

45
2 es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

COMPARACION DE LA CAPACIDAD
NEUTRALIZANTE DE DOS SUEROS ANTIVIPERINOS
POLIVALENTES, CONTRA LOS VENENOS DE
SERPIENTES DE *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
GUSTAVO MIRAMON PEÑA

ASESOR: M. EN C. FRANCISCO RETA MARES.

COASESOR: DR. JUVENCIO RUIZ PUENTE.

COASESOR: Q.F.B. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998.

TESIS CON

264583.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO NACIONAL
DE PROFESIONES
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. D. E. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Comparación de la capacidad neutralizante de dos sueros
Antiviperinos Polivalentes, contra los venenos de serpientes
de Crotalus basiliscus y Bothrops asper.

que presenta el pasante: Gustavo Miramón Peña
con número de cuenta: 8430084-1 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 2 de Febrero de 1998

PRESIDENTE Q.F.B. Patricia Miranda Castro

VOCAL Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya

SECRETARIO Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez

PRIMER SUPLENTE Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez

SEGUNDO SUPLENTE Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz

AGRADEZCO A DIOS:

POR PERMITIR LLEGAR A CULMINAR
ESTA META EN MI VIDA.

A MIS PADRES Y HERMANOS:

POR LA PACIENCIA, APOYO Y CONFIANZA
QUE TUVIERON DURANTE ESTOS AÑOS,
GRACIAS PORQUE SIEMPRE ESTUVIERON
CONMIGO CUANDO MAS LO NECESITE.

A MIS ASESORES:

POR DEPOSITAR SU CONFIANZA EN MI
PARA REALIZAR ESTE TRABAJO, EN
PARTICULAR A FRANCISCO RETA MARES
POR SU AYUDA, CONOCIMIENTOS Y
PRINCIPALMENTE SU AMISTAD.

A EL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION,
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD Y BIOTERIOS,
POR SU GRAN AYUDA "GRACIAS".

INDICE GENERAL

	<u>PAGINA</u>
I.- INTRODUCCION	1
1.1.- HISTORIA	1
1.2.- CLASIFICACION DE SERPIENTES VENENOSAS DE MEXICO	1,2
1.2.1.- CLASIFICACION SEGUN LOCALIZACION DE COLMILLOS	2,3
1.3.- GENERO DE SERPIENTES REPRESENTANTES EN MEXICO	3
1.4.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA	4
1.5.- MORFOLOGIA	6,7
1.6.- REPRODUCCION	9
1.7.- FACTORES QUE INCREMENTAN LA GRAVEDAD DE LA MORDIDA	9,10
1.8.- MANIFESTACIONES CLINICAS	10,11
1.9.- PRUEBAS DE LABORATORIO	11
1.9.1.- GRADO DE INTOXICACION	12
1.9.2.- TRATAMIENTO	13
II.- JUSTIFICACION	14,15
III.- HIPOTESIS GENERAL	16
IV.- OBJETIVO GENERAL	16
4.1.- OBJETIVOS PARTICULARES	16,17
V.- ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	18
5.1.- ESQUEMA DE TRABAJO DE PRUEBAS BIOLOGICAS.	19
VI.- MATERIAL Y METODOS	20
6.1.- VENENOS DE PRUEBA	20
6.2.- DETERMINACION DEL VOLUMEN DE EXTRACCION DE LOS VENENOS	20
6.3.- EVALUACION DE LA POTENCIA DE VENENOS CRUDOS	20-23

	<u>PAGINA</u>
6.4.- DETERMINACION DE LA DOSIS MINIMA LETAL Y TIEMPO DE MUERTE EN COBAYO	23,24
6.5.- EVALUACION DEL NIVEL DE PROTECCION CONTRA LAS FRACCIONES CROTALICA Y BOTROPICA DEL SUERO ANTIVIPERINO	24
6.5.1.- EVALUACION DE LA POTENCIA DE LOS SUEROS	24-30
6.5.2.- PROTECCION DESPUES DEL RETO A 800, 500 Y 250 DE ₅₀	30,31
6.5.3.- PROTECCION DESPUES DEL RETO COMPARANDO LOS DOS SUEROS VOLUMEN CONTRA VOLUMEN	31,32
6.6.- PRUEBAS BIOLÓGICAS DE LOS VENENOS Y SUEROS "in vivo" E "in vitro".	32-42
6.7.- DETERMINAR CARACTERÍSTICAS DE PUREZA DE LOS SUEROS.	42
6.7.1.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY	42-45
6.7.2.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS	45-50
6.7.3.- TINCION DE PLATA	50-52
6.7.4.- ELECTROFORESIS DE ZONA (PERFILES ELECTROFORETICOS)	52,53
VII.- RESULTADOS	54-70
VIII.- DISCUSION	71-76
IX.- CONCLUSIONES	77
X.- APENDICE	78-83
XI.- BIBLIOGRAFIA	84-89

INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	PAGINA
I	Volumen promedio de extracción de venenos retrospectivo a cinco años.	54
II	Volumen promedio de extracción de tres ordeñas por ejemplar.	55
III	Evaluación de la potencia de los venenos crudos.	56
IV	Contenido de proteínas de venenos crudos y sueros (mg/mL) Método de lowry.	56
V	Dosis y tiempo de muerte de veneno crudo de <i>Crotalus basiliscus</i> .	57
VI	Necropsia de cobayos inoculados con veneno crudo de <i>Crotalus basiliscus</i> .	58
VII	Necropsia de cobayos inoculados con veneno crudo de <i>Bothrops asper</i> .	59
VIII	Potencia de los sueros antiviperinos (DE ₅₀).	60
IX	Volumen de sueros para el ensayo de protección.	61

X	Ensayo de protección en cobayos suero I.	62
XI	Ensayo de protección en cobayos suero II.	63
XII	Ensayo de protección con suero antiviperino en cobayo albino comparando frasco vs frasco.	64
XIII	Resultado de las pruebas "in vivo" e "in vitro" de los venenos <i>Bothrops asper</i> y <i>Crotalus basiliscus</i> .	65
XIV	Resultados de la actividad neutralizante de dos sueros antiviperinos polivalentes (Suero I y Suero II) contra los venenos de <i>Bothrops asper</i> y <i>Crotalus basiliscus</i> .	66
XV	Pruebas de neutralización de veneno, expresados en cantidad de proteínas y de IgG requerida.	67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Distribución geográfica de <i>Crotalus basiliscus</i> y <i>Bothrops asper</i> en México.	5
2	Esquema de la cabeza de una Víbora ponzoñosa.	8
3	Electroforesis en gel de poliacrilamida de sueros antiviperinos (15 %), tinción de plata.	68
4	Perfil electroforético de suero antiviperino I.	69
5	Perfil electroforético de suero antiviperino II.	70

GLOSARIO

DL.º Dosis letal 50.

DE.º Dosis efectiva 50.

D.M.H. Dosis Mínima Hemorrágica.

D.M.N. Dosis Mínima Necrozante.

D.M.C-P. Dosis Mínima Cuagulante del plasma.

D.M.D.-C.S.C. Dosis Mínima Desfibrinogenante de Coagulación de Sangre Completa.

SDS-PAGE Geles de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio.

VBa01 Lote de veneno de *Bothrops asper* liofilizado.

VCb03 Lote de veneno de *Crotalus basiliscus* liofilizado.

F.D. Factor de dilución.

S.S.F. Solución salina fisiológica

1.- INTRODUCCION :

1.1.- HISTORIA.

Los primeros vestigios que se conocen de la transición entre anfibios y reptiles aparecen en el período pérmico de la era Paleozoica, 250 a 280 millones de años. (18, 26)

En la era Mesozoica alcanzan su mayor esplendor y florecimiento, aproximadamente 180 millones de años. (15)

Las serpientes probablemente aparecieron en el período Cretácico, hace 78 millones de años. (15, 26)

En la Biblia la serpiente es nombrada y representada, en el génesis como símbolo de la maldad. (26)

En México la serpiente desempeña un papel importante en las diversas culturas prehispánicas, en relieves, murales, piedras labradas o códices, son ejemplos: La Venta en Tabasco, Teotihuacan, Yucatán, Xochicalco, Tula y Tenayuca. (26)

1.2.- CLASIFICACION DE SERPIENTES VENENOSAS DE MEXICO.

Serpientes venenosas de México. (9)

Familia	Subfamilia	No. de Especies	Genero
<i>Hidrophidae</i>		1	<i>Pelamis platurus</i>

Familia	Subfamilia	No. de Especies	Genero
Elapidae		3	<i>Micruroides</i>
		29	<i>Micrurus</i>
Viperidae	Crotalinae	3	<i>Agkistrón</i>
		20	<i>Bothrops</i>
		56	<i>Crotalus</i>
		4	<i>Sistrurus</i>

1.2.1.- SEGUN LA LOCALIZACION DE LOS COLMILLOS EN EL PALADAR, LAS SERPIENTES SE DIVIDEN EN CUATRO GRUPOS PRINCIPALES:

I.- AGLIFAS. Son aquellas que no presentan colmillos inoculadores de veneno, sino dientes en la mandíbula, así como en el maxilar y están entre todas las conocidas con el nombre de "boas" y la gran mayoría de las "culebras", que no producen veneno.

II.- OPISTOGLIFAS. Son aquellas serpientes conocidas en México, como bejuquillos o falsas nauyacac, presentan colmillos pequeños y fijos en la parte posterior del maxilar, su veneno es de baja toxicidad y no causan daño al hombre.

III.- PROTEROGLIFAS. Se caracterizan por presentar un par de colmillos fijos al frente del maxilar, éstos son pequeños y con un canal interno que desemboca en la punta del colmillo, son conocidas como corales o coralillos de la familia *Elapidae* (Cobras). El veneno que producen es principalmente neurotóxico y en muchos casos mortal para el hombre. La serpiente *Pelamis platurus* pertenece a este mismo grupo.

IV.- SOLENOGLIFAS. Estas serpientes son las verdaderas víboras de la familia *Crotalinae*, que comprenden víboras de cascabel, nauyacac o cuatro narices y cantiles o zolcuates. Presentan un par de colmillos retráctiles con un canal cerrado, que va de la base al extremo opuesto, terminando en forma de bisel. Poseen un veneno extremadamente tóxico y son las causantes de más del 90 % de las muertes por mordedura de serpiente que ocurren en todo México. (3,15)

1.3.- EN MEXICO ESTAN REPRESENTADOS LOS SIGUIENTES GENEROS DE LA SUBFAMILIA CROTALINAE: (3, 15)

- a) *Agkistrodon*, (cantil o zolcuate).
- b) *Bothrops*, (nauyaca, cuatro narices, palanca, barba amarilla).
- c) *Crotalus*, (víbora de cascabel).
- d) *Sistrurus* (cascabel de nueve placas).

1.4.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

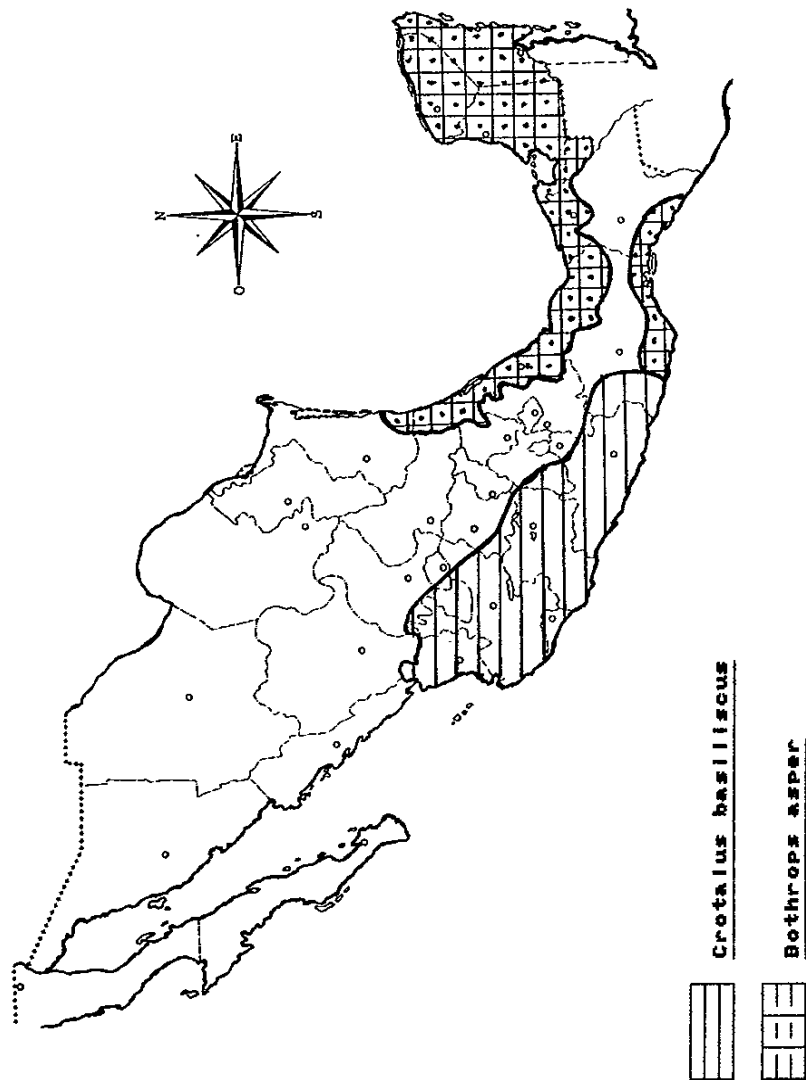
En todo el mundo existen , aproximadamente 2500 especies de serpientes (17), y están ampliamente distribuidas por toda la superficie de la tierra, en las zonas ecuatoriales y con gran diversidad y número de especies entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio, a excepción de los polos. (15)

Bothrops asper tiene amplia distribución geográfica en la zona de baja y mediana altitud, hasta los mil metros; de la vertiente del Golfo de México y el Mar Caribe, desde el Trópico de Cáncer hacia el sur hasta la península de Yucatán y Chiapas, en donde se extiende hasta la región del Soconusco, en la costa del Pacífico; y *Crotalus basiliscus*, de las regiones bajas y de mediana altitud en la costa del Océano Pacífico; se encuentra desde el extremo sur de Sonora hasta Michoacán (figura 1). (9)

La intoxicación por mordedura de serpientes es un problema de Salud Pública a nivel mundial, principalmente en las regiones tropicales, en donde ocurren más de un millón de accidentes por año (5, 32). En México existen más de 600 especies y subespecies de víboras las cuales el 21 % se consideran venenosas. (32)

En nuestro país, la nauyaca (*Bothrops*) y la cascabel (*Crotalus*) son las más importantes desde el punto de vista de Salud Pública. (15, 34) . De esta *Bothrops asper* es la responsable de la mayor cantidad de accidentes. (9, 15)

FIGURA 1. Distribución geográfica de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* en México (9).



