

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARENTESCO ANTIGÉNICO Y PROTECCIÓN
PARA ESPECÍFICA POR ANTISUEROS
EXPERIMENTALES EN EL GÉNERO *Naja*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARCELA ANDREA CASASOLA HERNÁNDEZ

TUTOR:

DR. ROBERTO STOCK SILBERMAN

2007
FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del jurado.

Datos del alumno.

Casasola
Hernández
Marcela Andrea
Tel. 55134120.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Ciencias.
Biología.
No. Cta. 300102347.

Datos del tutor.

Dr.
Roberto Pablo
Stock
Silberman

Datos del sinodal 1.

Dr.
Alejandro
Alagón
Cano

Datos del sinodal 2.

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

Datos del sinodal 3.

M. en C.
Alfonso
Vilchis
Pelayera

Datos del sinodal 4.

Dr.
Baltazar
Becerril
Luján

Datos del trabajo escrito.

Parentesco antigénico y protección paraespecífica por antisueros experimentales en el género *Naja*.
69 p
2007

*A mis padres:
José Luis y Blanca.
A Ge
y a Luis.*

AGRADECIMIENTOS

De forma especial, quiero agradecer al Dr. Roberto Stock la gran oportunidad que me brindó para formar parte de su gran equipo de trabajo ya que me enseñó una manera de trabajar que considero muy valiosa. Agradezco su gran experiencia, guía y ayuda prestada a lo largo de la elaboración de este proyecto, dispuesto en todo momento a atender las dudas y propuestas que iban surgiendo.

Especial mención merece también la M. en C. Blanca Ramos, a quien deseo expresar mi enorme agradecimiento por haberme enseñado la mayor parte de lo que hasta ahora sé en el ámbito experimental, por su trabajo, su esfuerzo y el tiempo que le ha supuesto el desarrollo y la supervisión de este proyecto.

Deseo agradecerle al Dr. Alejandro Alagón Cano por sus aportaciones y enseñanzas.

Agradezco sinceramente al M. en C. Alejandro Carbajal Saucedo por que gracias a su labor fue posible la realización de esta tesis pues su largo y arduo trabajo fue la base fundamental para el desarrollo de la misma.

Deseo manifestar mi agradecimiento a Mabel Rodríguez, que a mi llegada al laboratorio me enseñó los principios de la Biología Molecular y contribuyó enormemente a la culminación de esta tesis.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a las personas que conformaron mi jurado de tesis, el Dr. Alejandro Alagón, la Dra. Laura Kawasaki, el M. en C. Alfonso Vilchis y el Dr. Baltazar Becerril, por su tiempo y dedicación.

Debo expresar mi agradecimiento al Bioterio del Instituto de Biotecnología a cargo de la Dra. Elizabeth Mata, por el apoyo en haber proveído el material necesario para la realización del trabajo.

Finalmente, es importante mencionar que este proyecto fue realizado gracias al apoyo económico otorgado por el Instituto de Biotecnología y Laboratorios Silanes.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El desarrollo de esta tesis no tendría razón y no hubiera sido posible sin todo lo que significa mi familia en mi vida. Por lo anterior deseo dedicar la realización de este trabajo a mis padres ya que es el resultado de todos los valores y enseñanzas que sabiamente me han dado. Gracias papá por ser el gran padre que eres, gracias por tu incansable labor de padre, dedicación y esfuerzo, te ofrezco mi agradecimiento infinito porque tu amor ha sido y será la principal fuente de inspiración y de alegría en cada uno de mis días. Gracias mamá por estar a mi lado, por tus desvelos, tu esfuerzo y apoyo que cada día me has dedicado, gracias por ser cada día que pasa la amiga que siempre soñé. Les ofrezco mi mas grande agradecimiento a ambos por existir, por ser el mejor ejemplo de vida, por su fe en mí y por cada uno de los instantes que me han brindado.

Quiero darle las gracias a Gerar, que a su corta edad ha sido un gran amigo para mí, a quien adoro profundamente. Gracias Ge por ser el mejor hermano que la vida pudo darme, por ser mi cómplice en todo lo que hago y por quererme tanto como yo a tí.

Deseo manifestar mi profunda gratitud a Luis Zúñiga porque él ha formado parte fundamental en la realización de este y de todos los proyectos de vida que he realizado, a quien también dedico de corazón este trabajo. Gracias por tu tiempo, por tu comprensión, por creer en mí, por infundirme todos tus ánimos, por tus palabras de aliento y por tu apoyo incondicional en este camino de la ciencia que estoy emprendiendo, gracias por tu interés y por respetar mis decisiones. Gracias por ser el principal motor de mi vida y por compartir conmigo lo gratificante que resultó la realización de este trabajo.

Quiero darles las gracias a mis amigos: Alberto, Alvaro, Benjamín, Diana, Erandi, Fabiola, Karla, José, María, Miguel y Roxana. Deseo expresarles que en todo este tiempo estuvieron presentes en mi vida más que nunca, a pesar de la distancia y el tiempo que ha pasado. Deseo agradecerles el haberlos encontrado en mi camino y todos los momentos junto a ellos que sin duda marcaron mi existencia. Me gustaría expresarles que a pesar de que las circunstancias nos orillen a caminos tan diferentes los sueños que construimos juntos, así como el de apoyo y los momentos de alegría que me bindaron siguen vigentes en mí. Gracias a ustedes amigos que han sido mis cómplices y confidentes durante tantos años.

Me gustaría también agradecer a mis tías Paty y Mary, quienes me vieron nacer y crecer, dandome siempre su cariño incondicional, su apoyo, sus ánimos y sus buenos deseos. A ambas deseo expresarles lo mucho que las quiero y las admiro. Gracias por compartir esta y todas las alegrías conmigo.

A lo largo del desarrollo de este trabajo he conocido a muchas personas que me tendieron la mano académicamente además de concederme el honor de contar con su amistad. A todas ellas agradezco profundamente que me ayudaran a crecer en este camino que he emprendido hacia la vida científica.

Agradezco sinceramente a Robert, no sólo por sus grandes enseñanzas, sino también por su fe, sus consejos, su comprensión, preocupación, paciencia y dedicación. Quiero expresarle la enorme satisfacción, tanto académica como personal, que me dio el haber trabajado bajo su dirección.

Deseo expresar mi gratitud a Blanchis, mi guía incondicional, por sus valiosas e inmensas contribuciones en cada paso del desarrollo de esta tesis, porque siempre creyó en mí, por los buenos e inolvidables momentos que compartimos cada día en el laboratorio y en tierras lejanas como jamás lo imaginamos. Le agradezco por compartir conmigo una de las mejores experiencias salvajes de mi vida: a *beerji*, quise decir: a *bearji*, por comprender mi *tic* de compradora compulsiva y fundamentalmente por ofrecerme su amistad.

Por otra parte, deseo dedicar unas palabras de agradecimiento para Mabel quién me compartió sus conocimientos desde mi llegada al laboratorio. Le doy gracias por su amistad y su gran apoyo en la escritura de este trabajo, además de mostrarme la riqueza de la lengua “cubana” y el característico “cubanglish”, llenando muchos de mis días de buen humor.

También quiero agradecerle a Lucía, que junto con Blanchis y Mabel, me ha hecho reír innumerables ocasiones, me ha escuchado, apoyado, ayudado, me ha brindado su amistad y principalmente por ser mi “Jolie” de cada día.

Agradezco al Doc Alagón por las tantas veces que me hizo reír y por haberme dado la oportunidad de conocer el gran ser humano que es.

Debo dar las gracias también a todos los compañeros con los que compartí el laboratorio, cuya paciencia y comentarios, algunos técnicos y otros no tanto, me han servido de apoyo en todo momento.

Finalmente, deseo manifestar mi gratitud a este país, porque espera mucho de mí y me estimula a ser mejor cada día.

ÍNDICE.

| | |
|---|-----------|
| I. RESUMEN. | 9 |
| II. INTRODUCCIÓN. | 10 |
| II.1 Generalidades del ofidismo a nivel global. | 10 |
| II.1.1 Epidemiología del ofidismo en África. | 11 |
| II.2 Generalidades de serpientes. | 12 |
| II.3 Taxonomía. | 16 |
| II.4 Venenos. | 18 |
| II.5 El género <i>Naja</i>. | 21 |
| II.5.1 Características generales. | 21 |
| II.5.2 Distribución y hábitat. | 22 |
| II.5.3 El envenenamiento por el género <i>Naja</i> . | 24 |
| II.6 Antivenenos. | 26 |
| II.6.1 Generalidades y evolución. | 26 |
| II.6.2 Protección específica y paraespecífica. | 27 |
| III. ANTECEDENTES. | 29 |
| IV. OBJETIVOS. | 30 |
| IV.1 Objetivo general. | 30 |
| IV.2 Objetivos particulares. | 30 |
| V. JUSTIFICACIÓN. | 31 |
| VI. HIPÓTESIS. | 31 |
| VII. MATERIAL Y MÉTODOS. | 32 |
| VII.1 Materiales. | 32 |
| VII.1.1 Reactivos. | 32 |
| VII.1.2 Animales vivos. | 33 |
| VII.1.3 Venenos. | 33 |
| VII.1.4 Software. | 34 |
| VII.2 Metodología | 34 |
| VII.2.1 Producción del antisuero de origen equino anti- <i>Naja melanoleuca</i> . | 34 |
| VII.2.2 Determinación de proteínas por BCA. | 36 |

| | |
|---|-----------|
| VII.2.3 Medición de títulos por ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). | 37 |
| VII.2.4 Medición de la reactividad cruzada del antisuero anti- <i>Naja melanoleuca</i> por ELISA directo. | 39 |
| VII.2.5 Medición de la toxicidad de los venenos (Dosis Letal Media; DL50). | 39 |
| VII.2.6 Medición de la potencia neutralizante del antisuero anti- <i>Naja melanoleuca</i> (Dosis efectiva media; DE50). | 40 |
| VIII. RESULTADOS. | 40 |
| VIII.1 Caracterización de un antisuero experimental anti-<i>Naja melanoleuca</i>. | 40 |
| VIII.1.1 Evolución de títulos. | 40 |
| VIII.1.2 Comparación entre diferentes lotes de venenos de <i>N. melanoleuca</i> . | 41 |
| VIII.1.3 Determinación de la potencia neutralizante específica del antisuero. | 42 |
| VIII.2 Reactividad cruzada con venenos de otras especies de cobra. | 44 |
| VIII.2.1 Reconocimiento paraespecífico <i>in vitro</i> de los venenos de cobras africanas por el antisuero anti- <i>Naja melanoleuca</i> . | 45 |
| VIII.2.2 Reconocimiento paraespecífico <i>in vitro</i> de los venenos de cobras asiáticas por el antisuero anti- <i>Naja melanoleuca</i> . | 46 |
| VIII.3 Protección paraespecífica del antisuero anti- <i>N. melanoleuca</i> . | 47 |
| VIII.3.1 Determinación de las DE50 paraespecíficas. | 49 |
| IX. DISCUSIÓN. | 54 |
| IX.1 Evolución de títulos del antisuero anti-<i>N. melanoleuca</i> contra el veneno de <i>N. melanoleuca</i> y evolución del potencial neutralizante específico. | 54 |
| IX.2 Reconocimiento paraespecífico de otros venenos de cobra. | 55 |
| IX.2.1 Reactividad cruzada entre el antisuero anti- <i>N. melanoleuca</i> con los venenos de cobras africanas. | 56 |
| IX.2.2 Reactividad cruzada entre el antisuero anti- <i>N. melanoleuca</i> con los venenos de cobras asiáticas. | 57 |
| IX.3 Neutralización paraespecífica de los venenos de serpientes del género <i>Naja</i> por el antisuero anti-<i>N. melanoleuca</i>. | 57 |
| IX.4 Medición del potencial neutralizante en el modelo murino. | 62 |
| X. CONCLUSIONES. | 64 |
| XI. BIBLIOGRAFÍA. | 66 |

|

I. RESUMEN.

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública en el mundo, principalmente en las regiones tropicales como es el caso del continente africano. Aunado a las condiciones sociales de la población africana representa, desde hace mucho tiempo, un problema emergente que es necesario resolver. Se sabe que la mordedura por serpientes del género *Naja*, comúnmente conocidas como cobras, causan el diez por ciento de los envenenamientos en dicho continente. Por esta razón, resulta imprescindible entender los efectos del envenenamiento así como la composición y las propiedades bioquímicas y farmacológicas de los venenos de estas serpientes.

