

Estudio de caso: evaluación y análisis de biomarcadores fisiológicos en un equino pos-inoculación de veneno de *Bothrops sp.*

Luisa Pérez ^{a 1}
Diana Castaño ^{a 2}
Diego Hernández-Pulido ^{b 3}
Erika Daza-Cardona ^{a 4}



Estudio de caso

Pérez, L., Castaño, D., Hernández-Pulido, D. & Daza-Cardona, E. (2017). Estudio de caso: evaluación y análisis de biomarcadores fisiológicos en un equino pos-inoculación de veneno de *Bothrops sp.* *Revista de investigaciones de Unigraria*, 5(1), 93-108.

Resumen

Este documento analiza la inoculación del veneno *Bothrops* en un equino de raza criolla teniendo en cuenta las propiedades y las características de la especie, tales como robusticidad, resistencia y capacidad de producción de inmunoglobulinas, también se observaron algunos cambios físicos locales en el lugar de la inoculación y algunos cambios comportamentales que presentó el equino durante el procedimiento, además se realizó la comparación de pruebas bioquímicas con el fin de llevar un seguimiento durante el proceso. El equino fue inoculado utilizando el método descrito por De Roodt, se realizó la inoculación los días 1, 15, 30, 45, 55 y 65, con dosis de veneno establecidas según la DL50 del veneno en la tabla, en el cuello a nivel subcutáneo en diferentes puntos sobre una línea medio-lateral paralela a la crin, en sentido cráneo-caudal. Las lesiones locales causadas fueron producidas por el coadyuvante de Freund. En el eritrograma de la primera toma y la última no se encontraron diferencias significativas y los valores se encontraban dentro del rango biológico normal a excepción del ancho de distribución eritrocitaria que indicó anisocitosis. En el leucograma se tuvo en cuenta la primera y la última toma, para tener como resultado una leucocitosis por neutrofilia sin desviación a la izquierda. Entre los indicadores bioquímicos, se encontró un descenso de la ALT desde la segunda toma hasta la última y la AST en todos los casos se encontró dentro de los valores de referencia. Con el protocolo realizado no se generaron efectos severos que pusieran en riesgo la salud o la integridad del caballo, sin embargo, algunos cambios comportamentales sí fueron identificables, al igual que algunos bioquímicos.

Palabras clave: inoculación, intoxicación, serpiente, ofídica, medidores bioquímicos, parámetros fisiológicos

*Case Study Assessment and analysis of physiological biomarkers in an equine post inoculation with *Bothrops sp.* venom.*

Abstract

This document analyzes the inoculation into the *Bothrops* venom in an equine of Creole breed taking into account the properties and characteristics from this species, such as robustness, resistance and production immunoglobulins capacity, also some local physical changes were likewise observed in the place of the Inoculation and nearly behavioral changes that this equine presented during the procedure, in addition, the comparison of biochemical tests was carried out in order to keep track during the process. The equine was inoculated using the method described by De Roodt, the inoculation was performed on days 1, 15, 30, 45, 55 and 65, with doses of venom established according to the LD50 of the poison in the table, in the neck at subcutaneous level at different points on a mid-lateral line parallel to the mane, in the craniocaudal direction. The local lesions caused were produced by Freund's adjuvant. In the erythrogram of the first and last doesn't report significant differences establishing normal biological range except for the width from the erythrocyte distribution that indicated anisocytosis. In the leukogram, the first and last shots were considered, issues in leukocytosis through neutrophilia without deviation to the left. Among the biochemical indicators, a decrease in ALT was found from the second dose to the last and the AST. At the end in all cases was found within the reference values. With the protocol carried out, no several effects were generated that put the health or integrity of the horse at risk, however, some insignificant behavioral and biochemical changes were perceptible.

Key words: inoculation, intoxication, snake, ophidian, biochemical parameters, physiological parameters

¹ Estudiante Medicina Veterinaria, Facultad de ciencias agrarias, Fundación Universitaria Agraria, Bogotá, Colombia.

² Estudiante medicina Veterinaria, Facultad de ciencias agrarias

³ Docente tiempo completo Medicina Veterinaria, Facultad de ciencias agrarias, Fundación Universitaria Agraria. Bogotá, Colombia - hernandez.diegoal@uniagraria.edu.co

⁴ Docente TC Medicina Veteraria – daza.erika@uniagraria.edu.co

^a Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Programa de Medicina Veterinaria, Bogotá, Colombia

^b Centro de investigación, prácticas y desarrollo tecnológico "Pinares de Tenjo", Uniagraria, Tenjo, Colombia

Introducción

La fisiopatología de la intoxicación ofídica⁵ es bien conocida, se sabe que los efectos de dosis subletales de veneno administradas en animales inducen a la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos), utilizadas en el tratamiento de la intoxicación ofídica.

El presente estudio evaluó y analizó algunos cambios fisiológicos que presentó un equino después de la inoculación repetitiva de veneno de *Bothrops sp.* La intoxicación ofídica ha sido bien estudiada, sin embargo, se encuentra poca literatura relacionada al comportamiento físico-fisiológico desencadenado por la inoculación de dosis subletales de veneno y la medición de respuesta de protección en la producción de inmunoglobulinas para, posteriormente, utilizar estas en su tratamiento (Bogado, *et al.*, 2014).