1.5.- MORFOLOGIA.

Las serpientes son de cuerpo alargado y cilíndrico, delgado o grueso, pequeñas (*Typhlopidae*) de 10 cm, o muy grandes (*Pythonidae*) de 6 a 10 mts, de cabeza oval o triangular, cilíndrica o aplanada; cuerpo cubierto de escamas córneas imbricadas; esta piel se muda entera y periódicamente varias veces al año. Los ojos sin párpados móviles, están protegidos por una membrana transparente formada por la soldadura de los párpados; la lengua es filiforme larga y bífida muy móvil y protáctil. La columna vertebral está formada por varias vértebras, las costillas existen en gran número y son flotantes careciendo de esternón. No tienen tímpano ni orificio auditivo, son poiquiloterms (sangre fría), aunque la temperatura de su cuerpo es generalmente poco superior a la del medio ambiente. (15)

Al tener un cuerpo cilíndrico y alargado su movimiento es ondulatorio. La forma alargada de su cuerpo está en relación con la pérdida de extremidades, el alargamiento de los órganos internos y la pérdida de un pulmón.

Las características de las serpientes ponzoñosas son: cabeza triangular y bien diferenciada del cuello, pupilas elípticas, foseta lorial (termoreceptora) localizada entre la fosa nasal y los ojos, un par de colmillos sobresalientes y retráctiles, que miden aproximadamente 20 mm; se localizan en el maxilar superior, son acanalados y biselados. Las glándulas ponzoñosas se localizan en la región posterior de la cabeza, en el maxilar superior, y se comunican a los colmillos por un ducto, (en los mamíferos estas

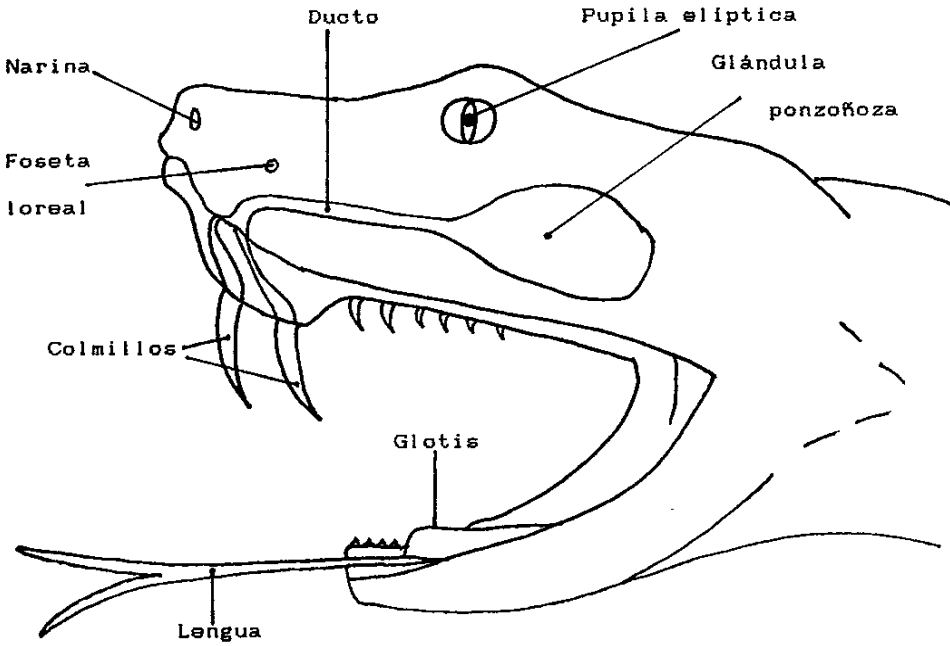
glándulas reciben el nombre de parótidas); presentan escamas rugosas (aquilladas) y ásperas; en el caso de la víbora de cascabel, presentan un apéndice córneo en la punta de la cola. (Figura 2). (15, 26, 27)

Las serpientes son unisexuales, el dimorfismo sexual es poco acentuado, el macho se distingue de la hembra por tener un poco más larga la cola, la fecundación es interna, el macho posee dos testículos globulosos internos, de cada uno de los cuales sale un canal deferente que se une al ureter respectivo, los espermatozoides pasan por los canales deferentes que desembocan en la parte posterior de los uréteres que llegan a los hemipenes, que son dos, y desembocan en la cloaca. (15)

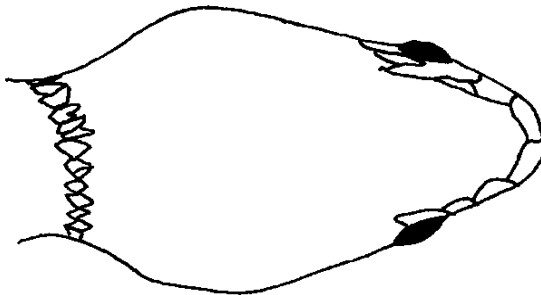
La hembra tiene dos ovarios y dos oviductos, que se abren en su extremo anterior, directamente a la cavidad del cuerpo por medio de la parte ensanchada, en forma de embudo, y van a desembocar su parte posterior en la cloaca. (15)

La cópula, por lo general, se lleva, a cabo una vez al año, y esto sucede con el cambio de estación, ya que dependiendo de las diferentes especies los patrones reproductivos cambian, así que algunas copularán antes de entrar la hibernación, y otras al salir de ella, esto va a depender de las diferentes especies que existen y de los climas en que habiten. Por lo general el periodo de gestación es de 6 a 10 meses. (15)

FIGURA 2. Esquema de la cabeza de una vibora ponzoñosa (3, 9).



- Cabeza triangular cubierta con escamas pequeñas



1.6.- EXISTEN DOS TIPOS DE REPRODUCCION EN LAS SERPIENTES:

a) Las ovíparas. Son aquellas que ponen huevos con cáscara flexible y que se incuban con el calor natural y húmedo del medio ambiente.

b) Las ovovivíparas. Estas mantienen dentro de su cuerpo los huevos contenidos en una membrana transparente, donde se encuentran los embriones que completarán su desarrollo dentro de la madre, y estos son expulsados hasta estar completamente formados. Todas las víboras en México son ovovivíparas a excepción de los coralillos y algunas culebras. (15)

1.7.- LA GRAVEDAD DE LA MORDIDA DEPENDE DE VARIOS FACTORES:

a.- Dosis inoculada de veneno. Esto depende también a su vez, del número de mordidas, profundidad, edad y tamaño de la serpiente.

b.- Susceptibilidad, edad, estado de salud y peso del paciente antes del accidente.

c.- Sitio anatómico de la lesión y profundidad de la mordida.

d.- Tiempo transcurrido entre la mordida y el inicio del tratamiento, ya que algunos estudios indican que dos horas después del accidente, más del 30 % del veneno se ha difundido del sitio de la lesión al resto del cuerpo. (15, 26, 27)

En los accidentes por mordedura de serpientes venenosas, el sexo masculino es el más afectado en relación de 6 a 1, y la edad fluctúa desde recién nacidos a 98 años de edad con un promedio de 31 años. Durante los meses de agosto a noviembre, se ha notado un incremento en el número de casos de pacientes mordidos, que corresponden a la época de más precipitación pluvial. (15)

Con lo que respecta a la región anatómica más afectada, el 36 % es en miembros superiores y 64 % en miembros inferiores. (3)

1.8.- LAS MANIFESTACIONES CLINICAS PRODUCIDAS POR LA INTOXICACION POR MORDEDURA DE VIBORA SON: (3)

SIGNOS Y SINTOMAS	FRECUENCIA %
Marca de los "colmillos"	100
Edema	74
Debilidad	72
Dolor intenso	65
Sudoración y Calosfríos	64
Bradycardia	60
Equimosis	51
Náuseas y vómito	48
Hipotensión	46
Decremento en el número de plaquetas	42
Contracciones musculares	41

Linfadenopatía regional	40
Vesículas	40
Apnea	40
Incremento en el tiempo de sangrado	39
Decremento de la hemoglobina	37
Hipotermia	31
Anomalías electrocardiográficas	26
Necrosis	27
Sialorrea	20
Glucosuria	20
Esferoцитosis	18
Cianosis	16
Hematemesis, hematuria o melena	15
Inconsciencia	12
Visión borrosa	12
Hemorragia retiniana	12
Edema palpebral	12

1.9.- PRUEBAS DE LABORATORIO.

Se debe practicar, biometría hemática, tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina, fibrinógeno, examen general de orina, fosfocreatinquinasa o creatinquinasa (cpk), cultivo de secreciones cuando sea necesario y monitorear cada cuatro horas durante las primeras doce horas del accidente. (15, 26)

1.9.1.- CLASIFICACION DEL GRADO DE INTOXICACION.

- GRADO 0 Marca de los "colmillos". Ningún signo de envenenamiento.
- GRADO I Edema alrededor de la "mordedura".
- GRADO II Dolor intenso, hipersensibilidad, edema hasta la mitad del miembro afectado, petequias, equimosis, acompañado de debilidad, náuseas, vómito, fiebre y linfadenopatía.
- GRADO III Lo anterior y edema de todo el miembro, contracciones musculares petequias generalizadas, hipotensión y choque.
- GRADO IV Edema de aparición rápida, puede afectar la región ipsolateral del tronco, equimosis, formación de bulas, debilidad, vómito, vértigo, hematemesis, fasciculaciones, parálisis ocasional, calambre, visión amarillenta, ceguera, convulsiones, hipotensión, y choque. (15, 27)

1.9.2.- TRATAMIENTO.

El suero antiviperino, es el único tratamiento específico utilizado para neutralizar el veneno de serpientes y su uso es vital en mordeduras graves. En México inicialmente se producía el antiveneno como suero anticrotálico y suero antibotrópico; en la actualidad se dispone de un antisuero de tipo polivalente llamado suero antiviperino polivalente. Se elabora inmunizando caballos con una mezcla de los dos venenos de *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus*. Se ha descrito que este suero neutraliza además los venenos de otras serpientes venenosas mexicanas, a excepción de la coralillo y de las serpientes marinas. Este antisuero consiste de una preparación de inmunoglobulinas purificadas, modificadas por acción enzimática y liofilizadas. (32)

II.- JUSTIFICACION:

Los dos sueros (SUERO I Y SUERO II), se utilizan para el tratamiento específico contra mordeduras de serpientes del género *Bothrops* y *Crotalus*, con diferencias en la formulación que son las siguientes :

Suero antiviperino polivalente (SUERO I) :

Capacidad de neutralizar	Veneno
790 DL.	<i>Bothrops asper</i>
780 DL.	<i>Crotalus basiliscus</i>

Suero antiviperino polivalente (SUERO II) :

Capacidad de neutralizar	Veneno
30 mg de veneno deshidratado	<i>Bothrops atrox</i>
15 mg de veneno deshidratado	<i>Crotalus terrificus</i>

En la bibliografía existe poca información acerca de cuantas DL. deben de ser neutralizadas por una dosis de antisuero. Un folleto publicado por U.S. Department of Health, Education, and Welfare (31), relacionado con requerimientos mínimos de antivenenos, menciona en su punto 4, "Debido a que el antiveneno es suministrado después de la mordedura a diferencia de la prueba de potencia en donde se mezcla con el veneno, una dosis de antiveneno

debe ser suficiente para neutralizar varias veces la cantidad máxima de veneno que podría ser inoculado por una de las especies en cuestión más grandes". A continuación, en este mismo folleto, se da una tabla en la que se establecen los mínimos requerimientos prácticos para varios animales venenosos, en donde aparece una dosis de antiveneno contra *B. atrox* debe de neutralizar aproximadamente 780 DL., y 15 mg de veneno y para *C. t. terrificus* los valores son 1320 DL., y 3 mg de veneno. Por lo tanto se plantea en éste trabajo determinar cuál es la dosis mínima neutralizante de dos sueros antiviperinos polivalentes contra la mordedura *Crotalus basiliscus* producido en México y la capacidad de neutralizar algunas actividades biológicas de los venenos de *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus*, utilizando métodos estandarizados W.H.O. (W.H.O. 1981; THEAKSTON & REID, 1963) así como una comparación por corrimiento electroforetico de zona y en geles de poliacrilamida.