En este trabajo se evaluó mediante experimentos *in vitro* (ELISA) la reactividad cruzada de dos antisueros experimentales de origen equino: anti-*Naja mossambica* y anti-*Naja melanoleuca*, contra una batería de venenos de cobras africanas y asiáticas. Para cada antisuero se determinó la potencia neutralizante específica (contra el veneno homólogo) y paraespecífica (contra el resto de los venenos). El antisuero anti-*Naja mossambica* presentó una alta reactividad cruzada contra la mayoría de los venenos de serpientes del género *Naja* analizados, sin embargo, su potencia neutralizante fue nula tanto para el veneno homólogo como para los venenos heterólogos. Por otra parte, el antisuero anti-*Naja melanoleuca* presentó un alto reconocimiento específico, mientras que el reconocimiento paraespecífico resultó ser menor. Este antisuero fue capaz de neutralizar los efectos tóxicos tanto del veneno homólogo (*Naja melanoleuca*) así como los de la mayoría de los venenos heterólogos.

II. INTRODUCCIÓN.

II.1 Generalidades del ofidismo a nivel global.

Las afecciones y muertes causadas por mordedura de serpientes y arañas así como por picadura de escorpiones, ocurren en gran parte del mundo, principalmente en las regiones tropicales, donde representan un problema de salud pública importante (WHO, 1981). Se estima que la mayor parte de las muertes por envenenamiento causado por animales ponzoñosos son provocadas por serpientes (Stock y col., 2007). La tasa de mortalidad mundial ocasionada por este fenómeno asciende a las 100,000 muertes por año (Chippaux, 1998). El envenenamiento por el accidente ofídico tiene un gran impacto en diversas poblaciones de África, Asia, Latinoamérica y Oceanía, causando un elevado porcentaje de mortalidad en las mismas (Tabla 1).

Tabla 1. Envenenamiento causado por mordeduras de serpiente en el mundo (Stock y col., 2007).

| Región | Población (x 10 ⁶) | Mordeduras | Envenenamientos | Muertes | Mortalidad (%)* |
|---------------|-----------------------------------|------------|-----------------|----------|--------------------|
| Europa | 750 | 25,000 | 8,000 | 30 | 0.38 |
| Medio Oriente | 160 | 20,000 | 15,000 | 100 | 0.6 |
| USA/Canada | 270 | 45,000 | 6,500 | 15 | 0.23 |
| Latinoamérica | 400 | 300,000 | 150,000 | 5,000 | 3.3 |
| África | 800 | 1,000,000 | 500,000 | 20,000 | 4.0 |
| Asia | 3,500 | 4,000,000 | 2,000,000 | 100,000 | 5.0 |
| Oceanía | 20 | 10,000 | 3,000 | 200 | 6.6 |
| Total | 5,900 | 5,400,000 | 2,682,500 | 125, 345 | |

* El porcentaje de mortalidad se obtuvo dividiendo el número de muertes entre los envenenamientos.

Los accidentes ofídicos son de mayor relevancia en los países tropicales en vías de desarrollo, donde se reporta una alta tasa de mortalidad (Gutiérrez y col., 2006). Lo anterior se explica por las siguientes razones: la amplia distribución geográfica de las serpientes venenosas en las regiones tropicales que coincide con ciertos asentamientos humanos y con determinados sectores de la población, la insuficiencia de servicios médicos, las dificultades del rápido acceso a centros de salud pública, y la baja accesibilidad y/o escasez de antivenenos eficaces entre muchas otras (Gutiérrez y col., 2006).

Desafortunadamente, existen pocos registros confiables sobre la incidencia de mordedura por serpientes en la mayoría de los países afectados. La falta de información fiable se debe a diversas razones, entre las cuales se encuentran: la dificultad que implica la identificación de la serpiente causante de la mordedura, el recurso a tratamientos tradicionales dentro de la propia comunidad, y la falta de cifras estadísticas y bases de datos oficiales (Gutiérrez y col., 2006).

La mayoría de los envenenamientos severos son producto de la mordedura por serpientes de la familia Elapidae y Viperidae. Entre las serpientes responsables del accidente ofídico que causan alta mortalidad a nivel global, se encuentran las serpientes del género *Echis* (África), *Bungarus* y *Naja* (Asia), y las especies *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* (América Central y América del Sur, respectivamente) (Gutiérrez y col., 2006). Existen muchas otras serpientes cuyo envenenamiento no es significativo a nivel mundial, sin embargo representan un serio problema epidemiológico en regiones específicas del mundo. Por ejemplo, las serpientes del género *Crotalus* en Norteamérica (Gutiérrez y col., 2006).

II.1.1 Epidemiología del ofidismo en África.

En África el envenenamiento por mordedura de serpientes causa alrededor de 20,000 muertes al año y es responsable de miles de envenenamientos severos que provocan daños permanentes en las personas afectadas (Stock y col., 2007; Laing y col., 2002). Estas disfunciones incluyen úlceras crónicas provocadas por los síndromes necróticos, disfunciones renales y secuelas neurológicas, entre otros (Theakston y col., 2003). En el Norte del continente africano la tasa de morbilidad anual ocasionada por este fenómeno es aproximadamente de 15 envenenamientos por cada 100,000 habitantes (Chippaux, 2006). A pesar de que esto representa un problema de salud pública en dicha región, resulta de menor importancia a lo que acontece en otros lugares del territorio africano. Por ejemplo, en las zonas ubicadas al sur del Sahara la mordedura por serpiente es un problema de gran relevancia debido a su elevada incidencia (10-1,000 mordeduras por cada 100,000 habitantes). Tanto la incidencia de las mordeduras como el número de envenenamientos dependen de la región, factores estacionales, tipos de terreno, distribución de las serpientes y hábitos locales de las poblaciones humanas afectadas (Stock y col., 2007).

En África la mayor parte de los envenenamientos ocurren por la mordedura de serpientes pertenecientes a la familia Viperidae. Los géneros de mayor relevancia epidemiológica en el territorio africano son *Echis*, *Dendroaspis*, *Bitis*, y *Naja*. De acuerdo a los estudios epidemiológicos y a los reportes clínicos existentes acerca del ofidismo en el continente africano, se sabe que la especie *Echis ocellatus* es responsable del 70% de los envenenamientos por accidente ofídico, mientras que el 10% se atribuye a las mordeduras por serpientes del género *Naja*, y el resto de los envenenamientos son ocasionados por la mordedura de serpientes pertenecientes a otros géneros.

Las especies del género *Echis* más representativas, en cuanto a la importancia epidemiológica en África, son: *E. ocellatus*, *E. leucogaster* y *E. pyramidum*. Por otro lado, las especies de mayor relevancia para el hombre del género *Dendroaspis* son: *D. angusticeps*, *D. jamesoni*, *D. polylepis* y *D. viridis*. En el caso del género *Bitis*, las especies que representan un mayor riesgo para la población africana son *B. arietans* y *B. gabonica*. Por último, la mordedura de las especies del género *Naja* con mayor incidencia en el territorio africano son la de las cobras *N. nigricollis*, *N. mossambica*, *N. haje* y *N. nivea* (Warrell, 1995). A pesar de que existen muchas otras especies implicadas en el accidente ofídico, es bien sabido que representan menor riesgo para la población africana, en comparación con las especies anteriormente mencionadas.

II.2 Generalidades de serpientes.

Las serpientes son animales vertebrados pertenecientes al grupo de los reptiles que carecen de extremidades y poseen un cuerpo alargado y flexible. Su longitud varía de 10 centímetros hasta 7 metros. Su piel está cubierta de escamas y durante el crecimiento es renovada constantemente por un proceso llamado ecdisis, comúnmente conocido como “muda”. Este proceso ocurre de 10 a 15 veces al año en las etapas tempranas de su ciclo de vida y de 2 a 4 veces al año cuando son adultos (Chippaux, 2006).

El esqueleto de las serpientes está constituido por numerosas vértebras (de 140 a 435 dependiendo de la especie) unidas entre sí por cinco articulaciones que permiten el característico movimiento sinuoso de estos animales. A excepción de la zona caudal, donde no hay vértebras o están limitadas a una sola (vértebra caudal primaria), el resto

de las vértebras se encuentran unidas a múltiples pares de costillas. Evolutivamente, estos organismos han sufrido diversas modificaciones en su estructura ósea, entre las cuales se encuentran, la pérdida de las cinturas pélvicas y escapulares, y la involución total del esternón. La ausencia del esternón da lugar a una caja torácica abierta altamente flexible, confiriendo una ventaja funcional para las serpientes como depredadores, ya que permite la ingesta de grandes presas (Chippaux, 2006). Algunas familias presentan estructuras vestigiales de los miembros pelvianos, que externamente se observan en forma de ganchos o espolones que utilizan durante la cópula.

Se han descrito diferentes tipos de locomoción mediante los cuales se desplazan las serpientes, éstos dependen del tamaño del organismo, de sus hábitos y de la composición del terreno en el que se desenvuelven. El movimiento más frecuente es el arrastre por ondulación lateral y permite a las serpientes desplazarse rápidamente (Chippaux, 2006).

El cráneo de las serpientes está compuesto por diversos huesos unidos por varias articulaciones. La compleja conexión entre los huesos maxilares y mandibulares permite engullir presas de gran volumen y diámetro (Chippaux, 2006).

Los dientes de las serpientes se conocen como “pleurodotes” debido a su morfología, ya que se encuentran embebidos en una superficie oblicua interna del maxilar (Figura 1). Los dientes son delgados y curvos, y son reemplazados continuamente a lo largo del ciclo de vida (Chippaux, 2006).

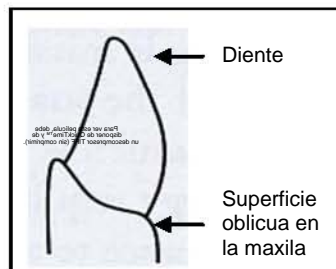
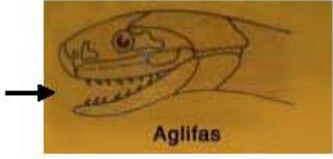

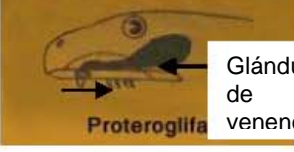



Figura 1. Arreglo dental en las serpientes. Pleurodonte (Chippaux, 2006).

De acuerdo a su tipo de dentición las serpientes se clasifican en aglifas, proteroglifas, opistoglifas y solenoglifas, dependiendo de la estructura y disposición de los dientes en el hueso maxilar (Tabla 2). Las serpientes que son venenosas pueden ser opistoglifas, solenoglifas o proteroglifas.

Tabla 2. Clasificación de las serpientes por el tipo de dentición (Ramos y col., 2000).

| | |
|--|--|
| <p>Aglifas. No poseen colmillos ni glándulas venenosas. Los dientes son afilados y curvos dirigidos hacia la parte posterior del cuerpo de la serpiente.</p> |  <p style="text-align: center;">Aglifas</p> |
| <p>Opistoglifas. Presentan un par de colmillos acanalados y fijos situados en la parte posterior de la maxila.</p> |  <p style="text-align: center;">Opistoglifas</p> |
| <p>Proteroglifas. Poseen un par de colmillos fijos, acanalados o huecos, situados en la parte frontal de la maxila.</p> |  <p style="text-align: center;">Proteroglifa</p> <p style="text-align: right;">Glándula de veneno</p> |
| <p>Solenoglifas. Presentan un par de colmillos inoculadores de veneno, móviles y huecos, situados en la parte anterior de la maxila.</p> |  <p style="text-align: center;">Solenoglifas</p> |

Los órganos internos de las serpientes se presentan en una configuración peculiar debido a la morfología de estos animales. Las vísceras poseen una conformación alargada ordenadas una detrás de la otra (Figura 2).