En Latinoamérica se han realizado estudios relacionados con la toxicidad del veneno de *Bothrops*, generado por especies de serpientes nativas del continente (Laínez, *et al.*, 2014). De igual forma, se han desarrollado trabajos relacionados con el comportamiento de equinos inmunizados que han sido expuestos a cantidades controladas de veneno de *Bothrops* y que registran respuestas multisistémicas presentadas por el paciente (Bogado, *et al.*, 2013; Fazio, *et al.*, 2014). Al inocular el veneno al animal, este causará un aumento de la permeabilidad, se estimula la infiltración polimorfonuclear con migración hacia el lugar de la lesión bajo la influencia de factores quimiotácticos y, además, en los tejidos inflamados los macrófagos van a liberar enzimas lisosomales que aumentan la actividad fagocítica, posteriormente se dará la formación de abscesos en el lugar de la inoculación. (Bogado, *et al.*, 2014).

El estrés en este tipo de situaciones es necesario considerarlo porque puede influir en la homeostasis y, por ende, en la respuesta inmunológica del paciente. Este tipo de desequilibrios puede llevar más fácilmente a la enfermedad, donde la principal hormona asociada es el cortisol. Al ser el caballo una especie muy susceptible al estrés rápidamente aumenta el cortisol a nivel plasmático, sin embargo, se debe tener en cuenta que el nivel de cortisol no va a determinar la etapa en la que se encuentre, de si es estrés agudo o crónico (Martos y Ayala, 2003). El estrés es una reacción fisiológica que presentan los animales ante una amenaza, sea esta real o explícita, y en respuesta el cuerpo intenta restablecer el equilibrio interno al aumentar la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), lo cual implica la liberación, desde el hipotálamo, de la hormona liberadora de adrenocorticotropa (ACTH)⁶, la cual actúa en la adenohipófisis y causa la liberación de corticotropina (CRH)⁷ que induce, en la corteza suprarrenal, el aumento de la secreción de hormonas corticosteroides en niveles que pueden ser medidos en diferentes fluidos corporales (Rojas, 2010).

Así pues, este estudio de caso plantea la medición de indicadores de deshidratación y hemoconcentración dentro de evaluadores bioquímicos de miedo, excitación y alteración hepática, de igual forma los cambios en las principales constantes fisiológicas que se pueden presentar al momento en el que el sistema inmunológico está en contacto con el veneno de *Bothrops*; por lo tanto, el objetivo es realizar un seguimiento a las mediciones de marcadores bioquímicos e identificar las alteraciones desatadas en cada uno de ellos, a medida que se somete el equino a un aumento progresivo de las dosis de veneno de *Bothrops sp.*

⁵ La intoxicación ofídica genera una lesión cutánea y esta es provocada por la mordedura de una serpiente del género *Bothrops*. Seguido a la mordedura empieza la inoculación de sustancias tóxicas que lesionan los tejidos, condicionando alteraciones locales y sistémicas de gravedad variable (CITVer, 2014).

⁶ La ACTH es una hormona polipeptídica, producida por la hipófisis, que estimula a las glándulas suprarrenales para producir cortisol y corticosterona.

⁷ La CRH actúa sobre la hipófisis y estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa iniciando los componentes de la respuesta al estrés (Donadio, *et al.*, 2016).

Método

El siguiente trabajo en mención es un estudio de caso, por lo que no contempla un modelo metodológico estadístico como si se tratara de un experimento científico.

Planteamiento del caso

Este estudio se sometió al comité de ética de la Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Uniagraria, y una vez aprobado se realizó la fase práctica en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDT) en Pinares de Tenjo.

El uso de equinos ha tenido un gran auge en la industria farmacéutica debido a su capacidad de producción de inmunoglobulinas, resistencia a los esquemas de inmunización y grandes volúmenes de sangre (Lomonte, 2012). Al escoger la especie de animal a inmunizar, se tuvieron en cuenta las propiedades y las características de la especie, como robusticidad, resistencia, capacidad de producción de inmunoglobulinas y el volumen de antisuero requerido, por lo cual se decidió utilizar un equino de raza criolla, según los protocolos de producción de la OMS (2010): un animal adulto, joven, con peso entre 250 y 350 kg.

Se dispuso de tres semanas para la cuarentena, la adaptación, la desparasitación, la alimentación y todo el estatus sanitario y el entorno adecuado para un manejo ético y racional.

El equino fue inoculado con el método descrito por De Roodt (2010), siempre bajo la colaboración de un médico veterinario especializado en equinos. Se escogió este método por tener en cuenta que evidencia una adecuada producción de anticuerpos sin efectos adversos en los equinos, gracias a la dosificación paulatina del inmunógeno.

Para atender los parámetros de este protocolo, se realizó la inoculación los días 1, 15, 30, 45, 55 y 65, con dosis de veneno establecidas según la DL50 del veneno, en la tabla del cuello a nivel subcutáneo, en diferentes puntos sobre una línea medio-lateral paralela a la crin, en sentido cráneo-caudal.