III.- HIPOTESIS GENERAL:

Los sueros antiviperinos polivalentes (suero I y suero II), utilizados a 800, 500 y 250 DE₅₀, serán capaces de dar protección pasiva a cobayos albinos, al ser administrada previamente con una dosis mortal de veneno de *Crotalus basiliscus*, así como neutralizar algunas de las actividades biológicas de los venenos de *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus*

IV.- OBJETIVO GENERAL:

Establecer la dosis mínima neutralizante de dos sueros antiviperinos polivalentes (suero I y suero II) contra los venenos de las serpientes de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*.

4.1.- OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Determinar cuál es el volumen de extracción y la potencia promedio de los venenos de, *C. basiliscus* y *B. asper*.

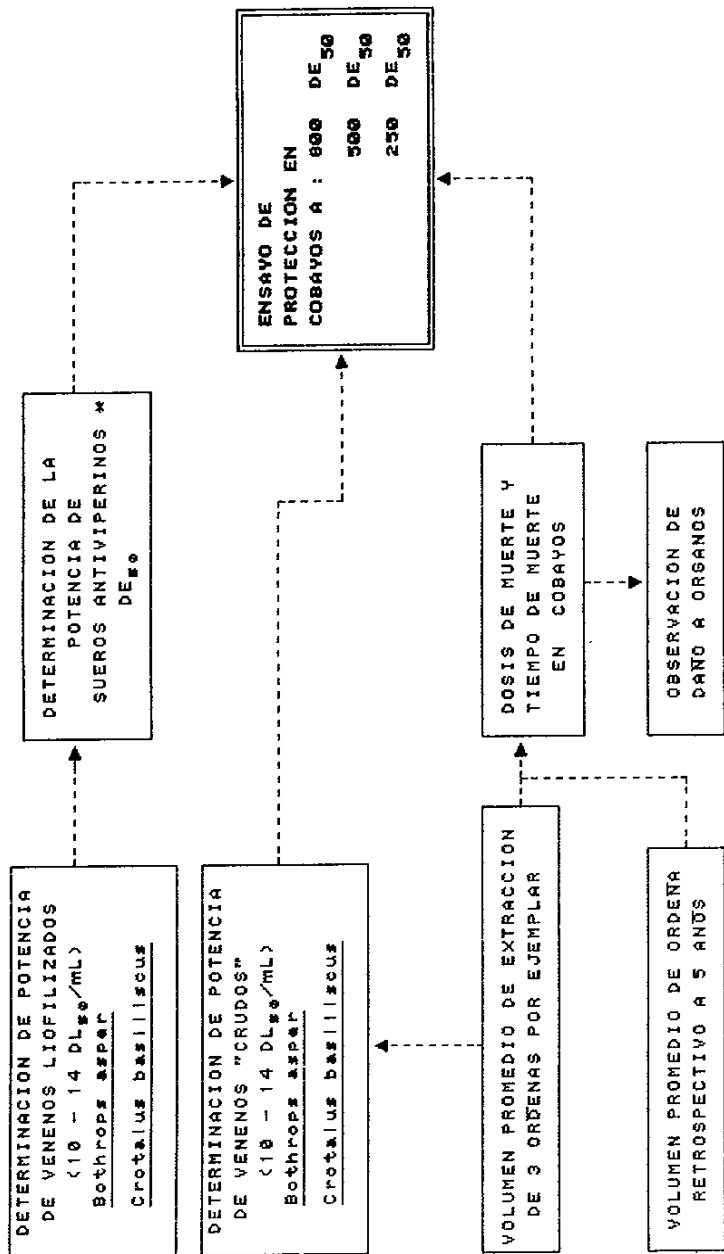
2.- Evaluar la potencia de los dos sueros antiviperinos contra los venenos de, *C. basiliscus* y *B. asper*.

3.- Estudiar la capacidad neutralizante "in vivo" de los dos sueros antiviperinos, después de administrar previamente los venenos.

4.- Estimar la capacidad neutralizante del suero I y de Suero II, contra algunas de las actividades biológicas de los venenos de *C. basiliscus* y *B. asper*.

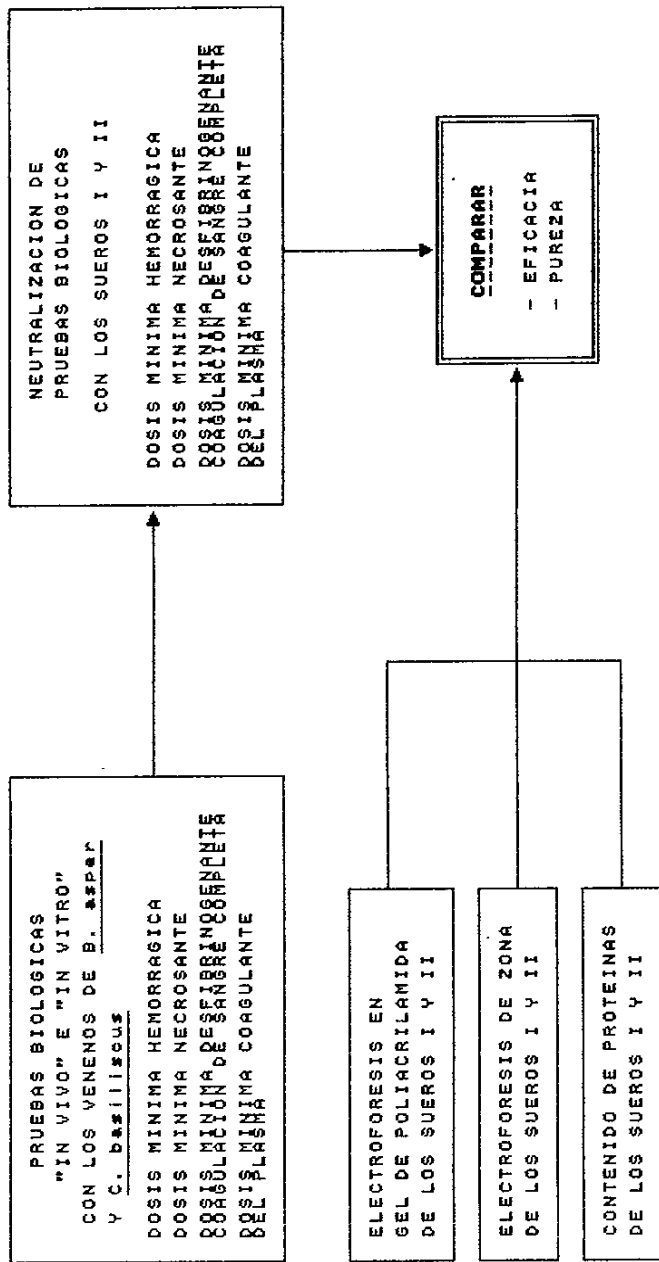
5.- Determinar el contenido de proteínas y de IgG (α , β y γ) como características de pureza de estos dos sueros antiviperinos.

V. - ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



* SUEROS ANTIVIPERINOS:
- SUERO I
- SUERO II

5.1 - ESQUEMA DE TRABAJO DE PRUEBAS BIOLÓGICAS



VI.- MATERIALES Y METODOS:

6.1.- VENENOS DE PRUEBA.

MATERIAL

Los venenos fueron obtenidos de serpientes mantenidas en cautiverio en el Herpetario del Instituto Nacional de Higiene. El veneno extraído, se centrifuga inmediatamente para eliminar impurezas, tomando solamente el sobrenadante y se congela a - 40 °C, hasta el momento de usarse.

6.2.- DETERMINACION DEL VOLUMEN DE EXTRACCION DE LOS VENENOS.

Se realizó un estudio retrospectivo a cinco años de la producción de veneno para, evaluar el volumen promedio de extracción por cada serpiente, se revisaron los años 1991-1995 y se obtuvo promedio por año y por cinco años, además un estudio prospectivo de 3 ordeñas por ejemplar.

6.3.- EVALUACION DE LA POTENCIA DE LOS VENENOS CRUDOS.

Extraer el veneno de las serpientes, *C. basiliscus* y *B. asper* y determinar la DL₅₀ por mililitro de manera individual en ratón de la cepa NIH, utilizando seis animales por dilución. El procedimiento se aplicará de acuerdo al método descrito por la FEUM Sexta edición. (7, 22)

METODOLOGIA

A. Determinación la DL₅₀ de venenos

1) Diluir el veneno en progresión geométrica, con factor constante, usando como diluyente solución de NaCl al 0.85 % .

Puede ser necesario efectuar varias pruebas preliminares para determinar el título del veneno. La serie de diluciones y el factor de dilución deben seleccionarse de manera que la respuesta sea progresiva, el 50 % de mortalidad se encuentre comprendido en la serie, y se obtengan el 0 y el 100 % de mortalidad.

2) De cada dilución inyectar 0.5 mL a cada uno de 6 ratones de 18 a 20 g de peso; administrar este volumen por la vena caudal en un tiempo aproximado de 15 segundos.

3) Observar a los animales al cabo de 24 horas después de la inoculación, anotando los muertos en cada dilución.

4) Calcular la DL₅₀ del veneno por el método de Spearman Kärber, usando como reactores para el cálculo los muertos en un lapso de 24 horas.

Ejemplo :

DL₅₀ .

Título anterior = 4900 DL₅₀ /mL

4900 DL₅₀/mL /12 DL₅₀/mL = 408.33

Dilución: 1:408.33 (0.055 mL de veneno + 22.40 mL S.S.F.)

Factor de Dilución = 1.3

Diluciones adicionales a 1:408.33	Vivos	Muertos	Mortalidad (%)
1:3.55	0	6	
1:4.61	0	6	100
1:6.0	3	3	50
1:7.8	5	1	16.66
1:10.14	6	0	

La dosis que mata el 50 % de los animales está en la dilución 1:6.0. Para determinar el valor exacto de dicha dilución se realiza mediante la siguiente fórmula.

$DL_{50} = - \log \text{ de la dosis del } 100 \% \text{ de mortalidad} - (\text{suma del } \% \text{ de mortalidad en todas las diluciones} / 100 - 0.5) \times \log \text{ F.D.}$

$$DL_{50} = - \log 4.61 - (166.66/100 - 0.5) \times \log 1.3$$

$$DL_{50} = - 0.6637 - 0.1328 = - 0.7963$$

$$DL_{50} = - 0.7963 \text{ antilog.} = 6.26$$

Este valor corresponde a la dosis inoculada en el raton que es de 0.5 mL. Dicho valor significa que es necesario diluir el veneno 1:6.26 para obtener una DL_{50} . Para para obtener la DL_{50}/mL , se multiplica por 2, por consiguiente.

$$6.26 \times 2 = 12.52 \text{ } DL_{50}/\text{mL}$$

Y multiplicar por la dilucion inicial para obtener el titulo del veneno "crudo"

$$408.33 \times 12.52 = 5112.33 \text{ } DL_{50}/\text{mL} \text{ (Titulo del veneno "crudo").}$$

6.4.- DETERMINACION DE LA DOSIS MINIMA LETAL Y TIEMPO DE MUERTE EN COBAYO POR LA ACCION DEL VENENO DE *C. basiliscus* y *B. asper*.

Basandose en el volumen promedio del veneno producido por las serpientes, calculado de acuerdo al punto 6.2 , se establece las dosis que produzca la muerte del cobayo.

Se probaron los siguientes volúmenes como dosis de prueba de veneno: 0.05, 0.025, 0.01 mL de veneno.

Cada dosis de prueba es inyectada por vía intramuscular a 5 grupos de 3 cobayos albinos machos de aproximadamente 400 g de peso. Se selecciona la dosis mínima que produzca el 100 % de mortalidad.

Los animales son observados de 24 a 48 horas durante los cuáles se registran los signos y el tiempo de muerte.

6.5.- EVALUACION DEL NIVEL DE PROTECCION DE LAS FRACCIONES CROTALICA Y BOTROPICA DEL SUERO ANTIVIPERINO.

Esta evaluación se lleva a cabo en dos etapas, la evaluación de la potencia de los sueros y la técnica de reto.

6.5.1.- EVALUACION DE LA POTENCIA DE LOS SUEROS.

Los sueros hiperinmunes antiviperino polivalente I y II de origen equino son titulados inicialmente en ratones albinos machos de cepa NIH de 18-20 g., de acuerdo al procedimiento establecido en la FEUM Sexta edición. (7, 22)

METODOLOGIA

A. Selección de las diluciones de los sueros

1) Calcular el número de DL₅₀/mL que neutraliza el suero, dividiendo el título que indica el marbete entre el volumen promedio. Ej.: $7800/10 = 78 \text{ DL}_{50}/\text{mL}$.

2) Calcular la dilución teórica necesaria del suero para neutralizar 12 DL₅₀, dividiendo el valor obtenido anteriormente entre 12, Ej.: $76/12 = 6.5$

3) Considerar esta dilución como la central de la serie, y con un factor de dilución constante, calcular dos diluciones superiores y dos inferiores a ésta. El factor de dilución se elige de manera que la respuesta sea progresiva (véase Ejemplo).