El aparato digestivo se dispone en una forma alargada paralelamente al eje anteroposterior del cuerpo de la serpiente (Figura 2). El estómago no es más que un ensanchamiento del tracto digestivo que puede agrandarse para albergar piezas muy voluminosas (Figura 2). El hígado también posee una configuración alargada y está compuesto por dos lóbulos de diferente en tamaño.

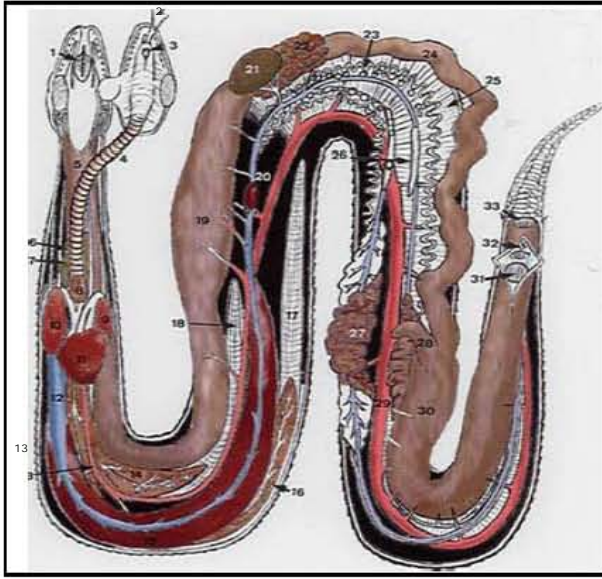


Figura 2. Anatomía general de los órganos internos de las serpientes. 1. Abertura coanal; 2. Lengua; 3. Glotis; 4. Traquea, 5. Esófago; 6. Timo; 7. Paratiroides; 8. Timo; 9. Aurícula izquierda; 10. Aurícula derecha; 11. Ventrículo; 12. Vena cava; 13. Aorta; 14. Pulmón izquierdo; 15. Hígado; 16. Pulmón derecho; 17. Saco aéreo derecho; 18 Saco aéreo izquierdo; 19. Estómago; 20. Bazo; 21. Vesícula biliar; 22. Páncreas; 23. ovario; 24. intestino delgado; 25. Mesovario; 26. Glándulas adrenales; 27. riñón derecho; 28. Ciego; 29. Aorta; 30. Colon; 31. Coprodeum; 32. Urodeum; 33. Proctodeum (Modificado de Funk, 1996).

Los riñones, testículos y ovarios presentan una morfología alargada y se disponen en fila (Figura 2). La mayoría de las serpientes poseen un pulmón derecho y un pulmón izquierdo vestigial o nulo, sin embargo, algunas presentan dos pulmones. El sistema excretor deriva de la anastomosis de los uréteres al intestino, desembocando en la cloaca (Figura 2).

La disposición anatómica del corazón puede obedecer a la forma de vida de las serpientes. En las serpientes acuáticas por ejemplo, éste se localiza en la parte central del cuerpo para compensar la presión hidrostática. En contraste, en las serpientes arborícolas, el corazón se ubica cerca de la cabeza para facilitar la irrigación sanguínea al cerebro (Chippaux, 2006).

En estos animales los órganos sensoriales de la visión y el olfato se encuentran desarrollados para contender con su entorno. Sin embargo, poseen un oído rudimentario que, estructuralmente, carece de oído externo y de membrana timpánica, por lo que tienen una baja capacidad auditiva (Chippaux, 2006). Las serpientes de algunas familias presentan receptores especializados para percibir estímulos sensoriales, químicos y térmicos.

En cuanto a la reproducción, en la mayoría de las especies la fecundación es interna, existen especies ovovivíparas y algunas otras que presentan una placenta

verdadera. Los machos presentan dos hemipenes, de los cuales sólo uno es utilizado para la copulación.

II.3 Taxonomía.

Las serpientes son un grupo muy antiguo descendiente de los lagartos y se considera que su ancestro más cercano data del Triásico inferior, hace 250 millones de años (Chippaux, 2006). Actualmente se estima que existen alrededor de 3,000 especies de serpientes en el mundo (Vidal y Hedges, 2005).

Las serpientes pertenecen al Phylum Chordata, un gran grupo de animales con simetría bilateral, cuerpo segmentado, médula espinal o cordón nervioso. El subphylum del que forman parte es el Vertebrata, el cual comprende a organismos con endoesqueleto óseo o cartilaginoso, sistema muscular, sistema circulatorio cerrado, y sistema digestivo completo muscularizado en posición ventral. Las serpientes forman parte de la clase Reptilia que a su vez se divide en tres subclases: Anápsida (tortugas), Archosauria (cocodrilos) y Lepidosauria (lagartos y serpientes). Las serpientes figuran dentro del orden Squamata, suborden Ophidia, que a su vez se divide en tres superfamilias:

- Typhlopoidea (Scolecophidia). Las familias que la componen son: Anomalepidae, Typhlopidae, Leptotyphlopidae y a grandes rasgos incluyen a serpientes pequeñas (menores a 30 centímetros), terrestres, no venenosas y con sistemas oculares vestigiales, que se distribuyen en todo el mundo (Zug y col., 2001).

- Booidea (Henophidia). En general, las serpientes que pertenecen a este grupo son de hábitos terrestres, no venenosas, y se distribuyen en Asia y América. Las familias más estudiadas son: Anelliidae, Tropidophiidae, y Boidae. Las serpientes de la familia Anelliidae se conocen comúnmente como “falsos coralillos”, organismos terrestres de 60 a 100 centímetros de longitud, cuya distribución geográfica abarca el sur de América. La familia Tropidophiidae está conformada por un grupo de serpientes terrestres o semiarborícolas, que se distribuyen en América del Sur y América Central. Evolutivamente, estas serpientes representan un estadio intermedio entre la superfamilia Henophidia (Booidea) y Xenophidia (Colubroidea). Por último, la familia Boidae se constituye por boas, pitones y

anacondas, entre otras. Las serpientes de la familia Boidae exhiben una amplia distribución y los nichos ecológicos que éstas han colonizado son numerosos (Zug y col., 2001).

- Xenophidia (Colubroidea o Caenophidia) que a su vez se divide en las siguientes familias:

Acrochordidae. Familia compuesta únicamente por tres especies: *Acrochordus granulatus*, *A. arafurae* y *A. javanicus*, serpientes no venenosas de 30-60 centímetros, con hábitos acuáticos, cuya distribución abarca la región de Indo-Australia (Zug y col., 2001).

Atractaspididae. Se constituye por un género y 19 especies. Todas las serpientes de esta familia son venenosas y se distribuyen en África (Zug y col., 2001).

Colubridae. Esta familia heterogénea se define por 255 géneros y 1,405 especies. Las serpientes de este grupo poseen dentición opistoglifa (Tabla 1), todas son venenosas y comparten las características morfológicas generales de las serpientes (Chippaux, 2006).

Viperidae. Se compone por 36 géneros de serpientes venenosas que poseen una amplia distribución geográfica en el mundo (exceptuando Australia). Las serpientes pertenecientes a este grupo poseen hábitos terrestres, arborícolas y acuáticos. Su hábitat se extiende desde los bosques hasta los desiertos, incluyendo las zonas de alta montaña (Zug y col., 2001). Los géneros más estudiados son: *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Echis*, *Causus*, *Bitis*, *Crotalus* y *Cerastes*. Los miembros de estos géneros son las serpientes ponzoñosas mejor conocidas a nivel mundial debido a la importancia epidemiológica que representan para el hombre.

Elapidae. Este grupo es una familia heterogénea conformada por 60 géneros y 300 especies. Las serpientes que lo integran adquirieron, de manera convergente, la dentición proteroglifa (Tabla 1). Las serpientes de esta familia se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Aunque todavía no queda clara la taxonomía de esta familia, se considera que se divide en dos subfamilias: Hydrophiinae y Elapinae (Zug y col., 2001). La subfamilia Hydrophiinae está constituida por serpientes marinas con una morfología característica y algunas de ellas conservan la capacidad de desplazarse

en el medio terrestre (género *Laticauda*) (Zug y col., 2001). Por otro lado, la subfamilia Elapinae está compuesta por 16 géneros que en su totalidad comprenden a serpientes venenosas morfológicamente parecidas a las de la familia Colubridae. Entre los géneros más estudiados se encuentran: *Bungarus*, *Dendroaspis*, *Micruroides*, *Micrurus*, *Ophiophagus*, *Walterinnesia* y el género *Naja*. Las serpientes pertenecientes a estos géneros exhiben diferencias importantes en cuanto a su morfología, comportamiento y a los nichos ecológicos que habitan. Su distribución abarca los continentes de Asia, África, América y Oceanía (Zug y col., 2001). Al igual que algunas de las serpientes del grupo de los vipéridos, muchas de las especies integrantes de los géneros anteriormente mencionados tienen un papel sumamente relevante en la epidemiología del ofidismo en el mundo.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de las serpientes y ubicación del género *Naja*.

| |
|-------------------------------|
| Phylum: Chordata. |
| Subphylum: Vertebrata. |
| Clase: Reptilia. |
| Subclases: Anápsida. |
| Archosauria. |
| Lepidosauria. |
| Orden: Squamata. |
| Suborden Ophidia. |
| Superfamilias: Typhloidea. |
| Booidea. |
| Xenophidia. |
| Familias: Acrochorolidae. |
| Atractaspidae. |
| Colubridae. |
| Viperidae |
| Elapidae |
| Subfamilias: Hydrophiinae |
| Elapinae |
| Géneros: <i>Micrurus.</i> |
| <i>Dendroaspis.</i> |
| <i>Micruroides.</i> |
| <i>Ophiophagus.</i> |
| <i>Bungarus.</i> |
| <i>Naja.</i> |

II.4 Venenos.

Los venenos son una mezcla heterogénea de compuestos, principalmente proteínas, sintetizados en una glándula exócrina, que son inoculados por un aparato de

inyección de veneno especializado (Young y col., 2004). El aparato de inyección comprende un par de dientes modificados (colmillos) con una serie de adaptaciones que cada grupo de serpientes ha adquirido a lo largo de su evolución.

Los venenos de las serpientes contienen una gran variedad de enzimas (proteasas, fosfolipasas, entre otras), toxinas (neurotoxinas, cardiotoxinas, sarafotoxinas), aminoácidos, aminas biogénicas, lectinas, desintegrinas, carbohidratos, lípidos, nucleósidos y nucleótidos, entre otras moléculas (Warrell, 1995; Porto y col., 2006). A pesar de la similitud entre la composición de los venenos de serpientes del mismo género, familia o especie, se sabe con certeza que existe una variación intra- e interespecífica en sus componentes (Chippaux, 2006; Shashidharamurthy y Kemparaju, 2006). Esta variación se debe a factores geográficos, estacionales y ontogénicos (Chippaux y col., 1999).

Hasta ahora, los venenos de las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae son los más estudiados, debido a su importancia epidemiológica.

Los venenos de las serpientes de la familia Viperidae están compuestos por una alta concentración de componentes de mediano a alto peso molecular y son ricos en enzimas. Entre los componentes mayormente representados en los venenos de vipéridos se encuentran las proteasas hemorrágicas (hemorraginas), las proteasas de serina, las fosfolipasas, fosfatasas, L-amino oxidasas, proteasas, miotoxinas y péptidos.

Las hemorraginas son componentes de alto peso molecular característicos de los venenos de vipéridos; dichas proteasas son metaloproteasas, dependientes de un catión divalente, que interfieren con la hemostasis del organismo, es decir, la coagulación sanguínea (Ward, 1996).

Las proteasas de serina generalmente son enzimas que afectan la hemostasis (Markland, 1998).