Esta inoculación no requirió anestésico local debido a que el dolor se limita al producido por la penetración de la aguja y no por el efecto del veneno. Posterior a cada inoculación, el animal recibió 1 kg de concentrado y agua *ad libitum* como recompensa, y se observó si este presentaba alguna manifestación de dolor, incomodidad, decaimiento o una respuesta no esperada durante las dos horas posteriores. De igual forma, se evaluaron constantes fisiológicas de rutina, como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, pulso, temperatura y llenado capilar. Otra acción realizada fue una muestra sanguínea para evaluar indicadores de deshidratación, hemoconcentración, miedo, excitación y perfil hepático.

Tabla 1. Parámetros en sangre establecidos para analizar

Marcadores Bioquímicos	<i>Indicadores de deshidratación hemoconcentración, miedo/ excitación</i>	<i>VGA, proteína total, albúmina</i>
	<i>Perfil hepático completo</i>	<i>GPT, GOT, Fosfatasa alcalina, proteínas totales bilirrubinas diferenciadas (directa-indirecta)</i>

Fuente: Elaboración propia.

En las primeras inmunizaciones (días 1, 15 y 30), los venenos fueron inactivados con EDTA5 10nM, en concordancia con la técnica sugerida por la OMS (2010). Para cumplir el objetivo, se tuvo que tratar el veneno con adyuvante de Freund completo en el día 1, adyuvante de Freund incompleto en el día 15, con 10 % de gel de Al(OH)₃ a los 30 y 45 días y, finalmente, solo con NaCl 0,15 M en los días restantes (Segura, 2009) (tabla 2).

Del proceso de inoculación no se esperó la generación de reacciones de anafilaxia, dado que las técnicas descritas por De Roodt y Segura pretenden atenuar una posible respuesta aguda en el equino, sin embargo, cabe aclarar que todos los procedimientos fueron realizados y supervisados por un médico veterinario. En caso de haberse presentado algún tipo de reacción anafiláctica se debe suspender de inmediato la inoculación y se iniciará el tratamiento con epinefrina (0,01–0,1 mg/kg) y antihistamínicos (difenhidramina 0,5–2,0 mg/kg I.M.) para bloquear los receptores de histamina en fase inmediata y con glucocorticoides (dexametasona 0,5–4 mg/kg IV lenta) para bloquear la cascada de ácido araquidónico en fase tardía y choque (Godoy, 2014).

La sangría se realizó bajo dirección de varios médicos veterinarios especializados con la técnica descrita según el protocolo de inmunización y sangría de la OMS (2010). Se estima realizar una sangría después de dos meses de inmunización, para obtener un volumen total de 500 ml, aproximadamente, dependiendo de su peso.

Previa asepsia y antisepsia se instaló un catéter desechable a través de la vena yugular, para una duración de sangría de 20-30 minutos. Esta se recibió directamente en un recipiente plástico desechable estéril con citrato como anticoagulante y una vez realizada la sangría, el animal fue llevado a la zona de alimentación, donde recibió 1 kg de concentrado y agua *ad libitum*.

Durante el procedimiento se observó el comportamiento del animal y se registraron los cambios en los formatos de bienestar animal, diseñados especialmente para este proceso, de igual forma se monitoreó con el equipo de signos vitales. Posterior a la sangría, se revisó la generación de alteraciones hemodinámicas o que comprometieran la salud del animal, durante las seis horas siguientes. Posterior a este tiempo, se devolvió el equino a su área asignada de descanso al aire libre.

Tabla 2. Dosificación y vehículo de inoculación

Día	Dosis de veneno (mg)	Inactivación	Adyuvante	Otro
1	0,5	EDTA 10 nM	Freund completo	--
15	1	EDTA 10 nM	Freund incompleto	--
30	2	EDTA 10 nM	Gel Al(OH) ₃	--
45	3	-	Gel Al(OH) ₃	--
55	4	--	--	NaCl
65	4	--	--	NaCl

Fuente: Elaboración propia.

Resultados y discusión

Todos los procedimientos de toma de muestra e inoculación del veneno se realizaron en horas de la mañana, entre las 7:00 y las 10 a. m., debido a que algunos análisis se alteran porque los animales tienen ritmos circadianos y además no están sujetos a los cambios metabólicos que se producen por la actividad física realizada durante el día (Benozzi, *et al.*, 2016).

Las inoculaciones se realizaron en la tabla del cuello a nivel subcutáneo en diferentes puntos, sobre una línea medio lateral paralela a la crin, en sentido cráneo-caudal, no requirió de anestésico local debido a que el dolor se limitaba al producido por la penetración de la aguja y no por el efecto del veneno.

Tabla 3. Eritrograma inicial

	Resultado	Rango biológico
Recuento total de eritrocitos	11,2 × 10 ⁶ /μL	6,0 - 12,0 × 10 ⁶ /μL
Hematocrito	42,8%	32 - 48%
Hemoglobina	16,9 g/dl	10 - 18 g/dl
VCM	38,2 fl.	34 - 58 fl.
HCM	15,0 pg.	13 - 19 pg.
CHMC	39,4 g/dl	31 - 37 g/dl
Ancho de distribución eritrocitaria (ADE)	21,0%	11,0 - 15,5%

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3. Se observa que la línea roja se encontró dentro de los parámetros, normocítico normocrómico, sin embargo, se encontraba una leve policromatofilia y un ancho de distribución

eritrocitaria aumentado, es decir, una anisocitosis ligera asociada al estrés generado por la manipulación.