4) Las diluciones y/o el factor de dilución deben modificarse en caso necesario para que contengan la DE₅₀ y abarquen entre el 0 y el 100 % de sobrevivencia.

B. Procedimiento

1) Diluir el suero en progresión geométrica, con un factor de dilución constante. Usar como diluyente solución de NaCl al 0.85 % estéril.

2) Mezclar 3 mL de cada dilución con un volumen igual de una solución del veneno correspondiente que contenga 12 DL₅₀/mL.

3) Incubar las mezclas por una hora a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

4) Inyectar 0.5 mL de cada una de las mezclas a cada uno de seis ratones de 18 a 20 g, en la vena caudal, procurando que el volumen se inyecte en un tiempo aproximadamente de 15 segundos.

5) Observar el efecto protector del suero a las 24 horas posteriores a la inyección, anotando el número de sobrevivientes y muertos.

6) Calcular la DE₅₀ del suero por el método de Spearman Kärber.

7) Confirmar en paralelo si el veneno utilizado contiene aproximadamente 12 DL₅₀/mL. La prueba se considera válida si se cumplen las condiciones establecidas en 3) y 4) de selección de la diluciones de los sueros, y si el veneno utilizado contiene entre 10 y 14 DL₅₀/mL.

8) Calcular el número de DL₅₀ neutralizadas por frasco, considerando el volumen promedio por frasco y el número de DL₅₀ contenidas en la dilución de veneno utilizada.

DL₅₀

Veneno lote : VBa01 Reconstituir con 31 mL de S.S.F.

VCb03 Reconstituir con 19 mL de S.S.F.

Factor de Dilucion = 1.3

Dilución	Vivos	Muertos	Mortalidad (%)
1:3.55	0	6	100
1:4.61	3	3	50
1:6.0	4	2	33.33
1:7.8	5	1	16.66
1:10.14	6	0	

La dosis que mata el 50 % de los animales está en la dilución 1:4.61. Para determinar el valor exacto de dicha dilución se realiza mediante la siguiente fórmula.

$$DL_{50} = - \log \text{ de la dosis del } 100 \% \text{ de mortalidad} - (\text{suma del } \% \text{ de mortalidad} / 100 - 0.5) \times \log \text{ F.D.}$$

$$DL_{50} = - \log 3.55 - (199.99/100 - 0.5) \times \log 1.3$$

$$DL_{50} = - 0.5502 - 0.1708 = - 0.7210$$

$$DL_{50} = - 0.7210 \text{ antilog.} = 5.26$$

Este valor corresponde a la dosis inoculada en el raton que es de 0.5 mL. Dicho valor significa que es necesario diluir el veneno 1:5.26 para obtener una DL50. Para para obtener la DL₅₀/mL, se multiplica por 2, por consiguiente.

$$5.26 \times 2 = 10.52 \text{ DL}_{50}/\text{mL}$$

Ejemplo del cálculo de potencia del suero.

DE₅₀ ó DP₅₀.

Veneno lote : VBa01 Reconstituir con 31 mL de S.S.F.

VCb03 Reconstituir con 19 mL de S.S.F.

Suero : Suero I Reconstituir con 10 mL de S.S.F.

Suero II Reconstituir con 10 mL de S.S.F.

Factor de Dilución = 2.0

Dilución	Vivos	Muertos	Sobrevivientes (%)
1:1.62	6	0	
1:3.25	6	0	100
1:6.5	5	1	83.33
1:13	4	2	66.66
1:26	0	6	0.0

La dosis en donde sobreviven el 50 % de los animales está en la dilución entre 1:6.5 y 1:13. Para determinar el valor exacto de dicha dilución se realiza mediante la siguiente fórmula.

$DE_{50} = - \log \text{ de la dosis del } 100 \% \text{ de sobrevivencia} - (\text{suma del } \% \text{ de sobrevivencia} / 100 - 0.5) \log F.D.$

$$DE_{50} = - \log 3.25 - (249.99/100 - 0.5) \times \log 2.0$$

$$DE_{50} = - 0.51188 - 0.6019 = - 1.1138$$

$$DE_{50} = - 1.1138 \text{ antilog.} = 12.99$$

Este dato significa que una dilución 1:12.99 del suero neutraliza 2.63 DL50 de veneno en un volumen de 0.25 mL del suero que se inocula en el raton.

$$12.99 \times 2.63 \text{ DL}_{50} = 34.1637 \text{ DL}_{50}$$

Para poder conocer la capacidad neutralizante en 1 mL de suero multiplicar por cuatro, por lo tanto.

$$34.1637 \times 4 = 136.65448 \text{ DL}_{50}/\text{mL}$$

Potencia por frasco: $\text{DL}_{50} \times \text{Volumen del frasco.}$

$$136.65448 \text{ DL}_{50}/\text{mL} \times 10 \text{ mL} = 1366.54 \text{ DL}_{50}/\text{Fco. (10 mL).}$$

Debido a que este suero contiene anticuerpos contra los dos venenos, se diluye el suero y se evalua la actividad especifica retando con el veneno correspondiente.

6.5.2.- PROTECCION DESPUES DEL RETO.

Hacer un grupo de tres cobayos, inocular a cada uno con una dosis mortal de veneno por la via intramuscular (testigo de veneno).

Formar tres grupo de tres cobayos e inocular a cada uno con una dosis mortal determinada en el punto 6.2 de veneno y treinta minutos después (este tiempo puede ajustarse de acuerdo a los

signos que presente cada animal individualmente), inyectando las dosis del suero por la vía intramuscular. El volumen del suero debe corresponder a una capacidad neutralizante de 800, 500 y 250 DL₅₀ por dosis (prueba de protección).

Para el grupo testigo de suero, inocular a un grupo de dos cobayos, el volumen del suero que corresponda a una capacidad neutralizante de 800, 500 y 250 DL₅₀ por dosis. Observar en las mismas condiciones que los grupos problema.

Observar los animales durante 24 a 48 horas registrando las signos y el tiempo de muerte, en caso de que se presente.

6.5.3.- PROTECCION DESPUES DEL RETO COMPARANDO LOS DOS SUEROS VOLUMEN CONTRA VOLUMEN.

Los sueros (suero I y suero II) son reconstituidos con 5 mL de S.S.F.

Formar dos grupos de tres cobayos e inocular a cada uno con una dosis mortal de veneno y treinta minutos después (este tiempo puede ajustarse de acuerdo a los signos que presente cada animal individualmente), proteger a un grupo con un frasco del suero I y al otro grupo con un frasco del suero II por vía intramuscular.

Observar a los animales de manera continua y la administración del suero (el contenido del suero correspondiente) dependerá al estado del animal y a los signos del punto 6.4 . Se sigue administrando el suero observando los signos que presente cada animal individualmente hasta poder salvarle la vida.

Hacer un grupo de dos cobayos, inocular a cada uno con una dosis mortal de veneno por la vía intramuscular (testigo de veneno).

Para el grupo testigo de suero, hacer dos grupos de 1 cobayo, un grupo para el suero I y otro para el suero II, e inocular 5 ml del suero correspondiente. Observar en las mismas condiciones que los grupos problema.

Observar los animales durante 24 a 48 horas registrando los signos y el número de animales vivos y muertos en cada grupo.

6.6.- PRUEBAS BIOLÓGICAS DE LOS VENENOS Y SUEROS "in vivo" e "in vitro". (12, 20, 29, 30, 32).

Esta prueba se realizó de acuerdo a la técnica descrita por la O.M.S. con algunas modificaciones.

- **Dosis Mínima Hemorrágica (DMH):** Se define como la cantidad mínima de veneno (μg de peso seco), el cual al ser inyectado intradérmicamente en cobayos albinos, da como resultado una lesión de 10 mm de diámetro en 24 horas. La DMH se determina por separado para cada uno de los venenos de prueba.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

VENENO (μg)	VOL. VENENO (μl)	VOL SLN. SALINA (μl)
5	5	95
10	10	90
20	20	80
30	30	70
40	40	60
50	50	50

METODOLOGIA: Inocular intradérmicamente el veneno; en la piel rasurada del dorso del cobayo albino macho de 300 g (anestesiado con éter).

LECTURA: Medir el diámetro de la lesión en la superficie interna de la piel en dos direcciones (ángulo recto).

INTERPRETACION: Se calcula graficando el diametro de la lesión contra la dosis de veneno y calculando la dosis que corresponda a un diametro de 10 mm.

- Neutralización de la DMH: Se calcula como la cantidad de suero antiviperino (μ l), que neutralizan completamente la D.M.H.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

D.M.H.	VENENO	VOL. VENENO	VOL. SLN. SALINA	VOL. SUERO *
(μ g)	(μ l)	(μ l)	(μ l)	(μ l)
	40	40	60	0.75
	40	40	60	1.5
	40	40	60	3
	40	40	60	6
	40	40	60	9
	40	40	60	12

* Suero : Suero I y Suero II.

METODOLOGIA: Incubar la mezcla (veneno/suero) a 37 °C/30 minutos, inocular intradermicamente; en la piel rasurada del dorso del cobayo albino macho de 300 g (anestesiado con éter). Incluir testigo de veneno solo y solución salina.

LECTURA: Medir el diámetro de la lesión en la superficie interna de la piel en dos direcciones (ángulo recto).

INTERPRETACION: La prueba se lee como volumen en (μ l) del suero que neutraliza completamente la DMH.

- **Dosis Mínima Necrozante (DMN):** Se define como la cantidad mínima de veneno (μ g de peso seco), el cual al ser inyectado a cobayos, intradermicamente da como resultado una lesión de 5 mm de diámetro en 3 días.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

VENENO (μg)	VOL. VENENO (μl)	VOL SLN. SALINA (μl)
1	1	99
10	10	90
50	50	50
100	100	0
150	150	61.5
200	200	50
250	250	37.5
300	300	25

METODOLOGIA: Inocular intradérmicamente, el veneno; en la piel rasurada del dorso del cobayo albino macho de 300 g (anestesiado con éter).

LECTURA: Medir el diámetro de la lesión en la superficie interna de la piel en dos direcciones (ángulo recto).

INTERPRETACION: La DMN se calcula graficando el diámetro de la lesión contra la dosis de veneno y calculando la dosis que corresponda a un diámetro de 5 mm.

- Neutralización de la DMN: Se calcula como la cantidad de suero antiviperino (μ l), que neutraliza completamente la D.M.N.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

D.M.N.	VOL. VENENO	VOL. SLN. SALINA	VOL. SUERO *
(μ g)	(μ l)	(μ l)	(μ l)
100	100	0	4
100	100	0	8
100	100	0	12
100	100	0	16
100	100	0	20
100	100	0	24

* Suero : Suero I y Suero II.

METODOLOGIA: Incubar la mezcla (veneno/suero) a 37° C/30 minutos, inocular intradermicamente en la piel rasurada del dorso del cobayo albino macho de 300 g (anestesiado con éter).

LECTURA: Medir el diámetro de la lesión en la superficie interna de la piel en dos direcciones (ángulo recto).

INTERPRETACION: La prueba se lee como volumen en (μ l) del suero que neutraliza completamente la DMN.

- **Dosis Mínima Desfibrinogenante (DMD-CSC):** Se define como la cantidad mínima de veneno (μ g de peso seco), el cual después 60 minutos de ser inyectado por vía intravenosa a ratones (18-20 g), evita la coagulación de la sangre.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

VENENO (μ g)	VOL. VENENO (μ l)	VOL SLN. SALINA (μ l)
5	20	360
6	24	376
7	28	372
8	32	368
9	36	364
10	40	360

METODOLOGIA: Inocular el veneno en la vena caudal de ratones NIH 18-20 g.

LECTURA: Medir el tiempo de coagulación de sangre completa.

INTERPRETACION: Se lee como la cantidad mínima de veneno (μg de peso seco), que después de 60 minutos de ser inyectado por vía intravenosa a ratones (18-20 g), evita la coagulación de la sangre.

- **Neutralización de la DMD-CSC:** Se define como la cantidad de suero antiviperino (μl), que neutraliza la desfibrinogénación, (sangre incoagulable) de la D.M.D. de el veneno.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

D.M.D.			
VENENO	VOL. VENENO	VOL. SLN. SALINA	VOL. SUERO *
(μg)	(μl)	(μl)	(μl)
7	28	372	0.5
7	28	372	0.6
7	28	372	0.7
7	28	372	0.8
7	28	372	0.9

* Suero : Suero I y Suero II.

METODOLOGIA: Inocular la mezcla (veneno/suero) en la vena caudal de ratones NIH 18-20 g.

LECTURA: Medir el tiempo de coagulación de sangre completa.

INTERPRETACION: Se lee como la cantidad de suero antiviperino (μ l), que neutraliza la defibrinogénación, (sangre incoagulable) de la D.M.D. de el veneno.

- Dosis Mínima Coagulante (DMC-P): Se define como la cantidad mínima de veneno (μ g de peso seco por litro de solución de prueba), que produce la coagulación del plasma humano en 60 segundos a 37 °C.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

VENENO (μ g)	VOL. VENENO (μ l)	VOL SLN. SALINA (μ l)	VOL. PLASMA HUMANO (mL)
640	32	18	0.1
680	34	16	0.1
720	36	14	0.1
760	38	12	0.1
800	40	10	0.1

METODOLOGIA: Incubar la mezcla (veneno/plasma) a 37 °C/60 segundos.