Los venenos de las serpientes de la familia Elapidae están constituidos por una concentración elevada de componentes proteicos de bajo peso molecular y son particularmente pobres en enzimas. Existen tres grupos principales de polipéptidos

implicados en la toxicología y farmacología de los venenos de la familia Elapidae: las fosfolipasas, neurotoxinas y cardiotoxinas (Chiu y col., 1995). Todas éstas son moléculas estables tanto química como térmicamente (Chiu y col., 1995; Hung y col., 1998).

Las fosfolipasas tienen un amplio rango de acciones tóxicas, causando daño principalmente a nivel de membranas, inhibición de la coagulación sanguínea, hemólisis y pueden provocar desde mionecrosis hasta cardiotoxicidad y neurotoxicidad dependiendo del tipo de fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Meier, y Stocker, 1995; Shashidharamurthy y Kemparaju; 2006). Respecto a estas toxinas, se han llevado a cabo diversos estudios sobre su actividad catalítica, encontrándose diferentes tipos de PLA₂ cuyos niveles de acción varían. En el caso del veneno de la cobra *Naja naja*, se han reportado fosfolipasas ácidas que son citotóxicas. Éstas poseen la capacidad de desencadenar efectos hemolíticos (Rudramaji y Gowda, 1997) o de ejercer actividad neurótoxica postsináptica (Machiah y Gowda, 2006; Shashidharamurthy y Kemparaju; 2006). Además, se ha identificado que ciertas fosfolipasas de los venenos de las cobras *N. atra*, *N. kaouthia* y *N. sumatrana* pueden presentar actividad neurotóxica presináptica (Meier y Stocker, 1995).

Las neurotoxinas son proteínas de 57 a 74 aminoácidos que interfieren con la señalización neural. Estas toxinas se dividen en diferentes clases de acuerdo a: su modo de acción, el nivel en el que actúan y la conformación que presentan (Cuadro 2). Estas proteínas se encuentran altamente representadas en los venenos de serpientes de los géneros *Naja*, *Dendroaspis*, *Haemachatus*, *Bungarus* y *Micrurus*. La clasificación de las neurotoxinas, en base a su modo de acción, las agrupa en presinápticas y postsinápticas. Las neurotoxinas postsinápticas inhiben la transmisión de los estímulos nerviosos en la membrana postsináptica bloqueando los receptores colinérgicos (Chippaux, 2006). Las neurotoxinas postsinápticas más estudiadas y mayormente representadas, son las α -neurotoxinas. Estas toxinas suelen dividirse en α -neurotoxinas pequeñas (Grupo I: 60-62 aminoácidos) y en α -neurotoxinas grandes (Grupo II: 66-74 aminoácidos). Estas toxinas exhiben homología estructural, sin embargo difieren en la composición de aminoácidos, característica que les confiere ligeras diferencias en sus propiedades tóxicas (Chippaux, 2006). Las α -neurotoxinas de los venenos de serpientes del género *Naja* interfieren con la transmisión de estímulos en la placa neuro-muscular, inhibiendo la contracción de los músculos de manera que el sistema respiratorio puede resultar afectado

desencadenando, en los casos más severos, una parálisis respiratoria que puede ser fatal (Meier y Stocker, 1995).

Cuadro 2. Neurotoxinas en los venenos de serpientes (Koh y col., 2006).

| Tipo de neurotoxina. | Modo de acción | Venenos. |
|-------------------------------|--|---|
| Neurotoxinas de cadena larga. | Toxinas postsinápticas. Poseen como blancos a los nAChRs. | Elápidos e hydrophiidos (cobras, serpientes acuáticas, elápidos australianos). |
| Neurotoxinas de cadena corta. | Toxinas postsinápticas. Actúan sobre los nAChRs. | Elápidos e hydrophiidos (cobras, serpientes acuáticas, elápidos australianos). |
| Neurotoxinas débiles. | Toxinas postsinápticas. Con baja afinidad a sus blancos (nAChRs). | Elápidos (cobras, serpientes del género <i>Bungarus</i> y elápidos australianos). |
| Taipoxinas. | Toxinas presinápticas. Se unen específicamente a la membrana plasmática de las neuronas, principalmente en la placa neuromuscular. | Elápidos australianos. |
| β -Bungarotoxinas. | Toxinas presinápticas. Actúan sobre los canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje. | Elápidos del género <i>Bungarus</i> . |
| Neurotoxinas muscarínicas. | Toxinas que se unen específicamente a los mAChR. | Elápidos (mambas, cobras y serpientes del género <i>Bungarus</i>). |

nAChR, receptor nicotínico colinérgico; mAChR, receptor muscarínico colinérgico.

Las cardiotoxinas son pequeños polipéptidos relacionados con las α -neurotoxinas. Estas toxinas pueden afectar la fisiología del corazón, interfiriendo con la transmisión de estímulos nerviosos a través del bloqueo de los receptores de acetilcolina. Sin embargo, se ha demostrado que estos polipéptidos presentan menor afinidad por los receptores colinérgicos en comparación con las α -neurotoxinas (Hung y col., 1998; Koh y col., 2006).

II.5 El género *Naja*.

II.5.1 Características generales.

Este grupo está conformado por 18 especies de serpientes, comúnmente conocidas como cobras (Chippaux, 2006). Los miembros del género *Naja* son serpientes

venenosas de gran tamaño (1 a 4 metros), con hábitos terrestres, arborícolas e incluso acuáticos. La cabeza de las cobras posee una estructura peculiar que las define morfológicamente. La posición de defensa de estas serpientes es característica, ya que poseen la capacidad de levantarse a través de sus costillas cervicales (Warrell, 1995). El nombre común de cada especie obedece a la distribución y, en algunos casos, a ciertos rasgos morfológicos: *N. annulifera* (cobra bandeada), *N. atra* (cobra china), *N. haje* (cobra egipcia), *N. kaouthia* (cobra del monóculo), *N. katiensis* (cobra café del Oeste de África), *N. melanoleuca* (cobra negriblanca o cobra del bosque), *N. mossambica* (cobra de Mozambique), *Naja naja* (cobra india), *N. nigricollis* (cobra de cuello negro), *N. nivea* (cobra del cabo), *N. nubiae* (cobra Nuabiana), *N. oxiana* (cobra oxus), *N. pallida* (cobra roja), *N. philippinensis* (cobra filipina), *N. samarensis* (cobra de Samar), *N. sumatrana* (cobra de Sumatra), *N. sputatrix* (cobra de la isla de Suna y Java) y *N. siamensis* (cobra thai).

Algunas de ellas tienen, como sistema de defensa, la capacidad de escupir el veneno a su agresor o presa, entre éstas figuran las especies africanas *N. mossambica*, *N. nigricollis*, *N. pallida*, *N. katiensis*, *N. nubiae* y las especies asiáticas *N. philippinensis* y *N. siamensis*.

II.5.2 Distribución y hábitat.

Las serpientes del género *Naja* se distribuyen ampliamente en África y Asia, habitando principalmente en las regiones templadas y áridas. En el continente africano se encuentran las cobras escupidoras, *N. mossambica*, *N. nigricollis*, *N. katiensis*, *N. pallida* y *N. nubiae*, y las especies no escupidoras *N. melanoleuca*, *N. annulifera*, *N. haje* y *N. nivea* (Figura 3).

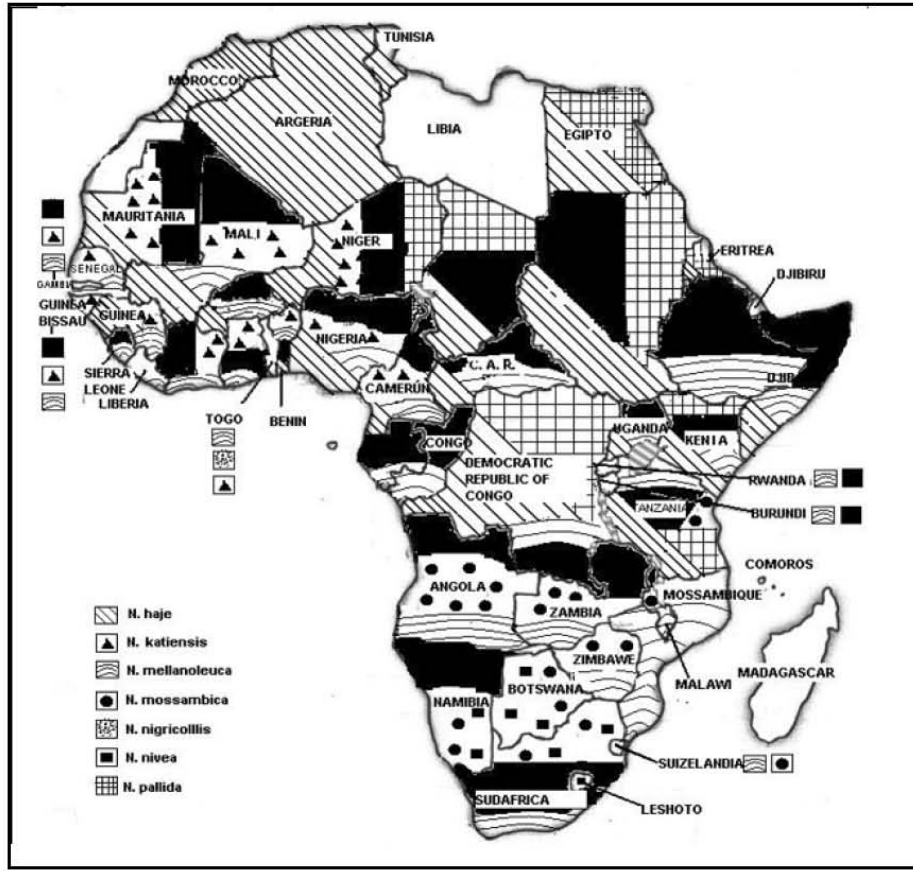


Figura 3. Distribución del género *Naja* en África.

En el continente asiático habitan las cobras escupidoras *N. philippinensis*, *N. samarensis*, *N. sumatrana*, *N. sputatrix* y *N. siamensis*, y las cobras no escupidoras *N. atra*, *N. kaouthia*, *N. naja* y *N. oxiana* (Figura 4).

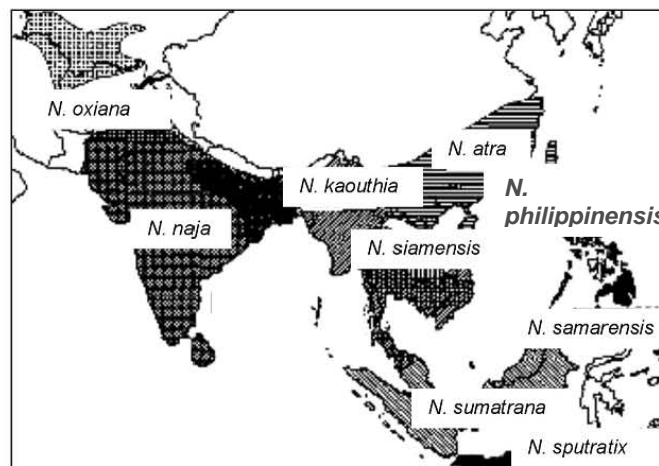


Figura 4. Distribución del género *Naja* en Asia (Wüster, 1996).

Las cobras han colonizado una amplia variedad de nichos ecológicos, por lo que habitan desde los bosques tropicales hasta las regiones desérticas, encontrándose en cualquier tipo de terreno, incluyendo campos de arroz, terrenos pedregosos, asentamientos humanos y regiones forestales.

II.5.3 El envenenamiento por el género *Naja*.

En el envenenamiento por mordedura de cobras los síntomas locales incluyen ampulación, inflamación y decoloración de la piel en el sitio de la mordedura, presentándose un dolor local inmediato. Los síntomas sistémicos que se manifiestan en la fase primaria del envenenamiento son el dolor de cabeza, vómito, somnolencia y dolor abdominal. Sin embargo, los efectos más importantes son la neurotoxicidad y la necrosis del tejido (Warrell, 1995). Estos síndromes se manifiestan en las personas afectadas dependiendo del grado de envenenamiento y de la composición proteica del veneno inyectado por las serpientes.