Tabla 4. Leucograma y proteínas plasmáticas iniciales

	Resultado	Rango biológico
Recuento total de leucocitos	12,1 × 10 ³ /μL	6,0 - 12,0 × 10 ³ /μL
Neutrófilos	5,20 × 10 ³ /μL	2,10 - 9,1020 × 10 ³ /μL
Linfocitos	5,93 × 10 ³ /μL	1,75 - 9,8020 × 10 ³ /μL
Monocitos	0,36 × 10 ³ /μL	0,35 - 0,9820 × 10 ³ /μL
Proteínas plasmáticas totales	7,0 g/dl	6,0 - 8,5 g/dl

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 4. Se encontró leucocitosis leve. Recuento de leucocitos y recuentos diferenciales

confirmados en lámina. Valor asociado al estrés por manejo y manipulación.

Tabla 5. Marcadores de funcionalidad hepática y renal inicial

Prueba	Resultado	Rango biológico
ALT (GPT)	3 UI/L	--
AST (GOT)	283 UI/L	160 - 412 UI/L
Fosfatasa alcalina (ALP)	388 UI/L	143 - 395 UI/L
Bilirrubina total	1,1 mg/dl	hasta 3,2 mg/dl
Bilirrubina directa	0,26 mg/dl	hasta 0,4 mg/dl
Bilirrubina indirecta	0,86 mg/dl	hasta 2,8 mg/dl
Albúmina	2,6 g/dl	2,6 - 4,1 g/dl
Proteínas totales séricas	5,6 g/dl	5,6 - 7,6 g/dl
Glucosa	70 mg/dl	75 - 115 mg/dl
Urea	35 mg/dl	11 - 27 mg/dl

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 5 se observan parámetros normales excepto por la glucosa, la cual está disminuida, la cual puede estar alterada por la alimentación del equino al momento de la toma de la muestra. En esta misma se puede evidenciar el suero ligeramente hemolizado.

En el hemograma se comparan los resultados de la primera inoculación y la última, debido a que en los demás resultados no se observaron cambios significativos.

Tabla 6. Comparación del eritrograma toma 1 y toma final

Recuento total de eritrocitos	10,0 × 10 ⁶ /μL		10,0 × 10 ⁶ /μL
Hematocrito	39,4 %		35,5 %
Hemoglobina	15,1	g/dl	13,4%
VCM	39,3	fl	35,5 fl
HCM	15,0	pg	13,4 pg.
CHMC	38,3	g/dl	37,7 g/dl
Ancho de distribución eritrocitaria (ADE)	21,9 %		21,0 %

Fuente: Elaboración propia.

En el eritrograma no se encuentran diferencias significativas entre las inoculaciones, dado que están dentro de los valores de referencia, sin embargo, el ancho de distribución eritrocitaria aumenta desde el inicio de las inoculaciones y en todas las tomas posteriores, debido a la

detección por parte del hemocitómetro de células policromatófilas, las cuales por lo general tienen un tamaño mayor al de un eritrocito maduro, lo que genera un aumento en el ancho de distribución eritrocitaria (ADE).

Tabla 7. Comparación del leucograma y las proteínas plasmáticas en la toma 1 y en la toma final

	Toma 1	Toma 5
Recuento total de leucocitos	12,9 × 10 ³ /μL	17,6 × 10 ³ /μL
Neutrófilos	9,93 × 10 ³ /μL	10,38 × 10 ³ /μL
Linfocitos	2,45 × 10 ³ /μL	6,34 × 10 ³ /μL
Monocitos	0,13 × 10 ³ /μL	0,70 × 10 ³ /μL
Proteínas plasmáticas totales	8,2 g/dl	6,0 - 8,5 g/dl
Observaciones	Macroplaquetas y hemólisis	Agregación plaquetaria

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 7 se evidencia un aumento de los leucocitos dentro de la primera toma comparado con los resultados preinoculación, y en la quinta toma el recuento total de leucocitos se encuentra por encima de los valores de referencia, esta leucocitosis ligera con neutrofilia sin desviación a la izquierda nos indica que el sistema inmunológico está respondiendo al veneno.

Dentro de las observaciones, es importante apreciar un aumento en el tamaño de las plaquetas (macroplaquetas), el cual se debe a la respuesta

que tiene la médula ósea ante el estímulo por parte del veneno, bien llamada una trombopoyesis activa. Es importante correlacionar que este aumento en el tamaño de las plaquetas puede ser interpretado por el hemocitómetro como una célula de tamaño similar a un eritrocito y, en ese sentido, es posible que se aumente el ADE a causa de este hallazgo, donde se puede concluir que no necesariamente se deba a cambios de tamaño de los eritrocitos o que esté asociado a alteraciones como la anemia.