LECTURA: Medir el tiempo de coagulación del plasma humano.

INTERPRETACION: Se calcula como la cantidad mínima de veneno (μg de peso seco por litro de solución de prueba), que produce la coagulación del plasma humano en 60 segundos a 37 °C.

- **Neutralización de la DMC-P:** Se define como la cantidad de suero antiviperino (μl), que previene completamente la coagulación del plasma humano, como efecto de la D.M.C.

Preparar una solución de veneno:

B. asper (VBa01) y *C. basiliscus* (VCb03) a 1 mg/mL.

VENENO (μg)	VOL. VENENO (μl)	VOL SLN. SALINA (μl)	VOL. PLASMA HUMANO (mL)	VOL. SUERO * (μl)
760	38	12	0.1	1
760	38	12	0.1	2
760	38	12	0.1	3
760	38	12	0.1	4
760	38	12	0.1	5

* Suero : Suero I y Suero II.

METODOLOGIA: Incubar la mezcla (veneno/suero) a 37 °C/60 segundos, y posteriormente adicionar el plasma.

LECTURA: Medir el tiempo de coagulación del plasma humano.

INTERPRETACION: Se calcula como la cantidad de suero antiviperino (μ l), que previene completamente la coagulación del plasma humano, como efecto de la D.M.C.

6.7.- DETERMINAR CARACTERISTICAS DE PUREZA DE LOS SUEROS ANTIVIPERINOS.

6.7.1.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY. (10,16).

FUNDAMENTO: El reactivo de ácido fosfotúngstico-molibdicoo oxida compuestos fenólicos en condiciones alcalinas, reduciendo así su color inicial (amarillo oro) a un color azul intenso. Las proteínas que contienen residuos de triptófano e histidina (aminoácidos que contienen grupos indol e imidazol), tirosina (aminoácido que contiene una porción fenólica) y fenilalanina absorben la luz UV a 280 nm en un forma proporcional a su concentración. (21)

La determinación de la concentración de proteínas puede hacerse directamente por la absorción de la UV, permitiendo recuperar el material. Sin embargo algunos detergentes y amortiguadores absorben considerablemente a la luz a esta longitud de onda. Por tal motivo es necesario emplear métodos colorimétrico como el desarrollado por OLIVER H. LOWRY.

En esta técnica, se construye una curva estandar de color contra concentración de proteína conocida con el reactivo de fenol Folin Ciocalteus. El color azul generado por la solución de la proteína problema puede ser interpolado a unidades de concentración utilizando la curva estandar.

PROTOCOLO DE TRABAJO:

Elaborar la curva con los reactivos y muestras problema a temperatura ambiente, de acuerdo a la tabla que a continuación se muestra.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
µg de proteína	0	10	20	30	50	100	150	200	250

µl de STD-BSA	0	10	20	30	50	100	150	200	250
---------------	---	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----

(Soln. 1)

µl NaCl 0.85 %	400	390	380	370	350	300	250	200	150
----------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
µg de proteína	0	10	20	30	50	100	150	200	250

mL Mezcla de reacc	2	2	2	2	2	2	2	2	2
--------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(Sin. IV)

REPOSAR DURANTE 10 MINUTOS

µl React. Folin	200	200	200	200	200	200	200	200	200
-----------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

(Sin. VI)

MEZCLAR Y REPOSAR A TEMPERATURA AMBIENTE Y EN OSCURIDAD 30 MINUTOS,
LEER A 500 nm.

Tubo	Problema 1	Problema 2	Problema 3
µg de proteína	20	50	200
µl de STD-BSA	0	0	0
(Sin. I)			
µl NaCl 0.85 %	380	350	200
mL Mezcla de reacc	2	2	2
(Sin. V)			

REPOSAR DURANTE 10 MINUTOS

µl React. Folin	200	200	200
-----------------	-----	-----	-----

(Sin IV)

MEZCLAR Y REPOSAR A TEMPERATURA AMBIENTE Y EN OSCURIDAD 30 MINUTOS,
LEER A 500 nm.

GRAFICAR: Concentración Vs. D.O.

- Tratar la muestra problema como uno de los puntos de la curva
(ejem: Usar 50 µl de muestra problema + 350 µl de NaCl 0.85 % + 2
mL de la Mezcla de reacción y 200 µl de Folin).

- Si los valores de absorbancia de sus problemas, no caen dentro del intervalo de los valores de la curva, diluya la muestra y repita la determinación, solo para el problema si la realiza el mismo día, o la curva y el problema si la realizó un día diferente.
- Si incluye el problema, como dos o más puntos de la curva (ejem: Usar 50 y 100 µl del problema), y los valores de absorbancia caen dentro de los de la curva, se hace un promedio de absorbancia para los calculos. No tome en cuenta aquellos valores que no entren en la curva.
- Calcular el contenido de proteínas de la(s) muestra(s) problema por el método de mínimos cuadrados (Regresión Lineal).

6.7.2.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (PolyAcrylamide Gels Electrophoresis, PAGE-SDS) al 10 y 15 %. (8 10, 13).

La electroforesis de las proteínas en el gel, se basa en la formación de un campo eléctrico, en donde se deja que las muestras corran del cátodo (polo negativo) al ánodo (polo positivo) a 30 miliampers durante aproximadamente 1 hora hasta que el frente colorido de las muestras se encuentran a +/- 0.5 cm del final del gel.

PROCEDIMIENTO:

1.- GEL SEPARADOR: Se utiliza una unidad para geles verticales de 10 x 10 cm, 0.75 cm de grosor. Se lavan perfectamente 2 placas de vidrio con detergente neutro. Se enjuaga con agua bidestilada y se sumerge en una solución de metanol al 5 %. Se secan los vidrios con un algodón. Se montan los vidrios en el aparato de acuerdo a las instrucciones del mismo.

2.- En un matraz Kitasato de 125 mL se colocan los siguientes reactivos (suficiente para un gel):

CAMARA CHICA:

GEL SEPARADOR	<u>7.5 %</u>	<u>10 %</u>	<u>11.5 %</u>	<u>12.50 %</u>
Sln. de monomeros				
Acrilamida				
(Sln. VI)	1.87 mL	2.5 mL	2.87 mL	3.12 mL
Tris HCL 1.5 M				
pH = 8.8				
(Sln. VII)	1.87 mL	1.87 mL	1.87 mL	1.87 mL
H ₂ O Bidestilada	3.63 mL	3.0 mL	2.63 mL	2.38 mL
SDS 10 % (Sln. IX)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
	S E	E L I M I N A	A I R E	
Temed (Sln. XI)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Persulfato de				
amonio 10 % (Sln. X)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

GEL SEPARADOR	<u>15 %</u>	<u>17.5 %</u>	<u>20 %</u>
---------------	-------------	---------------	-------------

Sin. de monomeros

Acrilamida

(Sin. VI)	3.75 mL	4.37 mL	5.0 mL
-----------	---------	---------	--------

Tris HCL 1.5 M

pH = 8.8

(Sin. VII)	1.87 mL	1.87 mL	1.87 mL
------------	---------	---------	---------

H ₂ O Bidestilada	1.75 mL	1.13 mL	0.50 mL
------------------------------	---------	---------	---------

SDS 10 % (Sin. IX)	150 µl	150 µl	150 µl
--------------------	--------	--------	--------

S E E L I M I N A A I R E

Temed (Sin. XI)	10 µl	10 µl	10 µl
-----------------	-------	-------	-------

Persulfato de

amonio 10 % (Sin. X)	50 µl	50 µl	50 µl
----------------------	-------	-------	-------

3.- Se agita cuidadosamente para que no se formen burbujas y se vierte la mezcla entre las placas de vidrio hasta aproximadamente 3.5 cm del borde superior.

4.- Se coloca alrededor de 1.0 mL de l-propanol sobre la superficie de la acrilamida, dejandola caer suavemente por uno de los extremos. Este paso es muy importante para favorecer la polimerizacion apropiada ya que el oxigeno interfiere con la misma.

Cuando la gelificación ocurre se observa una interfase bien definida entre el isopropanol y el gel.

5.- Se inclinan las placas para remover el l-propanol y se lavan las superficies de los geles 3 veces con agua bidestilada.

7.- GEL CONCENTRADOR: Se remueve el liquido de la superficie de los geles y se escurren bien.

8.- Se coloca en un matraz Kitasato los siguientes reactivos:

CAMARA CHICA

GEL CONCENTRADOR	5 %
Sln. de monomeros	
Acrilamida	
(Sln. VI)	625 µl
Tris HCL 0.5 M	
pH = 6.8	
(Sln. VIII)	937.5 µl
H ₂ O Bidestilada	2.125 mL
SDS 10 % (Sln. IX)	37.5 µl
S E E L I M I N A A I R E	
Temed (Sln. XI)	10 µl
Persulfato de	
amonio 10 % (Sln. X)	50 µl

Se agita cuidadosamente y se vierte la mezcla sobre el gel separador.

Se coloca el peine apropiado acomodandolo de tal manera que no se formen burbujas en la interfase de los dos geles y se espera la polimerizacion del gel.

9.- Se remueve el peine cuidadosamente y se enjuagan los canales con agua bidestilada 5 veces.

10.- Se conectan las muestras con el regulador no reductor de muestra (Sin. XIII) y los marcadores de peso molecular utilizando una jeringa Hamilton, ésta se debe de enjuagar 10 veces con SDS al 1 % después de cada muestra diferente. Nunca se debe de enjuagar con agua sola.

11.- Se colocan los cables al aparato y a la fuente de poder y se vierte regulador de corrimiento (Sin. XII). Se aplican 15-30 mA/placa de corriente constante, luego que las muestras entran al gel separador la corriente se aumenta a 30-60 mA/placa.

12.- Se mantiene el corrimiento hasta que el azul de bromofenol llegue a unos 0.5 cm del final de la placa.

13.- TINCION CON AZUL DE COOMASIE (Sin. XIV): El gel se sumerge en un recipiente que contenga alrededor de 50 mL del colorante y se deja reposar durante toda la noche.

14.- Se remueve el colorante y se agrega el decolorante (Sin. XV), se hacen tantos cambios como sea necesario hasta lograr la nitidez de las bandas.

15.- Los geles se sumergen en glicerol (Sin. XVI) y posteriormente se secan.

6.7.3.- TINCION DE PLATA. (19)

1.- FIJACION:

Para geles convencionales fijar con tres cambios de solucion fijadora cada 20 minutos. Para geles ultrafinos fijar con tres cambios de 10 minutos (Sin. XVII).

2.- LAVADO CON AGUA:

Para geles convencionales lavar tres veces cada 10 minutos con agua desionizada. Para geles ultrafinos fijar tres veces cada 5 minutos con agua desionizada. Vertir el agua cuando haya terminado.

3.- TINCION DE PLATA:

Para geles convencionales o ultrafinos, equilibrar con la solución de plata (Sin. XVIII) en agitación suave durante 30 minutos. Vertir la solución cuando haya terminado.

4.- LAVADO RAPIDO DE AGUA:

Para geles convencionales o ultrafinos, lavar de 10-20 segundos con agua desionizada. Vertir el agua cuando haya terminado.

5.- REVELADO DEL GEL:

Adicionar 50 mL de la solución reveladora (Sin. XIX) sobre el gel. Después de 5-8 minutos eliminar la solución, y adicionar otros 50 mL de la solución reveladora (Sin. XIX), observar cuidadosamente hasta conseguir el oscurecimiento de las bandas, y a su vez que reduzca el color amarillento del gel.

6.- DETENER EL REVELADO:

Eliminar la solución de revelado y rápidamente adicionar la solución de paro (Sin. XX) durante 5 minutos.

7.- LAVADO CON AGUA:

Para geles convencionales lavar tres veces cada 10 minutos con agua desionizada. Para geles ultrafinos fijar tres veces cada 5 minutos con agua desionizada. Vertir el agua cuando haya terminado.

8-9.- LAVAR CON LA SOLUCION REDUCTORA/ENJUAGAR CON AGUA:

Poner los geles en la solución reductora (Sin. XXI) de 10-30 segundos. Retirar la solución reductora e inmediatamente enjuagar con agua de la llave aproximadamente 1 minuto.

2.- Colocar la membrana en el aparato de electroforesis y adicionar Buffer de veronal (Sin. XXII), para correr la muestra 200 μ A/5 Volts durante 25 minutos.

3.- Revelado de las muestras, se distribuyen los reactivos de acuerdo al siguiente orden:

Charola 1.- Colorante Rojo de Ponceau (segun la especificación de la casa)/10 minutos.

Charola 2,3 y 4.- Se reparte el ácido acético con agua de ósmosis inversa (Sin. XXIII)/1 minuto.

Charola 5.- Se pone unicamente metanol/1 minuto.

Charola 6.- Se pone ácido acético con metanol (Sin. XXIV), volumen total 100 mL)/1 minuto.

4.- Se procede a colocar la membrana en una loseta de vidrio (Glass slides, 5.7 cm x 7.0 cm, Gelman Sciences Inc.).

5.- Se deja secar 1 minuto en estufa a 37 °C y espera a que se enfríe a temperatura ambiente colocar en la base especial del aparato (Trademark of Beckman Instruments Company, Sepratek or Microzone) que nos da los gráficos.

VII.- RESULTADOS:

En la tabla número I se muestran los resultados del volumen promedio de extracción de venenos, estos resultados fueron obtenidos de la bitácora de producción de venenos del Herpetario del Instituto Nacional de Higiene.