Los síndromes neurotóxicos son causados por componentes proteicos de los venenos como las neurotoxinas y cardiotoxinas, manifestándose como disfunciones neurológicas que resultan en parálisis musculares a diferentes niveles. Por otro lado, las fosfolipasas y proteasas son las principales responsables de los síndromes necróticos, provocando daño tisular en el lugar de la mordedura, y, en algunas ocasiones, en otros sitios (Warrell, 1995).

Los síntomas neurotóxicos son comunes en la mayoría de los envenenamientos y las manifestaciones tempranas suelen ser: los vértigos, visión borrosa, ptosis palpebral, oftalmoplegia, inflamación de la lengua y disfagia. La progresión de la neurotoxicidad puede ocasionar parálisis que comprometa al paladar, las mandíbulas, la lengua, las cuerdas vocales, los músculos del cuello y en los peores casos, los músculos intercostales y el diafragma, produciendo problemas a nivel respiratorio y eventualmente desencadenando una parálisis respiratoria. Por otro lado, los síntomas necróticos se presentan en algunos casos, manifestándose como necrosis superficial en el tejido afectado. La necrosis puede progresar a nivel subcutáneo, y en casos más severos, extenderse hasta los tendones y otros tejidos (Warrell, 1995).

La mordedura por las especies de cobras africanas escupidoras *N. katiensis*, *N. mosambica*, *N. nigricollis* y *N. pallida* causan un envenenamiento severo con síntomas locales y necróticos que provocan un dolor local intenso. El veneno de las especies escupidoras raramente desencadena efectos neurotóxicos, por lo que algunos autores las han descrito como cobras citotóxicas (Warrell, 1995; Tilbury, 1982). Por otra parte, se ha reportado que la mordedura por las cobras africanas no escupidoras *N. haje*, *N. melanoleuca* y *N. nivea*, además de la manifestación de los síntomas locales y sistémicos, causan un envenenamiento neurotóxico, por lo que algunos autores las definen como cobras neurotóxicas (Warrell, 1995; Baylock, 1985).

La definición de los grupos de cobras citotóxicas y neurotóxicas se basa en los reportes clínicos y descripciones de los accidentes ofídicos que se han elaborado hasta ahora, sin embargo, dada la escasez de los mismos, la información disponible resulta ser insuficiente para respaldar, de manera contundente, la existencia de ambos grupos.

En el caso de las cobras asiáticas, los envenenamientos mejor conocidos son los provocados por la mordedura de las serpientes *N. naja*, *N. atra* y *N. kaouthia*, ya que estas serpientes son las de mayor relevancia epidemiológica en Asia. En la mayoría de los envenenamientos causados por la cobra india (*N. naja*) se desarrollan síntomas primordialmente neurotóxicos (Warrell, 1995). En contraste, los síntomas necróticos resultan ser más comunes en los envenenamientos provocados por la cobra del monóculo y la cobra china (*N. kaouthia* y *N. atra*, respectivamente), aunque se han descrito algunos casos en los que aparecen síntomas neurotóxicos (Warrell, 1995; Gold, 1997). Existen pocos reportes referentes al envenenamiento causado por las cobras asiáticas *N. oxiana*, *N. philippinensis* y *N. siamensis*, sin embargo, se considera que los efectos de su envenenamiento son principalmente neurotóxicos (Warrell, 1995; Watt, y col., 1988).

En el caso de las cobras escupidoras, cuando el veneno es expulsado a sus víctimas y éste tiene contacto con los ojos o las mucosas nasales, causa daños locales como ardor, dolor intenso e irritación (Ismail, 1993; Westhoff, y Tzscha, 2005).

II.6 Antivenenos.

II.6.1 Generalidades y evolución.

Los antivenenos son el único tratamiento específico conocido para los envenenamientos causados por mordeduras de serpientes. Éstos se componen de anticuerpos (inmunoglobulinas) o de fragmentos de éstas ($F(ab')_2$ o Fab) cuya función es neutralizar los componentes tóxicos del veneno impidiendo la interacción de las toxinas con su blanco. Aunque el modo de obtención de los antivenenos se conoce desde hace un siglo, los procedimientos de producción y su uso terapéutico se han desarrollado rápidamente desde la segunda mitad del siglo XX.

En 1887 Sewall inmunizó a una paloma contra el veneno de la serpiente americana *Sistrurus catenatus* inoculando el veneno glicerinado en repetidas ocasiones. Aunque el protocolo experimental no fue optimizado, el animal productor fue capaz de sobrevivir a más de seis veces la dosis letal del veneno, acontecimiento relevante para los estudios subsecuentes. En 1888 Roux y Yersin demostraron que la administración de la sangre de un caballo inmunizado contra la toxina de difteria confería protección contra esta enfermedad a otro organismo. Posteriormente en 1890, Behring y Kitasato confirmaron clínicamente la transferencia pasiva de la inmunidad contra la difteria y el tétanos, demostrando la existencia de los anticuerpos, suceso que originó la *terapia sérica*. En 1894 Phisalix y Bertrand, demostraron que la sangre obtenida de caballos *vacunados* (inmunizados) con veneno atenuado por temperatura poseía una propiedad particular contra el veneno utilizado, a la que denominaron propiedad *anti-toxina*. En ese mismo año Calmette, quien había estudiado los venenos de cobras en Saigón, y había trabajado con tres protocolos de inmunización observó, al igual que Phisalix y Bertrand, que el suero equino obtenido de animales *vacunados* (inmunizados) poseía un efecto terapéutico, por lo que desarrolló y comercializó el primer antiveneno sérico para uso médico contra la mordedura de la cobra india *N. naja* (Chippaux y Goyffon, 1998).

En años posteriores, muchos otros comenzaron la producción de antivenenos en diferentes países como: MacFarland en Filadelfia, E.U.A. (1899); Brazil en Sao Paulo, Brasil (1902); FitzSimons en Johannesburgo, Sudáfrica (1902); Lister en Londres,

Inglaterra (1905), entre otros. Todos ellos produjeron antivenenos séricos basándose en los protocolos desarrollados por Calmette (Chippaux, 2006).

Hasta entonces, los antivenenos eran sueros crudos obtenidos de la hiperinmunización de caballos. Éstos son denominados antivenenos de primera generación y se utilizaron hasta 1930, sin embargo, aún quedan algunos productores de los mismos. Los antivenenos de primera generación presentaban una composición proteica heterogénea, por lo que en la aplicación del antiveneno a los pacientes se administraban diferentes clases de proteínas propias del suero de caballo además de las proteínas neutralizantes (inmunoglobulinas), de manera que las reacciones alérgicas eran muy frecuentes. Posteriormente, surgieron los antivenenos de la segunda generación mediante la implementación de métodos de purificación de las inmunoglobulinas a través de la utilización de agentes precipitantes. La administración de estos antivenenos redujo la manifestación de reacciones de hipersensibilidad y de la enfermedad del suero. Actualmente, estos antivenenos se utilizan ampliamente en el mundo entero (Alagón, 2006).

En 1940 se inició el estudio de la modificación proteolítica a través de varias enzimas sobre las inmunoglobulinas, permitiendo la elucidación de nuevas propiedades inmunogénicas de los fragmentos de las mismas. Surgieron así los antivenenos de tercera generación, denominados faboterápicos: fragmentos $F(ab')_2$ obtenidos por la digestión de las inmunoglobulinas con pepsina. El uso de los faboterápicos ha disminuido considerablemente las reacciones anafilácticas y la enfermedad del suero. Entre algunas de las ventajas del uso de los faboterápicos se encuentra la maximización de la eficiencia de la neutralización de componentes de los venenos que actúan fuera del torrente sanguíneo, debido a que los faboterápicos son capaces de acceder significativamente al compartimiento extravascular (Alagón, 2002).

II.6.2 Protección específica y paraespecífica.

La protección específica de un antiveneno se refiere a la neutralización de la toxicidad del veneno de una especie utilizado en la inmunización de animales de producción. Por otra parte, la protección paraespecífica se da por la neutralización cruzada de venenos de otras especies por un antiveneno obtenido a partir de un veneno

determinado. Dicho antiveneno contiene anticuerpos que tienen diferentes niveles de reconocimiento antigénico con otros venenos, además del específico. Por lo anterior, se pueden definir diferentes *grupos antigénicos*, es decir, agrupamientos de venenos de diferentes especies cuyos efectos tóxicos pueden ser neutralizados por los anticuerpos generados mediante la inmunización con un veneno específico.

Existen antivenenos monovalentes y polivalentes, los primeros son obtenidos a través de la inmunización de animales de producción con un solo veneno, mientras que los antivenenos polivalentes se producen a partir de una mezcla de venenos distintos. Éstos pueden ser utilizados exitosamente cuando la serpiente agresora no es de la misma especie que la utilizada para la obtención del antiveneno debido a que pueden presentar reacciones cruzadas inmunogénicas con diferentes venenos (de Roodt y col., 1998).

Las primeras observaciones de la composición antigénica diferencial que existe entre los venenos y de la reactividad cruzada inmunogénica de un antiveneno se describieron en los estudios de Edmund Grasset (Hawgood, 2001). Con el fin de desarrollar un antiveneno polivalente eficaz para la población africana y caracterizar las propiedades inmunogénicas de ciertos venenos, en 1927 Grasset produjo *anavenenos* antigénicos (venenos no tóxicos), a partir de venenos tanto de vipéridos como de elápidos. Posteriormente Grasset desarrolló un antiveneno divalente en contra de los venenos de *B. arietans* y *N. nivea*. Los estudios experimentales demostraron que el antiveneno era capaz de neutralizar los venenos de *N. haje*, *N. nigricollis* y *D. angusticeps*, mientras que no existía protección contra el veneno de *B. gabonica*. Los resultados de los estudios de neutralización reflejaron la capacidad de protección específica y paraespecífica del antiveneno, así como la diferencia en las propiedades inmunogénicas de los venenos (Hawgood, 2001).

Continuando con las investigaciones de Grasset, Paul Christensen en 1946, examinó la protección cruzada del antiveneno *N. nivea-B.arietans*, ya optimizado para entonces, y observó que el veneno de la cobra africana *H. haemachatus* presentaba una estrecha relación inmunogénica con los venenos de *N. nivea* y *B. arietans* ya que este veneno fue neutralizado eficazmente por el antiveneno. Asimismo, Christensen llegó a la conclusión de que el veneno de *H. haemachatus* podía ser agregado al esquema de inmunización para la producción de un antiveneno polivalente con un espectro de

protección más amplio. Por otro lado, sus estudios revelaron que los antivenenos monovalentes y polivalentes contra *B. arietans* tenían una baja neutralización contra los venenos de serpientes del mismo género, sin embargo, otro antiveneno contra el veneno de *B. gabonica* neutralizaba satisfactoriamente a los venenos de otras serpientes del género *Bitis* de importancia epidemiológica. Posteriormente, amplió la protección cruzada del antiveneno incluyendo los venenos *E. carinatus-H. haemachatus-N. nivea-B. arieans-B. gabonica*. Este antiveneno demostró tener protección paraespecífica contra el envenenamiento por mordedura de cobras y vipéridos del sur y centro de África y de serpientes del género *Echis* en el noreste de este continente (Hawgood, 2001).

III. ANTECEDENTES.

En el laboratorio del Dr. Roberto Stock del Instituto de Biotecnología de la UNAM la M. en C. Blanca Ramos realizó estudios de reactividad cruzada inmunogénica entre antisueros experimentales de conejo y venenos de cobras africanas. En dicho estudio, se midió la reactividad cruzada *in vitro* de ocho antisueros experimentales monovalentes de conejo contra una batería de nueve venenos de serpientes del género *Naja*, obteniendo claras relaciones de parentesco antigénico entre los venenos de diferentes especies. De acuerdo a los resultados, se definieron tres grupos antigénicos de forma preliminar: el complejo *haje*, el complejo *mossambica* y el complejo *melanoleuca*. La división de los complejos obedece al reconocimiento paraespecífico medido *in vitro* de los antisueros monovalentes con los distintos venenos.