Tabla 8. Cuadro comparativo de marcadores bioquímicos

	Inoculación y toma 1	Inoculación y toma 2	Inoculación y toma 3	Inoculación y toma 4	Inoculación y toma 5
ALT (GPT)	17 UI/L	20 UI/L	10 UI/L	7 UI/L	6 UI/L
AST (GOT)	287 UI/L	270 UI/L	280 UI/L	267 UI/L	203 UI/L
Fosfatasa alcalina (ALP)	366 UI/L	563 UI/L	310 UI/L	376 UI/L	570 UI/L
Bilirrubina total	1,1 mg/dl	1,3 mg/dl	0,6 mg/dl	0,9 mg/dl	1,3 mg/dl
Bilirrubina directa	0,45 mg/dl	0,48 mg/dl	0,34 mg/dl	0,27 mg/dl	0,38 mg/dl
Bilirrubina indirecta	0,61 mg/dl	0,80 mg/dl	0,21 mg/dl	0,65 mg/dl	0,89 mg/dl
Albúmina	2,8 g/dl	3,3 g/dl	2,5 g/dl	2,8 g/dl	2,6 g/dl
Proteínas totales séricas	8,0 g/dl	9,0 g/dl	6,7 g/dl	5,2 g/dl	7,5 g/dl
Glucosa	89 mg/dl	207 mg/dl	126 mg/dl	95 mg/dl	104 mg/dl
BUN	31 mg/dl	22 mg/dl	41 mg/dl	42 mg/dl	41 mg/dl

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 8 se puede observar que hay descenso de la ALT desde la segunda hasta la última toma. Los valores de la AST, en todas las tomas, se encontraron dentro de los valores de referencia, siendo el mayor valor el que se obtuvo

en la primera inoculación y el menor resultado en la quinta inoculación, lo que nos dice que esta enzima tiene amplia distribución en los tejidos y que se libera al plasma de las células dañadas de diferentes tejidos, incluyendo el hepático,

el músculo cardiaco, los eritrocitos, las células intestinales y los riñones, y debido a esto no es un indicador específico de enfermedad hepática (Ruiz, *et al.*, 2010).

La bilirrubina es un producto de la degradación de la hemoglobina y es formada por las células reticuloendoteliales del bazo y de la médula ósea, y esta es transportada al torrente sanguíneo por diversas partículas (Benozzi, *et al.*, 2016). Los resultados más bajos se observaron en la toma 3 y 4 con cifras por debajo de los valores de referencia. Según Arboleda, *et al.* (2013), la bilirrubina total tiene mayor participación en el metabolismo, sobre todo si son machos, ya que tienen alto requerimiento energético, alto consumo de oxígeno y mayor producción de glóbulos rojos. El equino de este estudio pudo haber tenido una baja actividad metabólica al momento de la toma 4, sin embargo, en la toma 3 la disminución fue notoria.

La bilirrubina indirecta observada en la toma 3 se encuentra disminuida notoriamente, esto se relaciona con la bilirrubina total, la cual en esa muestra 3 también disminuyó. Como se mencionaba anteriormente, esto es debido a la

alteración hepática causada por el veneno. En cuanto a la glucosa, esta aumentó en la toma 2 y 3, lo que, según Arroyo, *et al.* (2015), se explica porque las variaciones plasmáticas de glucosa se restablecen rápidamente, ya que su síntesis, metabolización y concentraciones sanguíneas son controladas por hormonas y neurotransmisores. Como se evidencia en la tabla 8, en la segunda toma esta tuvo un aumento muy notorio, casi que, duplicándose, pero en la toma siguiente disminuyó considerablemente hasta llegar nuevamente a los valores de referencia.

La concentración de urea comúnmente se reporta como nitrógeno ureico en sangre (BUN) y esta se sintetiza en el hígado a partir del amoníaco, sin embargo, se puede alterar su excreción, principalmente, por dos mecanismos: la tasa de síntesis de urea por los hepatocitos (función hepática) y la tasa de aclaración de la urea por los riñones (filtración glomerular). En este estudio, con base en lo anteriormente mencionado, en este equino no se estaría removiendo la suficiente urea del plasma sanguíneo, por lo cual esta regresaría nuevamente a la sangre y como se observa en la tabla 8, los valores aumentan (Arboleda, *et al.*, 2013).

Tabla 9. Cuadro comparativo de las constantes fisiológicas

Constante fisiológica	Inoculación y toma 1	Inoculación y toma 2	Inoculación y toma 3	Inoculación y toma 4	Inoculación y toma 5
Temperatura	36,7°C	37,9°C	38,2°C	37,9°C	37,3°C
Frecuencia cardíaca	40 lpm	48 lpm	38 lpm	36 lpm	68 lpm
Frecuencia respiratoria	12 rpm	48 rpm	14 rpm	16 rpm	24 rpm
Estado de ánimo	Alerta	Alerta	Alerta	Alerta	Alerta / Ansioso
Mucosas	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa pálido
TLLC	2 seg	2 seg	2 seg	2 seg	2 seg
Sed	+++	+++	+++	+++	++
Alimento	+++	+++	+++	+++	+++

Fuente: Elaboración propia.

Con base en lo observado en la tabla 9, se sabe que los valores de la temperatura se encontraban dentro de los de referencia, la frecuencia cardíaca mostró un aumento significativo en la toma 5 y esto se puede presentar por factores tales como: miedo, estrés, excitación, entre otros. En la segunda toma también se vio un aumento, sin embargo, este corresponde a otras condiciones como el aumento de la temperatura ambiente.