TABLA I.- VOLUMEN PROMEDIO DE EXTRACCION DE VENENOS
RETROSPECTIVO A CINCO AÑOS

<i>C. basiliscus</i>			<i>B. asper</i>		
AÑO	VOLUMEN (mL)		VOLUMEN (mL)		
1991	0.69	mL	0.5285	mL	
1992	0.5333	mL	0.5768	mL	
1993	0.5807	mL	0.6333	mL	
1994	0.5309	mL	0.5860	mL	
1995	0.6388	mL	0.6480	mL	
	X = 0.5947	mL	X = 0.5945	mL	
	MAXIMO = 0.78	mL	MAXIMO = 0.83	mL	
	MINIMO = 0.3	mL	MINIMO = 0.59	mL	

También se realizó un estudio prospectivo de tres ordeñas 15-20 serpientes de las dos especies en cada ordeña, el veneno fue recolectado en jeringas de insulina para medir el volumen mínimo que inocular una serpiente, éste fue de 0.3 mL (tabla II).

TABLA II.- VOLUMEN PROMEDIO DE EXTRACCION DE 3 ORDEÑAS POR EJEMPLAR

<i>C. basiliscus</i>	<i>B. asper</i>
X = 0.646 mL	X = 0.80 mL
MAXIMO = 1.08 mL	MAXIMO = 1.66 mL
MINIMO = 0.3 mL	MINIMO = 0.3 mL

En la evaluación de la actividad de los venenos se calculó la DL₅₀ de acuerdo a la metodología descrita para los venenos liofilizados, la prueba se realizó cuatro veces, procurando que la dilución empleada en los venenos estuviese dentro de 10-14 DL₅₀ y obteniendo subsecuentemente un promedio respectivo a cada veneno, los valores se expresan en la tabla III.

TABLA III.- EVALUACION DE LA POTENCIA DE LOS VENENOS CRUDOS

	Dilucion		DL ₅₀ /mL
Veneno	del Veneno	10-14	DL ₅₀ /mL Veneno crudo
<i>C. basiliscus</i>	1:408.33	12.52	5112.3
<i>B. asper</i>	1:1280.00	13.61	17012.50

Para el cálculo en el contenido de proteínas de los venenos crudos y sueros antiviperinos, la cuantificación se realizó a un lote para el suero I y dos lotes para el suero II por el método descrito por Lowry, tabla número IV.

TABLA IV.- CONTENIDO DE PROTEINAS EN VENENOS CRUDOS Y SUEROS
(mg/mL) METODO DE LOWRY

Venenos	Proteínas mg/mL
<i>C. basiliscus</i>	935.35
<i>B. asper</i>	76637
Sueros	Proteínas mg/mL
Suero I	51.68
Suero II	43.73

La dosis y tiempo de muerte se realizó en cobayos albinos

machos de 400 g de peso, se realizaron ensayos inoculando volúmenes de 0.1 a 0.4 mL, pero casi instantáneamente morían, por lo que se realizaron ensayos con volúmenes de 0.01 a 0.05 mL seleccionando un volumen de 0.025 mL como el óptimo que representa la dosis mínima de muerte para realizar la prueba de protección con los sueros antiviperinos (tabla número V).

Tabla V.- DOSIS MINIMA MORTAL Y TIEMPO DE MUERTE

VENENO CRUDO

Crotalus Basiliscus

ESPECIE	VOL VENENO (mL)	DL ₅₀	TIEMPO DE MUERTE (Hrs.)	
			x Cobayo	Promedio
<i>Crotalus</i>	0.05	255.6	4:12	4:31
			4:51	
<i>basiliscus</i>	0.025	127.8	7:34	>7:00
			>7:34	
	0.01	51.12	Sobrevivio	
			>7:00	

Como consecuencia de la muerte de los cobayos ocasionada por la administración de los venenos, se realizaron necropsias estudiando las lesiones macroscópicas, estas lesiones se resumen en las tablas número VI y VII.

Tabla VI.- NECROPSIA DE COBAYOS INDCULADOS CON VENENO CRUDO

VENENO DE *C. basiliscus*

ORGANO	COBAYO 1	COBAYO 2
BLANCO		
VIA DE ENTRADA	CONGESTIONADA	CONGESTIONADA
PULMON	NORMAL	NORMAL
CORAZON	HEMORRAGICO	HEMORRAGICO
HIGADO	BORDES REDONDEADOS, FRIABLE, HEMORRAGICO	BORDES REDONDEADOS, FRIABLE, HEMORRAGICO
BAZO	NORMAL	NORMAL
RINON DERECHO	NEFRITIS, HEMORRAGICO	NEFRITIS, HEMORRAGICO
RINON IZQUIERDO	NEFRITIS, HEMORRAGICO	NEFRITIS, HEMORRAGICO
INTESTINO DELGADO	NORMAL	HEMORRAGICO
ESTOMAGO	NORMAL	NORMAL
OTROS	CAVIDAD PERITONEAL HEMORRAGICO	CAVIDAD PERITONEAL HEMORRAGICO

TABLA VII.- NECROPSIA DE COBAYOS INOCULADOS CON VENENO CRUDO

VENENO DE *B. asper*

ORGANO	COBAYO 1	COBAYO 2
BLANCO		
VIA DE ENTRADA	CONGESTIONADA	CONGESTIONADA
PULMON	NORMAL	NORMAL
CORAZON	HEMORRAGICO	CONGESTIONADO
HIGADO	BORDES REDONDEADOS, FRIABLE, HEMORRAGICO	BORDES REDONDEADOS, FRIABLE
BAZO	NORMAL	NORMAL
RINON DERECHO	NEFRITIS	NEFRITIS, HEMORRAGICO
RINON IZQUIERDO	NEFRITIS	NEFRITIS, HEMORRAGICO
INTESTINO DELGADO	HEMORRAGICO	HEMORRAGICO
ESTOMAGO	NORMAL	NORMAL
OTROS	NORMAL	CAVIDAD PERITONEAL HEMORRAGICO

En la evaluación de la potencia de los sueros antiviperinos polivalentes se calculó la DE_{50} con los venenos liofilizados en contra de los dos venenos *B. asper* y *C. basiliscus*, realizandose varias determinaciones y obteniendo un promedio para cada fracción estos se observan en la tabla número VIII.

TABLA VIII.- POTENCIAS DE LOS SUEROS ANTIVIPERINOS (DE_{50})

SUERO I: Determinado con el veneno liofilizado de	
referencia (control biológico-I.N.H.).	
Contra la fracción Botrópica = 1033.05 DE/Frasco (10 mL).	
Contra la fracción Crotálica = 1330.68 DE/Frasco (10 mL).	

SUERO II: Determinado con el veneno liofilizado de	
referencia (control biológico-I.N.H.).	
Contra la fracción Botrópica = 4775.45 DE/Frasco (10 mL).	
Contra la fracción Crotálica = 1784.69 DE/Frasco (10 mL).	

De acuerdo a la potencia de los sueros, obtenida en contra de los dos venenos, se determinó el volumen de suero que se administró en el ensayo de protección con base a la fracción crotálica (tabla número IX).

TABLA IX.- VOLUMEN DE SUEROS PARA EL ENSAYO DE PROTECCION

- Ensayo de protección en base a la fracción Crotálica.

SUERO I	SUERO II
800 DE ₅₀ = 6.01 mL	800 DE ₅₀ = 4.8 mL
500 DE ₅₀ = 3.75 mL	500 DE ₅₀ = 3.0 mL
250 DE ₅₀ = 1.87 mL	250 DE ₅₀ = 1.6 mL

Para el ensayo de protección de los sueros I y II, se retaron a cobayos albinos machos de 400 g de peso con 0.025 mL de veneno por vía intramuscular y después de aproximadamente treinta a cuarenta minutos, se administró el volumen de suero correspondiente a 800, 500 y 250 DE₅₀ (tablas número X y XI).

Al no obtener una protección con dosis fijas, es decir 800, 500 y 250 DE₅₀, se realizó un segundo ensayo en donde se compararon los sueros I y II (frasco contra frasco), para esto se tomo en cuenta los signos que presentaban los animales individualmente, para ir administrando los sueros, los resultados se observan en la tabla número XII.

Tabla X.- ENSAYO DE PROTECCION EN COBAYO ALBINO

RETO: *Crotalus basiliscus*/Suero I

Sexo: Machos, Peso: 400 g

Vía de inoculación del veneno y suero: Intramuscular.

				TIEMPO DE MUERTE (Hrs.) PDR	
NUMERO ANIMALES		RETO	DE ₅₀ *	COBAYO	PROMEDIO
E N S A Y O P R O T E C C I O N	3	0.025 mL DE VENENO CRUDO	800	1:59	3:12
				2.01	
				5:36	
	2		500	5:55	5:49
				5:43	
				3:15	
3	250	3:58	> 8:24		
		> 12:00			
T E S T I G E N O D E	1 2 3	0.025 mL DE VENENO CRUDO	SLN. SALINA	INMEDIATO	2:10 (3:17)
				1:09	
				5:25	
T E S T I G E R O D E	1	-----	1 FRASCO	-----	-----

* EL SUERO SE INOCULO 30 A 40 MINUTOS DESPUÉS DEL RETO

Tabla XI.- ENSAYO DE PROTECCION EN COBAYO ALBINO

RETO: *Crotalus basiliscus*/Suero II

Sexo: Machos, Peso: 400 g

Vía de inoculación del veneno y suero: Intramuscular.

				TIEMPO DE MUERTE (Hrs.) POR	
NUMERO ANIMALES		RETO	Dosis*	COBAYO	PROMEDIO
E N S A Y O P R O T E C C I O N	3	0.025 mL DE VENENO CRUDO	800	3:13	21:09
				16:43	
				31:13	(29:28)
	3		500	3:11	
				3:11	4:20
				5:20	
3	250	4:02			
		5:33	6:26		
	8:00				
T E S T I G O D E	1	0.025 mL DE VENENO CRUDO	SLN. SALINA	5:11	5:23
	2			5:36	
T E S T I G O D E	S U E R O	1	1		
		FRASCO			

* EL SUERO SE INDCULO 30 A 40 MINUTOS DESPUES DEL RETO

TABLA XI I. -- ENSAYO DE PROTECCION CON SUEROS
ANTI VIPERINOS EN COBAYO ALBINO.

SEXO: MACHOS; PESO: 400 g
VIA INTRAMUSCULAR; VENENO: C. basiliscus

NO. ANIMALES	RETO	NUMERO DE FRASCOS (Hrs.)						TIEMPO DE MUERTE (Hrs.) POR COBAYO PROMEDIO	
		1	2	3	4	5	6		
1		0:30	2:37	3:20	3:57	4:20	5:00	5:01	
2	0.25 mL VENENO CRUDO	0:30	3:00	3:40	3:57	4:05		4:10	
3		0:30	4:30					>7:00-<22:00	
1		0:30	2:30					>7:00-<22:00	
2	0.25 mL VENENO CRUDO	0:30	4:30	20:00				>72:00-<92:00	
3		0:30	4:30	20:00				>72:00-<92:00	
1		-----						4:00	
2		-----						4:30	
1	0.25 mL VENENO CRUDO	-----						4:19	
2		-----							
SUERO I	---	0:54	-----						-----
SUERO II	---	0:56	-----						-----

Para realizar el estudio comparativo entre los dos sueros se realizaron algunas pruebas biológicas *in vivo* e *in vitro* contra los venenos de *B. asper* y *C. basiliscus* se usaron pruebas aprobadas por el O.M.S. (1981 Theakston y Reid, 1983), los resultados se muestran en la tabla número XIII.

Tabla XIII.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS "IN VIVO" E "IN VITRO"
DE LOS VENENOS *B. asper* Y *C. basiliscus*.

ESPECIES	DMH µg/COBAYO	DMN µg/COBAYO	DMD-CSC µg/RATON	DMC-P µg/mL
<i>C. basiliscus</i>	40	100	N.A	N.A
=====				
<i>B. asper</i>	40	100	7	760

N.A. = NO TIENE ACTIVIDAD.

Una vez obtenida la cantidad de veneno que causa cada actividad biológica de cada veneno, se realizó la neutralización de dichas actividades con los dos sueros I y II, obteniendo los resultados expresados en la tabla número XIV.

Tabla XIV.- RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE
DE DOS SUEROS POLIVALENTES (SUERO I Y SUERO II)
CONTRA LOS VENENOS DE *B. asper* Y *C. basiliscus*

ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE*					
ESPECIES	SUERO	DMH μL	DMN μL	DMD-CSC μL	DMC-P μL
<i>C. basiliscus</i>	SUERO I	4.0	1.5	N.R.	N.R.
	SUERO II	2.0	1.0	N.R.	N.R.
<i>B. asper</i>	SUERO I	4.0	2.5	0.85	5.0
	SUERO II	1.0	1.5	0.85	4.0

N.R. = NO REALIZADA. * = RESULTADO DE LA MEDIA DE DOS ENSAYOS.

En las pruebas de neutralización de las actividades biológicas se expresaron en cantidad de proteína y de IgG requerida, para esto se tomó en cuenta el porciento de τ globulina obtenida en el corrimiento electroforético de zona, analizando dos lotes del suero II y un lote del suero I y de la cantidad de proteína obtenida por el método de lowry (tabla número XV).