El complejo *haje* se constituye por los venenos de *N. annulifera*, *N. haje*, *N. mossambica* y *N. nivea*, que fueron reconocidos en al menos un 75% por el antisuero experimental anti-*N. haje*. El complejo *mossambica* incluye a los venenos de las cobras escupidoras *N. mossambica*, *N. katiensis*, *N. nigricollis*, *N. pallida* y *N. nubiae*, en donde el antisuero experimental anti-*N. mossambica* reconoció paraespecíficamente a los venenos del complejo en un 90%. Por último, el antisuero experimental anti-*N. melanoleuca* presentó un reconocimiento mínimo por la totalidad de los venenos, mientras que el veneno homólogo (*N. melanoleuca*) fue reconocido por los demás antisueros en al menos un 40%. El reconocimiento paraespecífico de los antisueros por los venenos de las cobras asiáticas fue de aproximadamente un 50% en todos los casos. Este estudio reflejó un parentesco antigénico evidente entre el veneno *N. mossambica* con el resto de los venenos de las serpientes del género *Naja*.

En esta tesis de licenciatura se continuó con los estudios de parentesco antigénico entre los venenos de las cobras, tomando en cuenta el reconocimiento paraespecífico significativo del antisuero de conejo anti-*N. mossambica*. Con el fin de comparar y establecer dichas relaciones con los sueros de conejo anteriormente analizados, se evaluó la reactividad cruzada (medición *in vitro*) del antisuero experimental de origen equino anti-*Naja mossambica* contra una batería de venenos de especies del género *Naja* tanto de África como de Asia. El antisuero anti-*N. mossambica* fue obtenido por el M. en C. Alejandro Carbajal que trabaja en el Laboratorio del Dr. Alejandro Alagón perteneciente

al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología. Los resultados de este estudio revelaron evidentes relaciones antigénicas entre los venenos del género *Naja*, ya que el antisuero experimental anti-*N. mossambica* reconoció significativamente (40-100%) a todos los venenos heterólogos analizados. Posteriormente, se realizaron los ensayos correspondientes a la determinación de la potencia neutralizante del antisuero experimental anti-*N. mossambica* y se encontró que ésta era nula.

IV. OBJETIVOS.

III.1 Objetivo general.

Estudiar la reactividad cruzada entre venenos de diferentes especies del género *Naja* mediante el uso de un antisuero monovalente experimental contra la especie *N. melanoleuca*.

III.2 Objetivos particulares.

- Comparar los títulos relativos del suero monovalente experimental anti-*N. melanoleuca* contra los diferentes venenos del género *Naja* mediante inmunoensayos in vitro (ELISA).
- Determinar la potencia neutralizante específica y paraespecífica del suero anti-*N. melanoleuca* en términos de dosis efectiva media (DE50) contra una batería de venenos de especies del género *Naja*.

V. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que el envenenamiento causado por la mordedura de serpientes es un problema de salud pública en ciertas partes del mundo, principalmente en Asia y África, la generación de antivenenos eficaces y accesibles para la población resulta una necesidad fundamental. Si bien la mordedura por las serpientes del género *Naja* no ocasiona la mayor parte de los envenenamientos en el continente africano, forman parte de las especies cuyo envenenamiento tiene importancia epidemiológica pues, pese a los pocos estudios prospectivos que existen, se sabe que causan alrededor del diez por ciento de los envenenamientos y que son responsables de una alta tasa de mortalidad. Por esta razón, resulta de suma importancia entender la toxicidad e inmunogenicidad de los venenos de las serpientes de este género por las implicaciones que tiene la reactividad cruzada en la potencia neutralizante de antisueros experimentales, ya que esto contribuirá de manera sustancial a la generación y el mejoramiento de antivenenos.

VI. HIPÓTESIS.

Dado que los venenos de serpientes del mismo género suelen estar relacionados en términos de composición, y que existe un reconocimiento cruzado medido *in vitro*, es posible esperar que exista neutralización de los efectos tóxicos del veneno homólogo y de algunos venenos heterólogos, lo cual se reflejará en la determinación de la potencia neutralizante específica y paraespecífica del antisuero anti-*Naja melanoleuca* medida *in vivo*.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

VII.1 Materiales.

VII.1.1 Reactivos.

Los reactivos de uso general fueron de las siguientes firmas comerciales: ROCKLAND, PIERCE, ZYMED, BIO-RAD, SIGMA Y MERCK.

VII.1.1.1 BCA.

Para la cuantificación de proteínas de los venenos se utilizó el kit comercial BCA Protein Assay (PIERCE).

VII.1.1.2 Adyuvantes.

El adyuvante es una sustancia que estimula inespecíficamente la respuesta inmune frente a un antígeno. El adyuvante más utilizado en la producción de antisueros en animales es el adyuvante de Freund, del cual existen dos versiones: el completo (CFA) y el incompleto (IFA), ambos compuestos por aceite mineral, sin embargo, el primero va acompañado de células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de activar eficientemente a la respuesta inmune del animal productor (Ramos, 2005). Para la producción de los antisueros experimentales utilizados en este trabajo se usaron las dos versiones del adyuvante de Freund (Rockland). Éstos se utilizaron formando una emulsión compuesta por adyuvante y solución antigénica acuosa (veneno) en proporción 1:1. La alúmina (PIERCE), se usó en emulsiones 1:2 alúmina-veneno.

VII.1.1.3 Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay).

- Anticuerpo purificado IgG de conejo anti-caballo conjugado a fosfatasa alcalina (ROCKLAND).
- Sustrato p-nitrofenil fosfato (PNPP) 100X (ZYMED).

VII.1.1.3.1. Soluciones para ELISA.

- Solución de sensibilización (100 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9.6).
- Solución de lavado concentrado para ELISA 10X (0.5 M Tris/HCl pH8 + 1.5 M NaCl).
- Solución de bloqueo para ELISA (0.05 M Tris/HCl pH8 + 0.5% gelatina + 0.2% Tween 20).
- Solución vehículo para la incubación de anticuerpos y conjugados en ELISA (0.05 M Tris/HCl pH 8 + 0.5 M NaCl+ 0.1% de gelatina +0.05% Tween 20).
- Solución para sustrato PNPP 10X (ZYMED).

VII.1.2 Animales vivos.

En los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de 18-20 g de peso, adquiridos en el bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM.

VII.1.3 Venenos.

En este estudio se utilizaron los venenos liofilizados de distintas procedencias. Las preparaciones de veneno se hicieron con la solución 150 mM NaCl. En la tabla que a continuación se muestra, se presentan los venenos que se usaron en este trabajo.

Tabla 3. Venenos utilizados en este estudio.

| Veneno de: | Lote | Fuente de procedencia |
|--|-------------|---------------------------------|
| <i>Dendroaspis viridis</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Haemachatus haemachatus</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja annulifera</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja annulifera</i> | ND* | Medtoxin (MED) |
| <i>Naja annulifera</i> | ND* | Zoológico de Kentucky (KZoo) |
| <i>Naja atra</i> | 920-100 | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja haje haje</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja kaouthia</i> | 506-000 | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja katiensis</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja melanoleuca</i> | 905-040 | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja melanoleuca</i> (Norte de Camerún) | 626-050 | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja mossambica</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja naja</i> | 215-000 | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja nigricollis</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja nivea</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja nivea</i> | ND* | Medtoxin (MED) |
| <i>Naja nivea</i> | ND* | Zoológico de Kentucky (KZoo) |
| <i>Naja nubiae</i> | 101-027 | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja oxiana</i> | 911-040 | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja pallida</i> | ND* | Latoxan (LTXN) |
| <i>Naja siamensis</i> | 712-130 | Latoxan (LTXN) |

*No determinado

VII.1.4 Software.

El análisis de los datos experimentales se realizó en sistemas Macintosh utilizando los siguientes paquetes informáticos:

- Kaleidagraph v.3.0 de Abelbeck software.
- Prism v. 4.0 de Graph Pad Software.

VII.2 Metodología

VII.2.1 Producción del antisuero de origen equino anti-*Naja melanoleuca*.

El antisuero experimental anti-*N. melanoleuca* fue obtenido por el M. en C. Alejandro Carvajal que labora en el Laboratorio del Dr. Alejandro Alagón ubicado en el

Instituto de Biotecnología, a través de la hiperinmunización de un caballo con el veneno de *Naja melanoleuca* (LTXN, Norte de Camerún). En la tabla que a continuación se presenta se muestra el esquema de inmunización utilizado.

Tabla 4. Esquema de inmunización contra veneno crudo de *N. melanoleuca* para la producción del antisuero experimental de origen equino anti-*N. melanoleuca*.

| Día | No. Inmunización | Veneno (µg) | Adyuvante | Sangría |
|-----|------------------|-------------|-----------|----------------|
| 0 | 1 | 10 | CFA* | Preimmune |
| 15 | 2 | 20 | IFA* | |
| 30 | 3 | 40 | ALUM* | |
| 45 | 4 | 40 | IFA* | 1 ^a |
| 60 | 5 | 80 | ALUM* | |
| 75 | 6 | 150 | IFA* | |
| 90 | 7 | 300 | ALUM* | 2 ^a |
| 105 | 8 | 300 | IFA* | |
| 120 | 9 | 500 | ALUM* | |
| 135 | 10 | 750 | IFA* | 3 ^a |
| 150 | 11 | 1000 | ALUM* | |
| 171 | 12 | 1000 | IFA* | |
| 186 | | | | 4 ^a |
| 201 | | | | |
| 232 | 13 | 2000 | S/A * | 5 ^a |
| 247 | | | | 6 ^a |

*CFA, Adyuvante completo de Freund; IFA, Adyuvante incompleto de Freund; ALUM, Alúmina; S/A, Sin adyuvante.

El protocolo de inmunización consistió en inmunizar al caballo por inoculación subcutánea cada quince días con cantidades crecientes del veneno *Naja melanoleuca* en PBS, mezclado a partes iguales con adyuvante de Freund o alúmina intercaladamente durante los primeros 180 días. La última inmunización se hizo sin adyuvante y fue temporalmente irregular. En total, se llevaron a cabo trece inmunizaciones. Las primeras cuatro sangrías estuvieron espaciadas por tres inmunizaciones, mientras que la quinta y la sexta se hicieron de forma irregular. En cada sangría se extrajeron 500 ml de sangre del caballo. En todos los casos en que se llevó a cabo tanto inmunización como sangría del caballo en el mismo día, la obtención del suero se realizó previamente a la inmunización correspondiente.

La sangre se incubó a 37°C para permitir la coagulación y después se centrifugó a 15,000 r.p.m. durante 20 minutos, con el fin de quitar las células sanguíneas y proteínas coaguladas. Posteriormente, el suero se separó y se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a – 20°C hasta su uso.

VII.2.2 Determinación de proteínas por BCA.

La preparación de las soluciones de veneno se realizó pesando la cantidad necesaria de cada veneno liofilizado. Posteriormente, cada veneno se disolvió en la una solución de 150 mM NaCl a temperatura ambiente y se hicieron alícuotas de 500 µl que fueron almacenadas a -20°C. La determinación de proteínas de los venenos se llevó a cabo por el método del ácido bicinconínico utilizando el kit comercial BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE). El ácido bicinconínico (BCA) en su forma de sal sodio es un reactivo estable, sensible y muy específico que reacciona con el ion cuproso (Cu^{+1}). La presencia de enlaces péptidicos y la contribución de cadenas laterales de aminoácidos como la cisteína, triptofano y tirosina son responsables de una reacción colorimétrica ya que la proteína reacciona con el ion cúprico (Cu^{+2}) en un medio alcalino produciendo iones cuprosos (Cu^{+1}) que, al formar complejos con el BCA, generan una coloración púrpura con un máximo de absorción de 570 nm.

Para este ensayo fue necesario hacer una curva estándar con albúmina sérica bovina a concentraciones de 20, 40, 80, 160 y 320 µg/ ml. Como control negativo se usó la solución NaCl 150 mM. Todas las cuantificaciones se hicieron por triplicado y se leyeron a 570 nm en un lector TECAN SUNRISE.