En la última inoculación, al momento de la toma de temperatura, el termómetro salió con pintas de color rojo, lo que se pudo sugerir como melena (sangre digerida). Al momento de evaluar las heces no se evidenció mayor rastro de sangre. En un estudio realizado anteriormente en inoculación de veneno de *Bothrops sp.*, se encontraron alteraciones sanguíneas relacionadas a petequias y hemorragias.

Cambios físicos y comportamentales

Desde el punto de vista clínico se generaron varias alteraciones con el coadyuvante de Freund

incompleto, las cuales causaron daños un poco relevantes, mientras que el segundo vehículo utilizado, Gel Al(OH)₃ no generó mayores daños (Bogado, et al., 2014).

En el lugar donde se realizó la primera inoculación, se observó un ligero aumento de volumen de características fibrosas del lado izquierdo. Además, se produjo una reacción leve al tocar la zona, lo que es un indicativo de dolor local. La segunda inoculación se realizó del lado derecho en la parte craneal de la tabla del cuello, posteriormente a esta inoculación se evidenció un aumento de volumen con características de fibrosis o de un granuloma (imagen 1), además que en ambos lados del cuello se encontraban y se correspondían las inoculaciones anteriores.

Al hacer el respectivo examen, se evidenció el tamaño de estas, siendo la del lado derecho de 14 cm de ancho, 13 cm de largo y en el centro una costra, mientras que por el lado izquierdo la lesión era más pequeña; de 9 cm de largo por 11 cm de ancho y con una forma ovoide. Durante el examen

no se evidenció que estas lesiones incidieran en el movimiento del cuello, pero al palpar se generaba una molestia, con la cual el equino respondía retirándose, aun así, no mostraba alteraciones en su estado comportamental, solo un leve aumento de la temperatura en esa zona aunque la temperatura corporal se encontraba dentro de los parámetros normales (36,7 °C). Este día se realizó la tercera inoculación al lado izquierdo de la tabla del cuello y posterior a la inoculación del veneno se suministró alimento balanceado y agua, mostrando buen apetito y ninguna dificultad o molestia.

Luego de estos resultados, para la administración de la siguiente dosis se esperaron unos días más para que disminuyera el dolor y el granuloma o fibrosis que tenía, para así disminuir la molestia y brindarle bienestar al animal, así que se empezó con un tratamiento para agilizar el proceso de curación: se realizaban baños con sulfato de magnesio y con agua tibia, se aplicó la pomada antiinflamatoria y se procedió a hacer

trenzas en la crin para evitar el constante roce del pelo con los sitios de la herida, ya que eran una fuente de contaminación.

En la primera visita que se realizó con el fin de observar el estado del equino (refiriéndose al tratamiento de los granulomas), este estaba alerta, el manejo fue más fácil en comparación a las visitas anteriores, presentaba buen apetito y buen consumo de agua, también mostró dolor a la palpación de las zonas con inflamación.

En la segunda visita realizada, el caballo se encontraba perfectamente de ánimo, una actitud mansa, presentó buen apetito y sed, la materia fecal era consistente y concordaba con lo fisiológico, la inflamación había disminuido no completamente pero sí aproximadamente un 50 % y ya las heridas estaban en proceso de cicatrización. Nuevamente se realizaron los baños con sulfato en agua tibia y agua fría para finalizar con la aplicación de la pomada.



Imagen 1. Granuloma en la parte derecha de la tabla del cuello

Fuente: Los autores.

Notas de la imagen:

A- Foto tomada de caudal a craneal del lado derecho del cuello, mientras el equino consumía alimento.

B- Granuloma con lesión en proceso de cicatrización.

Cuando se realizó la toma 4, el equino se encontró más dócil que las veces anteriores, posiblemente tuvo relación con el tiempo de espera y las visitas constantes lo que ayudó a mejorar su docilidad y comportamiento. De igual forma que en los casos anteriores, se inoculó y una hora después se procedió a la toma de muestras. Posterior a esta, se evidenció la presencia de abscesos en el lugar de las anteriores inoculaciones, además de confirmar lesiones concordantes con fibromas o granulomas por su tipo de aspecto y consistencia dura.

En un estudio realizado con suero de *Bothrops* y sobre los resultados relacionados a estos, los equinos también generaron abscesos que en ese caso eran múltiples pústulas.

Al realizar la quinta y última inoculación, se realiza nuevamente un chequeo médico y una revisión en la tabla del cuello del lado izquierdo, en el cual ya se veía una mejora avanzada de las pústulas que se habían generado (imagen 2). Se siguió tratando con baños de sulfato y pomada

analgésica y antiinflamatoria, aunque para ese momento estas lesiones ya habían drenado. Por el lado derecho de la tabla del cuello, el granuloma ya se encontraba más cicatrizado y sin fistulas, pero aun con un volumen de tamaño y de consistencia dura, al momento de la palpación el caballo mostraba signos de dolor e incomodidad.