En las figuras 3 y 4 se observa un estudio comparativo de corrimientos electroforéticos en gel de poliacrilamida de los sueros I y II.

También se realizarán corrimientos electroforéticos de zona de los dos sueros antiviperinos para observar α , β y γ de sueros normal equino contra sueros antiviperinos (Figuras 5 y 6).

Tabla XV. PRUEBAS DE NEUTRALIZACION DE VENENO, EXPRESADA EN CANTIDAD DE PROTEINA Y DE I9G REQUERIDA.

ESPECIES	ANTISUEROS	DMH MICROGRAMOS		DMN MICROGRAMOS		DMD-CSC MICROGRAMOS		DMC-P MICROGRAMOS	
		Pt	I9G	Pt	I9G	Pt	I9G	Pt	I9G
<u>C. baillisci</u>	SUERO I	206.7	159.30	77.52	59.76	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
	SUERO II	97.46	43.73	43.73	43.73	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
<u>B. asper</u>	SUERO I	206.7	159.30	129.2	99.61	43.92	33.06	250.4	199.22
	SUERO II	43.73	43.73	65.59	65.59	37.17	37.17	174.92	174.92

Pt = CANTIDAD DE PROTEINA

FIGURA 3.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA
 DE SUEROS ANTIVIPERINOS
 (TINCION DE PLATA)
 (15 %)

KD

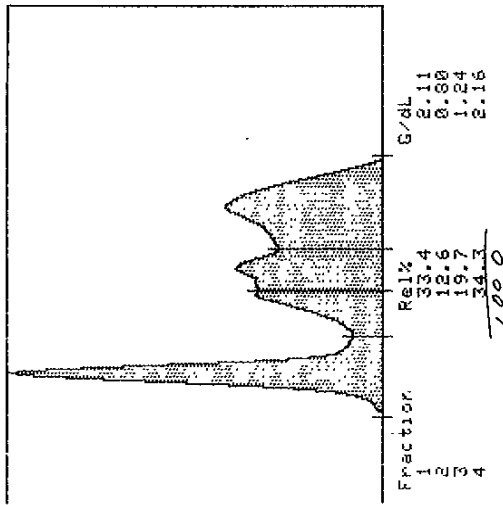


* CONDICIONES NO REDUCTORAS

CARRIL	MUESTRA	CARRIL	MUESTRA
1.-	M.P.M. ALTOS	6.-	SUERO II (LOTE 2), 10 μ l
2.-	M.P.M. BAJOS	7.-	SUERO I (LOTE 1), 15 μ l
3.-	SUERO I (LOTE 1), 10 μ l	8.-	SUERO I (LOTE 2), 15 μ l
4.-	SUERO I (LOTE 2), 10 μ l	9.-	SUERO II (LOTE 1), 15 μ l
5.-	SUERO II (LOTE 1), 10 μ l	10.-	SUERO II (LOTE 2), 15 μ l

FIGURA 4.- PERFIL ELECTROFORETICO DEL
SUERO ANTIVIPERINO I.

SUERO NORMAL EQUINO



SUERO ANTIVIPERINO POLIIVALENTE I

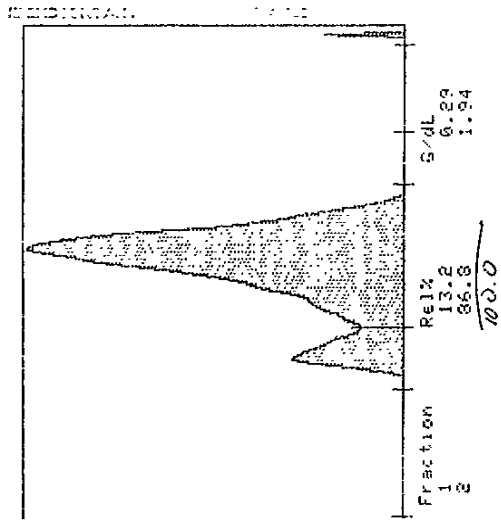
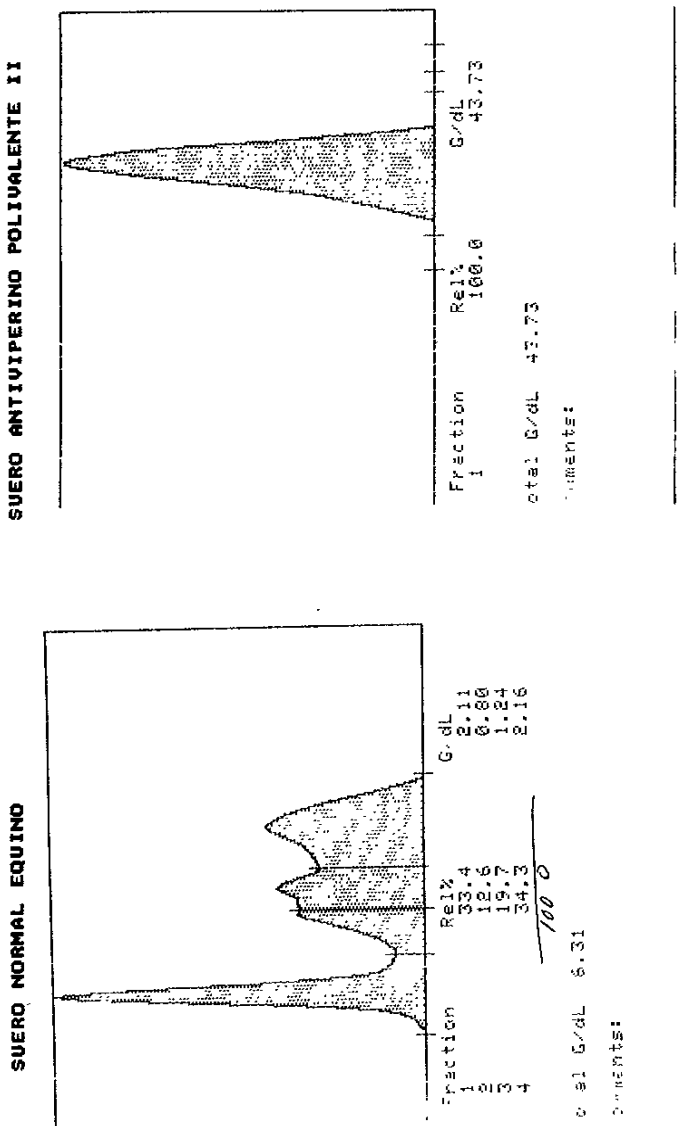


FIGURA 5.- PERFIL ELECTROFORETICO DEL
SUERO ANTIVIPERINO II.



VIII.- DISCUSION:

Para saber cual es el volumen promedio que puede inocular una serpiente en la vida real se partió de volúmenes de extracción (Tablas I y II), estos datos se adecuaron para realizar la prueba en un modelo animal que fué el cobayo, el volumen de la dosis mínima mortal (Tabla V) fué más pequeño que el volumen promedio 0.25 mL contra 0.6 mL respectivamente, tomando en cuenta la diferencia de pesos entre el hombre y el cobayo, además la edad, robustez y peso de cada serpiente (Sherman Minton, 22).

En la evaluación de la potencia de venenos, el veneno "crudo" de *B. asper* es 3.32 veces más potente que el veneno "crudo" de *C. basiliscus* (Tabla III).

En cuanto a la necropsia de los cobayos (Tablas VI y VII), los órganos más afectados por los venenos de *B. asper* y *C. Basiliscus* son: riñones, hígado y corazón, presentando congestión, es decir un exceso de sangre en determinado órgano, estos resultados concuerdan con la bibliografía (1).

En los lotes estudiados, el suero II es 4.62 veces más potente contra la fracción Botrópica y 1.34 veces más potente contra la fracción Crotálica que el suero I, mediante la prueba de potencia de seroneutralización en ratón (DE_{50}) (Tabla VIII).

Como la prueba de seroneutralización se realiza en ratones por vía intravenosa, al realizar la prueba de protección a una dosis fija es decir 800, 500 y 250 DE_s, se realizó por vía intramuscular, esto debió de influir en los resultados obtenidos en la protección de los sueros, además de la diferencia de modelo animal, tamaños y por consiguiente los pesos.

En el modelo y en las condiciones del ensayo de protección absoluta de este estudio con una sola dosis de 800, 500 y 250 DE_s, en ambos sueros antiviperinos probados (Tablas X y XI), no protege al cobayo al ser administrada una dosis mínima mortal, aproximadamente 130 DL, de veneno "crudo" de *Crotalus Basiliscus*.

La comparación de la cantidad de frascos necesarios de cada suero antiviperino (Tabla XII), para neutralizar de manera eficaz una dosis mínima mortal, requiere de experiencia o entrenamiento en el tratamiento de la mordedura-picadura de serpiente. (6, 23,24)

Las pruebas "in vivo" e "in vitro" recomendadas por la OMS (26), sugiere en general, que el suero II, es más potente que el suero I para neutralizar las actividades biológicas, a excepción de la DMD, de los venenos de *B. asper* y *C. basiliscus*.

Cabe señalar que los productores de los sueros antiviperinos utilizan especies de serpientes diferentes, el suero I utiliza las especies de *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus*, mientras que el

siero II utiliza las especies de *Bothrops atrox* y *Crotalus terrificus* estas dos últimas especies no existen en México, corresponden a centro y Sudamérica. (2)

Pese a que se ha demostrado la existencia de reacciones cruzadas entre venenos del mismo genero y diversos sueros (Rosenfeld and Kelen., 1966; Gutiérrez et al., 1985; Kornalik and Toborska., 1989; Dias da Silva et al., 1989). Se recomienda utilizar, en las mezclas antigénicas, venenos de serpientes del país en el cual se va a distribuir un determinado suero, ya que de esta manera se garantiza la adecuada protección inmunológica de las principales toxinas presentes en los venenos (Bogarín G., Segura E., et al., 1995).

- Se puede predecir la eficacia clínica de los sueros antiviperinos en base a estos resultados.

Estudios realizados demuestran poca correlación entre la respuesta clínica del antiveneno y las pruebas de laboratorio (12,14).

En un estudio realizado en Tailandia con la serpiente *Calloselasma rhodostoma*, se encontró correlación entre las observaciones clínicas y los resultados experimentales, (11, 33) excepto para la necrosis local ya que en casos de envenenamiento en humanos la administración la administración del suero es posterior a la mordedura-picadura (Warrel et al., 1976; Warrel., 1992; Cardoso et al., 1993).

En estudios realizados indican que el daño tisular inicia inmediatamente después de la mordedura picadura de serpientes (Iddon et al., 1987) y este efecto se previene al administrar el suero inmediatamente.

Sin embargo se recomienda tener precaución en extrapolar los resultados basados en estudios realizados en animales en la caracterización de venenos para el envenenamiento en humanos (Theakston and Reid., 1983).

En el corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida (Figura 4), se observan 7 bandas del suero I de aproximadamente (70.79, 59.56, 45, 36.72, 26.91, 24 y 19.72) KD.

Mientras que en en el suero II (Figura 4), se observan 6 bandas de aproximadamente (70.79, 59.56, 45, 30.54, 26.91 y 24) KD.

Las diferencias entre ambos son en las bandas que presentan un valor de 36.72 y 19.72 KD para el suero I y 30.54 KD para el suero II, esto puede significar la diferencia en la protección.

De acuerdo al estudio electroforético de zona, en los lotes estudiados de los sueros antiviperinos, el suero II (Figura 6) contiene el 100 % de α , en tanto que suero I (Figura 5) contiene 86.8 % de α y 13.2 % de β . Y expresando el estudio en el contenido de IgG, el suero II es más potente que el suero I, es decir que el

suero II requiere menor cantidad de IgG para neutralizar cada una de las actividades biológicas realizadas en éste trabajo (Tabla XV).

- Se debe de purificar el suero I , si es que en esto depende en aumentar la potencia y protección contra la mordedura-picadura de *B. asper* y *C. basiliscus*.

En analisis de suero de sangre venosa, por electroforesis, realizadas por Kabat y Tiselius observaron cuatro picos principales de proteínas séricas: las albuminas y las globulinas α , β y γ . En su mayoría, los anticuerpos se hallaron en la fracción de las gamma globulinas, pero también en parte en las β globulinas. (2)

En la literatura indican que los anticuerpos antitóxicos producidos mediante inmunización prolongada de caballos se localizan en una fracción β lenta o γ rápida, a veces designada el componente "T". (4)

Después de periodos cortos de inmunización la antitoxina aparece en la gamma (globulina gamma 2), pero con inmunización continua aparece como γ 1 (T) que migra entre las globulinas beta y gamma 2. (10)

Tambien existe un efecto de la digestion enzimatica sobre las propiedades de los anticuerpos, en estudio de diversas investigaciones que el tipo β ó T de antitoxina se convierte por éste proceso, en una proteína que migra como globulina gamma. (10)

Estudios realizados en el Intituto Nacional de Higiene, así como en literatura (10) se ha observado que en la purificación de sueros, aparecen tres picos que corresponden a las fracciones β , T y γ), pero con el proceso de digestión se observa un sólo pico que corresponde a la fracción γ .

IX.- CONCLUSIONES:

- El volumen que inocula una serpiente, depende del tamaño de la especie, peso, y nutrición de cada ejemplar.

- El veneno de *B. asper* es más potente que el veneno de *C. basiliscus*, además que este no tiene actividad desfibrinogenante y coagulante.