En la siguiente tabla se muestra la concentración de las preparaciones de veneno cuantificado por peso y por BCA, así como el equivalente de 1 µg por peso a µg por BCA para cada veneno (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de las preparaciones de veneno determinada por peso y por la cuantificación por el método del ácido bicinconínico.

| Veneno | μg de veneno pesados para las preparaciones. | μl de NaCl 150mM en que se disolvió el veneno. | Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$) por peso. | Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$) por BCA | μg de veneno por BCA/ μg de veneno por peso |
|-----------------------|---|---|---|---|---|
| <i>N. melanoleuca</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 3720.65 | 1.86 |
| <i>N. pallida</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2862.5 | 1.43 |
| <i>N. nubiae</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2847 | 1.42 |
| <i>N. haje haje</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2575.86 | 1.29 |
| <i>N. nigricollis</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2913.1 | 1.46 |
| <i>N. katiensis</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2366.5 | 1.18 |
| <i>N. nivea</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2729.5 | 1.36 |
| <i>N. mossambica</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2540.2 | 1.27 |
| <i>N. haemachatus</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 3292.1 | 1.64 |
| <i>N. annulifera</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2503.06 | 1.25 |
| <i>N. naja</i> | 2000 | 1000 | 2000 | 2373.56 | 1.18 |

Para todos los venenos existieron diferencias entre la concentración por peso y la determinación de proteína por BCA. Estas diferencias se pueden deber a las imprecisiones experimentales en el pesado y, en particular, a la composición de los venenos en términos de contenido de agua (grado de hidratación), componentes no proteicos y de la diferente reactividad de las proteínas en relación a la proteína utilizada como estandar (BSA).

VII.2.3 Medición de títulos por ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay).

La titulación de los anticuerpos a partir del antisuero anti-*Naja melanoleuca* contra el veneno *Naja melanoleuca* y contra los venenos heterólogos se realizó mediante ensayos de ELISA directo. La técnica se basa en la interacción antígeno-anticuerpo que es detectada por un conjugado, compuesto de un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal colorida (Roitt, 2001). El título se define como la dilución de antisuero en la cual se encuentra la mitad de la respuesta máxima (absorbancia).

La prueba de ELISA directo se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- Se sensibilizó cada placa de 96 pozos para ELISA (NUNC Brand Products) con una solución de antígeno a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ reconstituida en la solución de sensibilización para ELISA (100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5). Por cada pozo se colocaron 100 μl hasta la columna 11, ya que la columna 12 se usó como control negativo, de manera que en cada pozo se colocaron 100 ng de antígeno. La placa se incubó toda la noche a 4°C.

- Después la placa se lavó tres veces con 200 μl de solución de lavado. Este proceso se repitió entre cada paso a lo largo del protocolo.

- Posteriormente se bloqueó la placa para evitar las uniones inespecíficas con 200 μl de solución de bloqueo, durante dos horas a 37°C.

- Al finalizar la etapa de bloqueo se lavaron los pozos de la placa y se incubó el suero a concentraciones variables. Para esto se hicieron diluciones seriadas del suero, comenzando con 1:30 en solución de reacción para ELISA. En cada pozo se adicionaron 100 μl de la solución de reacción y se mezclaron 50 μl por pozo con una dilución 1:10 del suero en la columna 1, para proceder con las diluciones seriadas (1:3) hasta la columna 10 quedando como controles la columna 11 y 12. Se dejó incubar a temperatura ambiente una hora.

- Una vez concluida la incubación se lavaron los pozos con solución de lavado y se adicionaron 100 μl por pozo del segundo anticuerpo de conejo anti-caballo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina diluido 1:2000 en solución de reacción, hasta la columna 11 y se incubó una hora a temperatura ambiente.

- Posteriormente, se lavaron los pozos y la reacción se reveló con 100 μl por pozo de sustrato PNPP incubándose hasta 25 minutos a temperatura ambiente haciéndose lecturas de las placas a 405 nm cada 5 minutos.

- Para determinar los títulos del suero en base a las lecturas obtenidas se utilizó el programa Prism, de tal forma que los datos experimentales se ajustaron por regresión no lineal mediante una sigmoide dosis-respuesta de pendiente variable.

VI.2.4 Medición de la reactividad cruzada del antisuero anti-*Naja melanoleuca* por ELISA directo.

La medición de la reactividad cruzada del antisuero experimental anti-*N. melanoleuca* con los diferentes venenos se determinó a través del cálculo de los títulos relativos del antisuero. El título relativo se obtuvo tomando el título absoluto del antisuero contra el veneno homólogo (*Naja melanoleuca*, LTXN Norte de Camerún) como el reconocimiento del 100% (reconocimiento específico) y normalizando los títulos del antisuero contra cada uno de los demás venenos con respecto al reconocimiento específico, lo cual permitió calcular el porcentaje de reconocimiento paraespecífico.

VII.2.5 Medición de la toxicidad de los venenos (Dosis Letal Media; DL50).

La determinación de la potencia letal de los venenos se basa en la relación toxicológica entre la concentración del veneno a la cual se expone el organismo modelo y el efecto del mismo. Existen diversas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de utilidad, el indicador más utilizado es la muerte del organismo para encontrar la dosis letal media (DL50). La DL50 se define como la dosis que provoca la muerte de la mitad de los animales experimentales. En la medición de la toxicidad de los venenos se presenta una variación considerable debido al error experimental en la preparación y administración del veneno, y a la variabilidad intrínseca de los animales experimentales (Theakston, 2003).

En este trabajo se midió la toxicidad de los venenos mediante la determinación de la dosis letal media (DL50). Para determinar la DL50 de cada veneno, se administró el veneno por vía intravenosa a grupos de cinco ratones (de 18-20 g) de la cepa CD-1 a diferentes dosis y se evaluó el porcentaje de mortalidad de los mismos después de 24 y 48 horas. Posteriormente, los datos experimentales se ajustaron por regresión no lineal a través de una curva sigmoide dosis-respuesta por el programa Prism para encontrar la DL50.

VII.2.6 Medición de la potencia neutralizante del antisuero anti-*Naja melanoleuca* (Dosis efectiva media; DE50).

La medición de la potencia neutralizante del antisuero anti-*N. melanoleuca* se llevó a cabo mediante la determinación de la dosis efectiva media (DE50). La DE50 se definió como la dosis de antisuero que, mezclada con tres DL50, es necesaria para que sobreviva la mitad de la población de animales experimentales.

La DE50 se determinó administrando a grupos de cinco ratones (de 18-20g) de la cepa CD-1 por vía intravenosa, una preparación de 3DL50 de los venenos preincubada con diferentes cantidades del antisuero anti-*N. melanoleuca* y se evaluó el porcentaje de supervivencia de los animales después de 24 y 48 horas. El volumen inoculado siempre fue de 500 μ l por animal. Los controles positivos de los venenos consistieron en grupos de cinco ratones inyectados con 3DL50 de cada veneno. Los datos obtenidos se analizaron por un método no paramétrico en el programa Prism que, mediante el ajuste de los datos por una regresión no lineal a través de una curva sigmoidea dosis-respuesta, titula la DE50.

VIII. RESULTADOS.

VIII.1 Caracterización de un antisuero experimental anti-*Naja melanoleuca*.

VIII.1.1 Evolución de títulos.

La medición por ELISA directo del reconocimiento específico permitió evaluar la evolución de los títulos del antisuero contra el veneno *N. melanoleuca* utilizado para la inmunización.

El análisis de los títulos refleja que a partir de las primeras tres inmunizaciones, en la primera sangría, hay un reconocimiento específico alto (Figura 5). Los sueros de la primera y segunda sangría presentaron los títulos más altos (Tabla 7). El reconocimiento por el veneno disminuye después de la novena inmunización, lo que se demuestra con el decaimiento de los títulos del suero de la tercera, cuarta, quinta y sexta sangría.

Tabla 7. Título de las sangrías del antisuero de caballo anti-*N. melanoleuca* medido *in vitro*.

| No. de inmunización | Sangría | Día de sangría | Título | SD |
|---------------------|----------------|----------------|--------|------|
| 3 | 1 ^a | 45 | 29061 | 201 |
| 6 | 2 ^a | 90 | 34811 | 159 |
| 9 | 3 ^a | 135 | 25176 | 3561 |
| 12 | 4 ^a | 201 | 25683 | 132 |
| 13 | 5 ^a | 232 | 12318 | 1012 |
| -* | 6 ^a | 247 | 14119 | 1755 |

* La sexta sangría se obtuvo después de la última inmunización (No. 13).

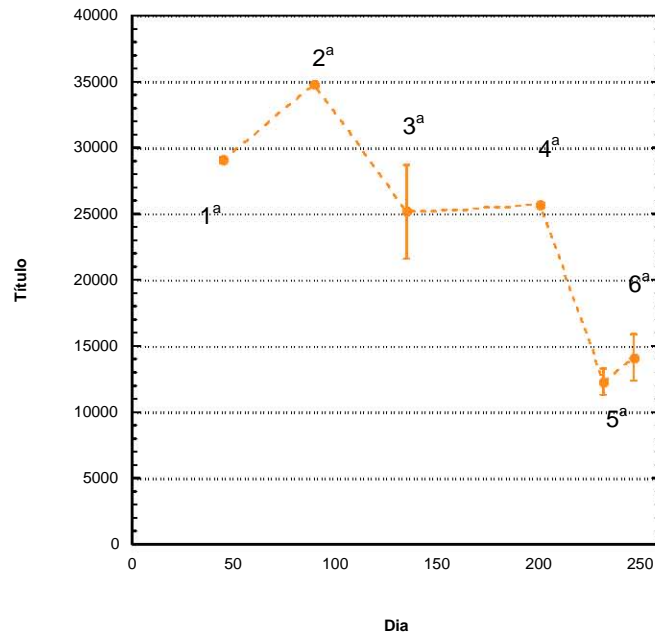


Figura 5. Evolución de los títulos del antisuero de origen equino anti-*Naja melanoleuca*. Títulos de las diferentes sangrías del antisuero (1ª-6ª) mediante el reconocimiento específico del antisuero por el veneno *N. melanoleuca*.

VIII.1.2 Comparación entre diferentes lotes de venenos de *N. melanoleuca*.

El reconocimiento específico por el antisuero anti-*N.melanoleuca* de venenos *Naja melanoleuca* de lotes de distinto origen (*N. melanoleuca*, LTXN; *N. melanoleuca*, MED; y *Naja melanoleuca*, Kzoo) se midió por medio de ensayos tipo ELISA directo, con la finalidad de estudiar variaciones en la antigenicidad intraespecífica de los venenos de *N. melanoleuca*. Como control negativo se utilizó el veneno del elápidó *Dendroaspis viridis* (Figura 6) cuya composición es muy diferente a la de los venenos de las serpientes del género *Naja*.

El reconocimiento específico por el antisuero de todos los venenos resultó similar, del 90 al 100 %, particularmente para los venenos de los lotes provenientes de las casas proveedoras LTXN y MED (Figura 6). El veneno de KZoo fue reconocido significativamente mejor (~150%) en comparación al resto de los venenos (Figura 6). Lo anterior se puede explicar por la conocida variabilidad

intraespecífica que existe entre los venenos de serpientes (Chippaux, 2006; Shashidharamurthy, 2006).