El estado de ánimo era óptimo al momento de realizar la inoculación. Una vez pasada la hora para la toma de muestras sanguíneas, el caballo ya se encontraba ansioso y muy inquieto, giraba la cabeza hacia el lado donde se le colocó la inyección y realizaba gestos bucales referentes al dolor o ardor que le generó la inoculación. Las muestras fueron tomadas y enviadas al laboratorio en los lapsos de tiempo establecidos para el posterior análisis.

Los síntomas locales fueron intensos en el caballo inoculado con veneno, este manifestó lesiones típicas del proceso inflamatorio agudo con edema muy manifiesto, el cual casi no se extendió y estuvo acompañado de dolor y calor, cuestión que evolucionó luego a la formación de un absceso acompañado de áreas necróticas que naturalmente drenaron. Como anteriormente se mencionó, mientras se iban generando más exposiciones al veneno, hubo mayor cantidad de títulos de anticuerpos y esto podría explicar el porqué de la formación del absceso y de las pústulas (Bogado, *et al.*, 2014).

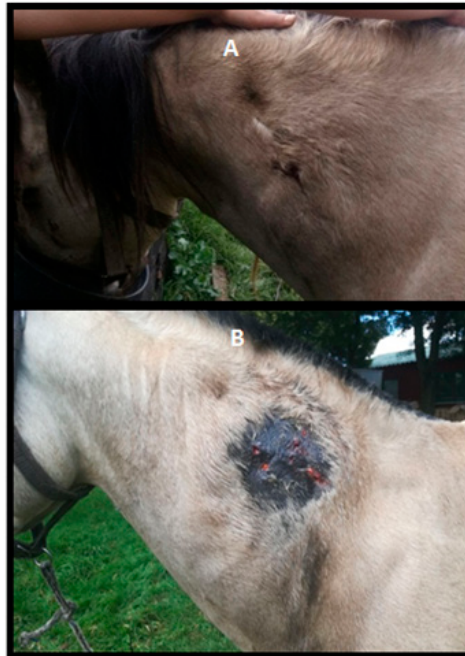


Imagen 2. Absceso en la tabla izquierda del cuello

Fuente: Elaboración propia.

Nota de la imagen:

A- Se evidencia una lesión irregular pequeña sin pústulas ni supuración progresiva.

B- Absceso ya drenado en proceso de cicatrización, tiene pústulas visibles.

Estas lesiones manifiestan la activación del sistema inmunológico y permitieron que se observara la organización del proceso inflamatorio con formación de abscesos de tamaños variables. Según Bogado, *et al.* (2014), las vacunaciones con veneno efectivamente inducen a granulomas y abscesos, siendo esta reacción cada vez más rápida a medida que se colocan las inoculaciones, ya que la respuesta inmune va a ser más pronta y local para combatir ese antígeno, el pus es la acumulación de líquido, glóbulos blancos, tejido muerto y el antígeno que se ataca.

Conclusiones

En este estudio, el equino respondió de manera correcta frente a la pomada (antiflogística, antiinflamatoria y analgésica) y claramente esta herida fue limpiada y controlada, esto mejoró la apariencia de la lesión y la redujo, así mismo se empezó a generar un proceso de cicatrización.

En la literatura se reportan lesiones como abscesos en los equinos inoculados para la producción de suero antiofídico, al igual que en este estudio de caso, donde el equino formó absceso en el lugar de la inoculación, sin embargo, no se presentaron alteraciones sistémicas como sangrados menores o síndromes hemorrágicos, deshidratación, hipotensión o *shock* (Bogado, *et al.*, 2014; Bogado, *et al.*, 2013; Gutiérrez, *et al.*, 2014).

Al centrarnos en este estudio con el protocolo realizado no se generaron efectos

severos que pusieran en riesgo la salud o la integridad del caballo (*shock* anafiláctico, dolor intenso, cólico, necrosis, falla renal o hepática, alteraciones cardiocirculatorias, respuesta neurológica apreciable, etc.) y la reacción solo se limitó a formación de abscesos, fibrosis, granulomas, edema y dolor local.

