérmica y conjuntival tienen bajo valor predictivo positivo para las reacciones de hipersensibilidad inmediata, llamadas también reacciones adversas tempranas, pudiendo la prueba desencadenar reacciones por sí misma y retrasando el inicio de la seroterapia. Por lo tanto, no se recomienda hacerlas como requisito para aplicar el antiveneno.

Manifestaciones clínicas del envenenamiento por serpientes del género *Micrurus*

A continuación se describen algunas manifestaciones clínicas del envenenamiento por serpientes corales (género *Micrurus*), de acuerdo con la intensidad del envenenamiento, se recomienda revisar las Guías para el Manejo de Urgencias Toxicológicas del Ministerio de Salud y Protección Social y el Protocolo de Vigilancia en Salud Pública del Accidente Ofídico del Instituto Nacional de Salud. La mordedura de serpientes del género *Micrurus* produce cambios locales que pueden ser poco evidentes (edema escaso, parestesias y dolor local), por ello la atención debe enfocarse en la sintomatología del cuadro neurotóxico que se instala en las primeras 2 horas en niños pequeños (lactantes, preescolares); y entre 2 a 15 horas en niños escolares, preadolescentes y adultos.

CLASIFICACIÓN INTENSIDAD DEL ENVENENAMIENTO		
POR SERPIENTES DEL GÉNERO MICRURUS ("corales verdaderas")		
ESTADO	ASPECTOS CLÍNICOS	PARALÍNICOS
Leve	Manifestaciones locales: edema escaso, eritema y dolor; parestesias transitorias, ptosis palpebral y oftalmoplejía solamente. Manifestaciones sistémicas: Buen estado general.	Normales
Moderado	Manifestaciones locales: dolor en el sitio de la mordedura, de intensidad variable según el especie que causó el accidente, el dolor tiene tendencia a progresión proximal y es acompañado de parestesias. Manifestaciones sistémicas: cefalea, náusea y vómito, sensación de cansancio (debilidad) muscular, astenia, ptosis palpebral, distonía o afonía, sielorrrea, boca entristecida, fascias neurotóxicas de Rosenfeld, hiporreflexia osteotendinosa, disnea, sensación de opresión en el cuello y cianosis, en algunos casos muy graves, relajación de esfínteres, micción involuntaria, parálisis motora flácida generalizada que involucra músculos respiratorios.	Normales o pueden estar alterados CK, TP, TTP, plaquetas, bilirrubina sérica, hemoglobina
Grave		

Adaptación INS de: (1) Otero-Patiño R. Snake bites in Colombia. In: Clinical toxicology. Dordrecht: Springer Science Business Media Dordrecht; 2014; (2) Otero-Patiño R. Guía de accidentes por animales zoológicos de Colombia. Diagnóstico y tratamiento de las mordeduras y picaduras. Impresos Berta'n Ltda, Medellín, 2014 200; (3) Protocolo de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Accidente ofídico ofídico Linea Póla A. Universidad de Antioquia, Programa de Ofidios y Escorpiónismo 2013 (4) Brasili: Biología, Clínica e Terapéutica dos acidentes, Segunda edición, Editorial Sarvier, Sao Paulo (Brasil), 2009, pp 116-124

Tratamiento específico

El envenenamiento ofídico por coral es esencialmente neurotóxico y es considerado un evento serio, por el alto riesgo de insuficiencia respiratoria aguda. Si la evidencia clínica indica que es una mordedura por coral verdadera, la administración del antiveneno deberá hacerse lo más pronto posible y preferiblemente antes del inicio de la parálisis.

La dosis no difiere en adultos o niños: 5 frascos del antiveneno anticoral del INS si es un accidente por corales de las regiones Andina, Caribe y Pacífica; 10 frascos si es una mordedura por corales de la Orinoquía o Amazonia. La solución a inyectar debe prepararse diluyendo el contenido completo de todos los viales establecidos como tratamiento, en solución salina (para adultos 250 mL y para niños 100 mL) haciendo la aplicación por vía intravenosa. Se inicia la infusión a 10 gotas por minuto; si en 15 minutos no hay reacciones adversas, se completa la dosis establecida en un lapso de 30-60 minutos, siempre bajo supervisión médica estricta.

REACCIONES ADVERSAS

Dado que el antiveneno anticoral polivalente del INS, es de origen heterólogo (equino), puede ocasionar las siguientes reacciones adversas tipo A:

a. Reacciones tempranas

Las reacciones tempranas pueden ser desde leves (rubor cutáneo, urticaria, prurito, erupción cutánea, dolor abdominal, diarrea, náusea, vómito, fiebre, escalofrío), moderadas (edema angioneurótico), hasta muy graves, incluyendo tos, disnea, broncospasmo, estridor e hipotensión o choque, razón por la cual se reitera su uso bajo supervisión médica estricta.

Las reacciones son de frecuencia e intensidad variable y pueden ocurrir durante la infusión del antiveneno o las primeras 24 horas después de su aplicación. Se presentan como reacción anafiláctica o anafilactoide; pueden ser graves y requerir tratamiento médico de urgencia (adrenalina, corticosteroides, antihistamínicos, reanimación cardiopulmonar) y vigilancia médica estricta durante su administración; luego, cada hora por 6 horas; y finalmente, cada 6 horas hasta ajustar 24 h.

Como prevención, debe solicitarse información al paciente, o los familiares, sobre antecedentes alérgicos de naturaleza diversa y al uso previo de sueros heterólogos (antiofídico, antitetánico, antirrábico, antiescorpiónico). La vigilancia estricta es mandatoria, así como también disponer de los medicamentos mencionados y de equipo de reanimación cardiopulmonar.

b. Reacciones tardías

En general son benignas y ocurren entre 3 y 25 días posteriores a la administración del antiveneno. Se caracterizan por fiebre, urticaria, artralgias, proteinuria, neuropatía, adenomegalia y raramente compromiso renal. Esta es la reacción conocida como "enfermedad del suero" y se sugiere que sea tratada con analgésicos, antihistamínicos y corticoides.