- En la necropsia de los cobayos los órganos afectados son los mismos para ambos venenos.

- Para el estudio de la actividad neutralizante de los sueros antiviperinos contra la mordedura-picadura de serpientes *B. asper* y *C. basiliscus*, se requiere de experiencia y entrenamiento para su tratamiento ya sea a una dosis única o a determinado volumen.

- El suero II requiere de menor cantidad que el suero I para neutralizar las diferentes actividades biológicas.*

- El suero II es más puro en cuanto al contenido de IgG que el suero I.*

* Para los lotes estudiados

- Para producir un suero con una buena calidad se debe tomar en cuenta los métodos de inmunización, purificación y digestión del mismo.

X.- APENDICE

REACTIVOS

I) ESTANDAR PARA LA CURVA PATRON DE ALBUMINA (1 mg/mL)

25 mg de Albúmina Sérica Bovina	25 mg
25 mL de Solución Salina 0.15 M	25 mL

Preparar un mínimo de 25 mL y ajustar la solución , a una D.O. de 0.7 (280 nm), utilizar siempre el mismo frasco de albúmina cada vez que se prepare el estandar. Distribuya el alicuotas de 1 mL y congele a - 70 °C.

II) Reactivo A:

1.- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	2 g
2.- NaOH 0.1 M	* Aforar a 100 mL

Preparar mínimo 1.0 lt.

$$200 \text{ mL NaOH } 0.1 \text{ M} \quad \frac{0.1 \text{ M}}{100 \text{ mL}} \mid \frac{40 \text{ g}}{1 \text{ Mol}} = 0.8 \text{ g de NaOH}$$

III) Reactivo B:

1.- Tartrato de sodio y potasio dihidratado	2 g
Agua destilada	* Aforar a 100 mL

Se disuelve el tartarato de sodio en 40 mL y se afora a 100 mL.

2.- Sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 g
Agua destilada	* Aforar a 100 mL

* Utilice matraces volumétricos para su preparación.

IV) Reactivo de Folin-Cicalteus, dilución (1:3)

1.- Reactivo de Folin-Ciocalteus	2 mL
2.- Agua destilada	4 mL

Se prepara en el momento.

V) Mezcla de reacción:

0,5 mL de III B-1 con 0,5 mL de III B-2, volumen final 1,0 mL

A ésta solución se agrega 50 mL de II A, mezclar, reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Preparar al momento.

VI) Solución de Monómeros, (Acrilamida-Bis acrilamida al 30 %).

PRECAUCION: En la preparación de éste reactivo use, guantes y cubreboca. Evite el contacto directo con ésta solución mientras este en estado líquido.

Acrilamida	75 g
N-N Bis-acrilamida	2.0 g
H ₂ O*	Aforar a 250 mL

Filtrar en papel Whatman 1 y mantener a - 4° C en obscuridad (frascos ambar); Caducidad 30 días.

VII) Regulador del gel de separación (Tris HCl 1.5 M, pH = 8.8)

Trizma-base	18.17 g
H ₂ O*	50 mL

Se ajusta el pH con HCl 6 M y se afora a 100 mL.

Se filtra en papel Whatman 1 y guardar a - 4° C. Caducidad 30 días.

VIII) Regulador del gel concentrador (Tris HCl 0.5 M, pH = 6.8)

Trizma-base	6 g
H ₂ O*	50 mL

Se ajusta el pH con HCl 6 M y se afora a 100 mL.

Se filtra en papel Whatman 1 y guardar a - 4° C. Caducidad 30 días.

IX) Lauril sulfato de sodio (Dodecil Sulfato de Sodio, S.D.S.) al 10 %.

(Detergente aniónico recubre las cadenas polipéptidicas y las carga negativamente (No refrigerar porque se cristaliza).

SDS	10 g
H ₂ O*	100 mL

X) Persulfato de amonio al 10 % (APS):

Persulfato de amonio APS	0.1 g
H ₂ O*	1.0 mL

(Se prepara al momento de su usarse).

XI) TEMED (N', N', N', N' tetrametiletilendiamina).

XII) Regulador de corrimiento (Tris 0.0025 M, Glicina 0.192 M, SDS al 1 %, pH = 8.3)

Trizma-base	18 g
Glicina	86.4 g

SDS	6 g
H ₂ O*	6.0 lt

No se debe ajustar el pH.

El regulador del tanque inferior puede ser reusado 4 ó 5 veces, el del tanque superior debe ser descartado cada vez.

XIII) Regulador de muestra 2 X:

Regulador de muestra	<u>Reductor</u>	<u>No Reductor</u>
Tris.HCl 0.5 M pH 6.8	50 mL	50 mL
SDS	4 g	4 g
GHlicerol	20 mL	20 mL
β-mercapto etanol	10 mL	-----
Azul de bromo fenol 0.1 %	0.2 mL	0.2 mL
Agua destilada* Aforar a	100 mL	100 mL

XIV) Colorante de trabajo para tinción de proteínas Coomasie al 0.125 % en metanol, acético, agua:

Metanol 50 %	454 mL
Acido acético glacial	46 mL
Azul Coomasie R250	1.25 g
Agitar 60 minutos y aforar con 500 mL de H ₂ O* (Se reusa hasta 3 meses, filtrar periodicamente).		

XV) Decolorante para el Gel:

Metanol absoluto	300 mL
Acido acético	70 mL

H₂O* 630 mL

* Utilizar agua desionizada, ósmosis inversa o bidestilada.

XVI) Secado de geles:

Geles < a 10 %		Geles >/ a 15 %		Geles >/ a 20 %
Glicerol al 5 %		Glicerol al 5 %		Glicerol al 5 %
		Metanol 40 %		Metanol 40 %
		Acido acético 5 %		Acido acético 10 %

Remogar el gel, papel filtro y celofan en la solución de glicerina, temperatura 80 °C, tiempo 1 hora, bomba de vacío.

XVII) Solución fijadora (Etanol 30 %, Acido acetico glacial 10 %):

Etanol	270 mL
Acido acético	90 mL
H ₂ O desionizada	900 mL

XVIII) Equilibración de una solución de plata:

A.- Geles mayores o iguales a 0.5 mm (convencional), diluir 1.5 mL de AgNO₃ (Plata concentrada), en 300 mL de agua desionizada.

B.- Geles menores a 0.5 mm (ultrafinos), diluir 0.75 mL de AgNO₃ (Plata concentrada), en 300 mL de agua desionizada. [Esta solución puede ser usada dos veces].

XIX) Solución reveladora:

Diluir 30 mL de Na₂CO₃ (Revelador 1 concentrado) en 300 mL de agua

desionizada. A ésta solución adicionar 0.17 mL de Formaldehido (Revelador 2 concentrado). [Esta solución es estable por 2 horas].

XX) Solución de paro o término (Acido acético 1 %) :

Acido acético	3 mL
H ₂ O desionizada	297 mL

XXI) Solución reductora:

Mezcar 2 mL de Ferricianuro de potasio (Reductor A concentrado), 4 mL de Tiosulfato de sodio (Reductor B concentrado) y 0.7 mL de Na₂CO₃ (Reductor C concentrado), y diluir con 300 mL de agua desionizada. [Esta solución será estable por 1 día o hasta que la solución se torne verde o azul].

XXII.- Solución amortiguadora de veronal Sódico 0.04 M/pH 8.6 :

Diethylbarbiturato Sódico	10 mL
Agua de ósmosis inversa, Aforar a	1.0 L
ajustar el pH a 8.6		

XXIII.- Acido acético 5 %

Acido acético	12.5 mL
Agua de ósmosis inversa, Aforar a	250 mL

XXIV.- Acido acético 10 % :

Acido acético	10 mL
Metanol, Aforar a	100 mL

XI.- BIBLIOGRAFIA:

1.- Atmore smith H. and Carlyle Jones T., Patología Veterinaria, Editorial UTEHA S.A. de C.V. México 1985.

2.- Bach Francois Jean, Inmunología, Editorial Limusa, S.A., México 1984, pp. 157.

3.- Cano Avila G y cols, 1983, Picados de Víbora de cascabel Infectología, 5:243-251.

4.- Carpenter L. Philip; Inmunología y Serología; La Prensa Medica Mexicana S.A., 2a. Edición México 1982, pp. 80-82.

5.- Comité de expertos de la OMS en patrones biológicos, Serie de informes técnicos, Ginebra 1989, Organización Mundial de la Salud, 786:39°, pp 14.

6.- Costa Cardoso João L., Bucarechi Fábio y Etal; Manual de Vigilância Epidemiológica, Acidentes por animais peconhentos; identificação, diagnóstico e tratamento; Centro de Vigilância Epidemiológica, Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde; São Paulo, Brazil 1993.

7.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, México 1994, Secretaria de Salud, Sexta edición, pp 307, 308, 1501.

8.- Garvey Justine S., Methods in Immunology, 1981, The Benjamin/Cummings Publishing Company, United States of America, pp 93-123.

9.- Juliá Zertuche J, 1981, Epoca V, Reptiles mexicanos de importancia para la Salud pública y su distribución geográfica, Salud pública de México, Vol. XXII: 329-343.

10.- Kabat Elbin A., Inmunoquímica Experimental, La prensa médica Mexicana, 1ra. ed. Español, México 1968, Cap. 33.

11.- Keegan H. L., Snover G. E., Matsui T and Lloyyd H. H., 1965, The Malayan pit Viper *Agkistrodon rhodostoma* (Boie, 1872). 406th Medical labo. Special report. U.S. Army Medical Command, Japan.

12.- Keegan H. L., Weaver R. E., and Matsui T., 1964, Southeast asian snake bite antivenin studies. contr. Dept. Entomology 406th Medical Lab. U.S. Army Medical Command, Japan.

13.- Laemmli, K.V.. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London 227: 680-685.

14.- Laing G.D., Theakson R.D.G., 1992. Comparison of the potency of three Brazilian *Bothrops* antivenoms Using *in vivo* rodent and *in vitro* assays. Toxicon. 30: 1219-1225.

- 15.- Lau-Córtéz. E, 1993. Mordedura de ofidios venenosos. En Resúmenes de actualización de envenenamiento por serpientes y alacrán. Bioclon, S.A de C.V.
- 16.- Lowry, O.H., Rosebrough. N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L.. 1955. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 17.- Luís Alves A, Federsoni Junior P. y Cois., Cartilha de ofidismo (Cobra), Ministério de Saúde, São Paulo, Brazil 1991, Edição revisada, 2ª. reimpressão.
- 18.- Malcolm S. Gordon, 1984. Fisiología animal Principios y adaptación al medio ambiente, México D.F.: Ed. Continental, pp. 21-23.
- 19.- Merrril C.R., Goldman D., Sedman S.A., Ebert M.H.: Ultrasensitive stain forin polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211:27; 1981, pp. 1437-1438.
- 20.- Morais J.F., De Freitas M.C.W., 1994. Snake antivenoms from hyperimmunized horses: comparaisón of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments. Toxicon. 32: 725-734.

21.- Morilla G. A., Manual de Inmunología, ed. Diana, 1a. Edición, México 1986, pp. 64-68, 391-392.

22.- Nget-Hong Tan and Gnanajothy Ponnudurai, 1992, A comparative study the electrophoretic patterns of snake venoms, Comp. Biochem. Physiol. 102B, No. 1: 103-109.

23.- Organización Mundial de la Salud, II curso internacional sobre producción y control de productos biológicos, México 1978, Secretaría de Salubridad y Asistencia, pp 1-15.

24.- Santos Amaral C, Vieira Dourado H. y Etal; Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes Ofídicos;Ministério da Saúde, Fundação Nacional de saude; Brasília-DF 1991.

25.- Swaroop S. and Grab B; 1954, Snakebite mortality in the World; Bull. Org. Mond. Santé, Bull. Wld Hlth Org.; 10: 35-76.

26.- Tay Zavala J., Castillo A. L., Juliá Z. J., Romero C. R., y Velasco C. O, 1980. Accidentes por mordedura de animales ponzoñosos. Revista de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. México, XXIII, núms. 7 y 8: 4-17, 6-19.

27.- Tay Zavala J., Castillo A. L., Romero C. R., 1981, Epoca V, Tratamiento de las mordeduras por serpientes ponzoñosas, Salud Pública de México, Vol. XXIII, 5: 457-472.

28.- Theakson, R.D.G. and Reid, H.A. 1983. Development of standar assay procedures for the characterization of Snake venoms. Bulletin of the World Health Organization. 61 : 949-956.

29.- Theakson R.D.G., Laing G.D., 1995. Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. Toxicon. 89: 550-554.

30.- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

31.- U.S. Departament of Health Educación, and Welfare, 1953. Minimum requirements: antivenin, pp. 1-3.

32.- Vázquez Tapia, F. Modificación de la actividad tóxica del veneno de *Bothrops asper* utilizado en la inmunización de equinos, 1991, Tesis de licenciatura, Q.B.P., Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.

33.- Warrel D. A., Loocareesuwan S., Theakston R. D. G., Phillips R. E., Chanthavanich P., Virivan C., Supanaranov W., Karbwang J., and Etal; 1986, Randomized comparative trial of tree monospecific antivenoms for bites by the Malayan pi viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: Clinical and laboratory correlations. Am. J. Trp. Med. Hyg. 35, 1235-1247.

34.- WHO (World Health Organization), Geneva 1981, Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms, 58, PP 20.