Referencias

- Angulo, Y., Estrada, R. & Gutiérrez, J. M. (1997). Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. *Toxicon*, 35(1), pp. 81-90.
- Arboleda, D., Hincapie, A. M. y Velásquez, A. (2013). Valores para pruebas de funcionamiento e integridad hepática y renal en el caballo criollo colombiano en algunos municipios pertenecientes al cañón del Cauca, bajo dos sistemas de alimentación. Medellín: Universidad CES Disponible en: <http://bdigital.ces.edu.co:8080/repositorio/bitstream/10946/1020/1/VALORE~1.PDF>
- Arghirescu, S., Bătăneanț, M., Jinca, C., Pașcalău, A., Lelik, M., Preja, M., & Ioniță, H. (2014). Multi-anticoagulant and EDTA dependent pseudothrombocytopenia. Case reports on two pediatric patients. *Romanian Review of Laboratory Medicine*, 22(2), pp. 191-198.
- Arroyo, C., Solano, S., Herrera, M., Segura, Á., Estrada, R., Vargas, M., ... & León, G. (2015). Lachesis stenophrys venom reduces the equine antibody response towards Bothrops asper venom used as co-immunogen in the production of polyspecific snake antivenom. *Toxicon*, 103, pp. 99-105.
- Benozzi, S., Unger, G. y Pennacchiotti, G. (2016). Calidad en la etapa preanalítica: importancia del ayuno. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 50(4), pp. 643-648. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572016000400012&lng=es&tlng=es
- Bhatt, J. V. (2016). Impact of aging (elderly group) on Red blood cell distribution width (Anisocytosis), a comparative study between young and elderly subject. *Indian Journal of Applied Basic Medical Sciences*, 18(27), pp. 88-95.
- Bogado, F., Núñez, S., Mussart, N. B., Leiva, L. y Acosta, O. C. (2013). Cambios clínicos, hemáticos y coagulativos consecuentes al aumento de anticuerpos en equinos productores de suero antiofídico. *Revista veterinaria*, 24(1), pp. 3-9.
- Bogado, F., Núñez, S., Mussart, N. B., Picot, J. A. y García Denegri, M. E. (2014). Acción local de vacunas elaboradas con veneno de *Bothrops alternatus* en equinos productores de suero antiofídico. *Revista veterinaria*, 25(2), pp. 114-119.
- Cardozo, R. O., Tarrago, N. M., Severini, L., Peralta, L. O. y Teibler, G. P. (2016). Restablecimiento de un canino tras mordedura de serpiente "yarará" (*Bothrops* sp.) en Corrientes, Argentina. *Revista veterinaria*, 27(1), pp. 58-61.
- Centro de Información Toxicológica de Veracruz (CITVer). (2014). *Guía de diagnóstico y tratamiento de intoxicación por accidente ofídico bothrópico*. Veracruz: Centro de Información Toxicológica de Veracruz
- De Oliveira, V. C., Lanari, L. C., Hajos, S. E. & De Roodt, A. R. (2011). Toxicity of *Bothrops neuwiedi* complex ("arará chica") venom from different regions of Argentina (Serpentes, Viperidae). *Toxicon*, 57(5), pp. 680-685.

- Donadío Barragué, I. M., Eustathiou Kuster, L. I. y Silva, M. (2016). Efecto de la dominancia social sobre el comportamiento y el estrés crónico en vaquillonas de leche durante el periodo pre-puberal. Montevideo: Universidad de la Republica del Uruguay.
- Fazio, E., Medica, P., Cravana, C., Molinari, P. & Ferlazzo, A. (2014). Effect of experience on adrenocortical and thyroid responses of Arabian horses to gymkhana games. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(6), pp. 799-804
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Sanz, L., Calvete, J. J. & Pla, D. (2014). Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. *Journal of Proteomics*, 105, pp. 340-350.
- Laines, J., Segura, A., Villalta, M., Herrera, M., Vargas, M., Álvarez, G., Gutiérrez, J. M. & Leon, G. (2014). Toxicity of *Bothrops* sp snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. *Toxicon*, 88, pp. 34-37.
- Leonard, N. R., Vicente, O. M., López, M. V. y Frenes, P. S. (2016). Valor semiológico del frotis de sangre periférica en el estudio de las enfermedades virales. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 63(3), pp. 160-165. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2016/pt163h.pdf>
- Martos, N. y Ayala, I. (2003). El estrés en los équidos. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 19, pp. 121-128.
- Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. y Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism, *Journal of Proteomics*, 73 (1) pp. 57-78, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013>
- Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M. B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J. L., ... & Caro, E. (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia: A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40(8), pp. 1107-1114.
- Rodríguez, C., Estrada, R., Herrera, M., Gómez, A., Segura, Á., Vargas, M., ... & León, G. (2016). *Bothrops asper* envenoming in cattle: Clinical features and management using equine-derived whole IgG antivenom. *The Veterinary Journal*, 207, pp. 160-163
- Rojas Leyton, M. V. (2010). *Indicadores sanguíneos de estrés en equinos sometidos a orquiectomía, tratados en base a fenilbutazona o a la combinación de fenilbutazona y tramadol* (tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- Ruiz, J., Zuluaga, D., Ruiz, C. y Estrada, J. (2010). Medición de las enzimas AST y GGT en diferentes estados reproductivos y/o edades en caballo Criollo Colombiano en el Valle de Aburrá. *Rev CES Vet Zootec*; Vol 5 (2): 55-60
- Sánchez, Elda E, Girón, María E, Guerrero, Belsy, Uzcátegui, Néstor L, & Rodríguez-Acosta, Alexis. (2015). Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops Colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 67(2) Recuperado en 07 de diciembre de 2017, de <http://scielo.sld.cu/scielo>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037507602015000200008&lng=es&tlng=es>.

- Segura, Á., Herrera, M., Vargas, M., Villalta, M., Uscanga-Reynell, A., León, G. & Gutiérrez, J. M. (2017). Preclinical efficacy against toxic activities of medically relevant *Bothrops* sp. (Serpentes: Viperidae) snake venoms by a polyspecific antivenom produced in Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 65(1), pp. 345-350.
- Valverde, D. M., Lai-Jwo, T. y Umaña, R. E. (2014). Productividad antiofídica de equinos destinados a la industria inmunobiológica en Costa Rica. *Nutrición animal tropical*, 8(1), pp. 44-54.