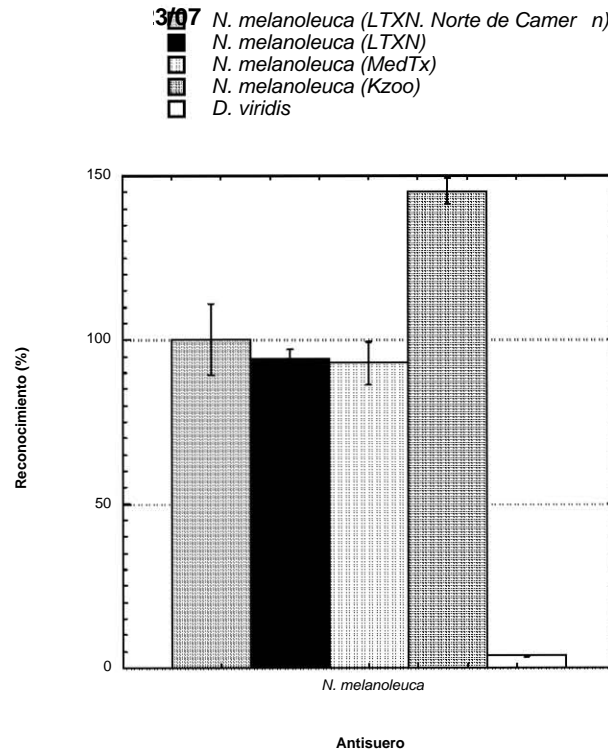


Figura 6. Reconocimiento por el antisuero anti-*N. melanoleuca* (4ª sangría) de los venenos de *N. melanoleuca* de distinto origen, con respecto al reconocimiento específico del veneno *N. melanoleuca* (LTXN, Norte de Camerún), utilizado en la inmunización.

VIII.1.3 Determinación de la potencia neutralizante específica del antisuero.

La medición de la potencia neutralizante específica se realizó mediante la determinación de la DE50 del antisuero anti-*N. melanoleuca* contra el veneno *N. melanoleuca*, utilizado en la producción del antisuero.

Al inicio de la determinación se seleccionó el suero de la sangría con mayor potencia neutralizante. Para lo anterior se utilizaron los sueros de la primera, cuarta y sexta sangría, cuyos títulos, determinados por las mediciones de reconocimiento específico medido *in vitro*, resultaron ser altos (Tabla 7). La evaluación de la potencia neutralizante de estas tres sangrías se realizó a través de la administración de diferentes dosis de antisuero retadas contra 3DL50 del veneno *N. melanoleuca*. El suero de la cuarta sangría presentó la capacidad neutralizante más

alta, ya que con una cantidad menor a las otras sangrías fue capaz de neutralizar totalmente los efectos del veneno (Tabla 8).

Tabla 8. Selección de la sangría anti-*N. melanoleuca* con mayor potencia neutralizante. Evaluación de diferentes dosis de antisuero de cada sangría (1^a, 4^a y 6^a) retadas con 3DL50 del veneno homólogo, realizada en grupos de cinco ratones.

| Grupo | Sangría | Antiveneno (μ l/ratón) | Sobrevida (%) 24h | Sobrevida (%) 48h |
|-------|----------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 1 ^a | 40 | 0 | 0 |
| 2 | 4 ^a | 40 | 0 | 0 |
| 3 | 6 ^a | 40 | 0 | 0 |
| 4 | 4 ^a | 130 | 100 | 100 |
| 5 | 6 ^a | 130 | 100 | 100 |
| 6 | 4^a | 80 | 100 | 100 |
| 7 | 6 ^a | 80 | 40 | 40 |
| 8 | 4^a | 60 | 100 | 100 |
| 9 | 6 ^a | 60 | 25 | 25 |

Posteriormente, se procedió a determinar la DE50 específica del antisuero anti-*N. melanoleuca* con la cuarta sangría, obteniendo los resultados que se presentan a continuación.

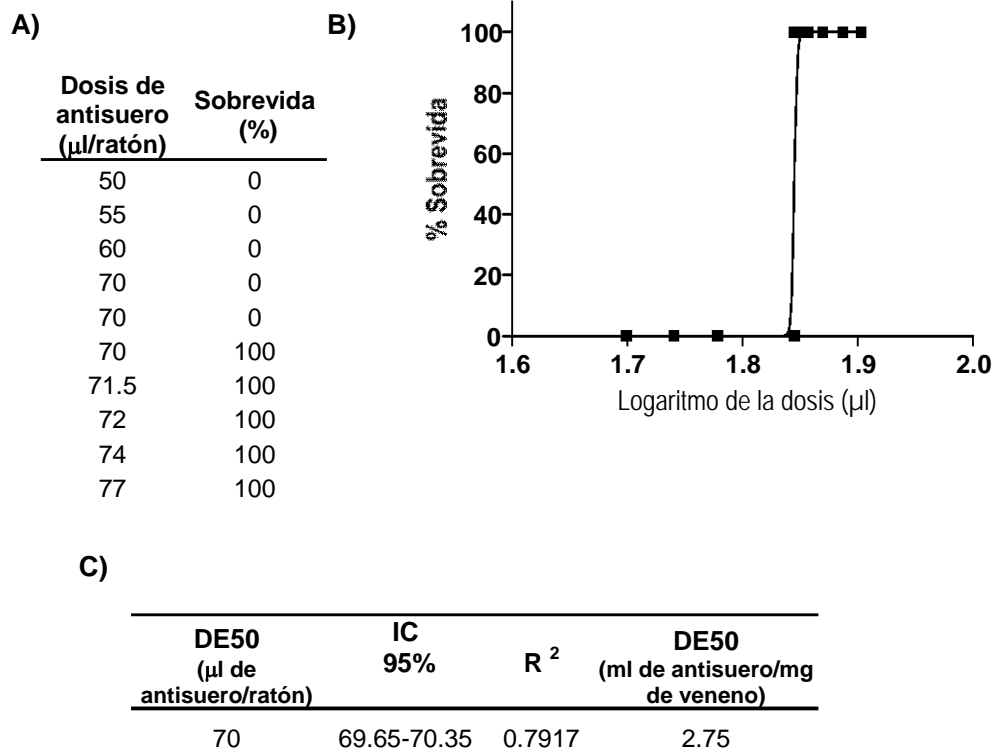


Figura 7. Determinación de DE50 específica del antisuero anti-*N. melanoleuca* (4ª sangría). A) Tabla que indica las distintas dosis de antisuero ($\mu\text{l}/\text{ratón}$) retado contra 3DL50 y el porcentaje de supervivencia registrado en cada grupo de ratones, después de 48 horas de la inoculación. B) Ajuste sigmoideo dosis-respuesta de las dosis de antisuero ($\log \mu\text{l}/\text{ratón}$) contra el porcentaje de supervivencia. C) DE50 (μl de antisuero/ratón) que protege contra 3DL50, con su respectivo intervalo de confianza y R^2 ; DE50 representada en mililitros de antisuero necesarios para neutralizar un miligramo de veneno cuantificado por peso.

Como se puede observar en la Figura 7, la DE50 específica del antisuero anti-*N. melanoleuca* resultó en una dosis de 70 $\mu\text{l}/\text{ratón}$, o bien de 2.75 ml/mg de veneno. Debido a que el intervalo entre la dosis de suero que neutraliza totalmente los efectos del veneno y la dosis no neutralizante es muy estrecho resultó imposible, por las limitaciones experimentales, encontrar puntos intermedios (es decir, entre 0 y 100 % de supervivencia) que permitieran mejorar la determinación.

VIII.2 Reactividad cruzada con venenos de otras especies de cobra.

La medición de la reactividad cruzada del antisuero anti-*Naja melanoleuca* (4ª sangría) se realizó mediante la determinación del reconocimiento paraespecífico por los venenos de las diferentes serpientes africanas y asiáticas del género *Naja*,

así como de algunos venenos de serpientes de otros géneros con fines comparativos, como es el caso del veneno de la cobra africana *H. haemachatus*.

VIII.2.1 Reconocimiento paraespecífico *in vitro* de los venenos de cobras africanas por el antisuero anti-*Naja melanoleuca*.

Se midió el reconocimiento paraespecífico del antisuero anti-*N. melanoleuca* por los venenos de las cobras africanas y escupidoras *N. katiensis*, *N. nigricollis*, *N. nubiae*, *N. pallida*, *N. mossambica* y *H. haemachatus*; y los de las no escupidoras *N. haje haje*, *N. annulifera* y *N. nivea*.

El antisuero presentó una reactividad cruzada media contra los venenos de las cobras africanas, dado que el reconocimiento de éstos no excedió el 40 %. Como se puede observar en la Figura 8, el suero reconoció a los venenos de las escupidoras *N. katiensis* y *N. nigricollis* en un 36-37% con respecto al específico, mientras que la reactividad cruzada por los venenos del resto de las escupidoras, *N. pallida*, *N. nubiae* y *N. mossambica*, fue del 10-15%. En el caso de los venenos de las cobras no escupidoras, *N. haje haje*, *N. annulifera* y *N. nivea*, éstos fueron reconocidos en un 27, 15 y 40 % respectivamente (Figura 8).

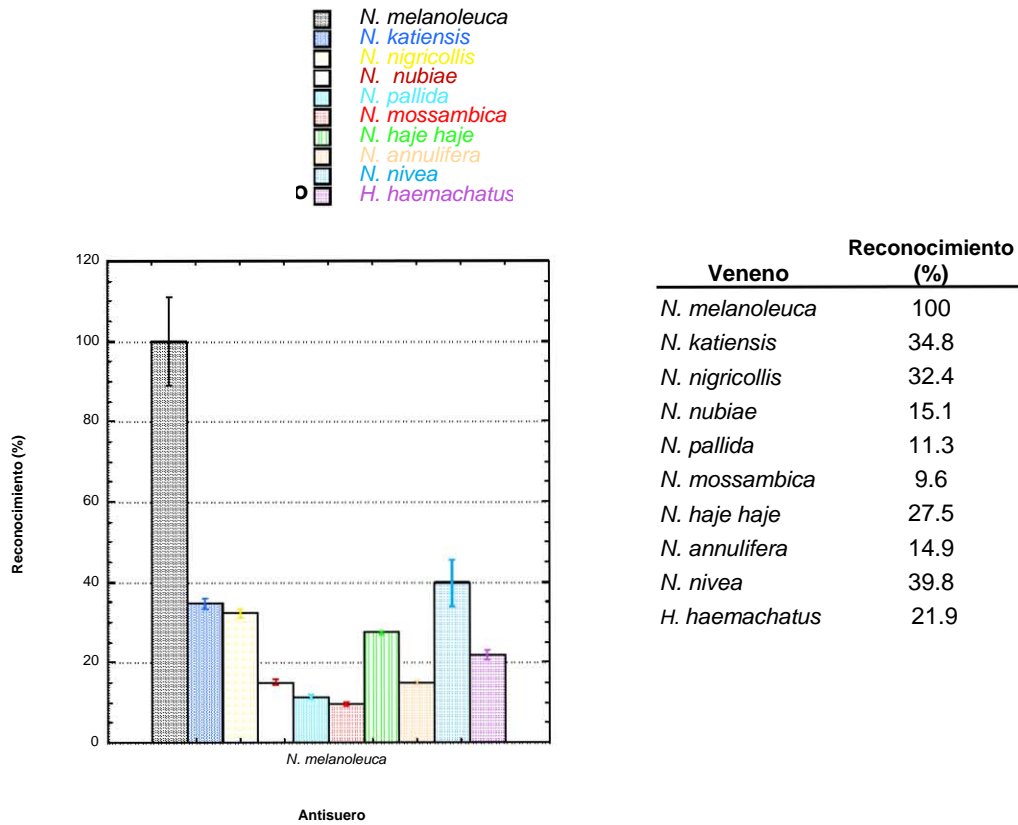


Figura 8. Reconocimiento por el antisuero anti-*N. melanoleuca* (4^a sangría) de los venenos de las cobras africanas con respecto al reconocimiento específico del veneno *N. melanoleuca*, utilizado en la inmunización.

VIII.2.2 Reconocimiento paraespecífico *in vitro* de los venenos de cobras asiáticas por el antisuero anti-*Naja melanoleuca*.

El reconocimiento paraespecífico por el antisuero anti-*N. melanoleuca* de los venenos de las cobras asiáticas se midió por los ensayos *in vitro* (ELISA) analizando la reactividad cruzada frente a los venenos de las cobras no escupidoras *N. atra*, *N. kaouthia*, *N. oxiana* y *N. naja*, y al de la escupidora *N. siamensis* (Figura 9).

Como se presenta en la Figura 9, el antisuero presentó una reactividad cruzada baja contra todos los venenos de las cobras asiáticas, reconociéndolos por debajo de un 20 %.

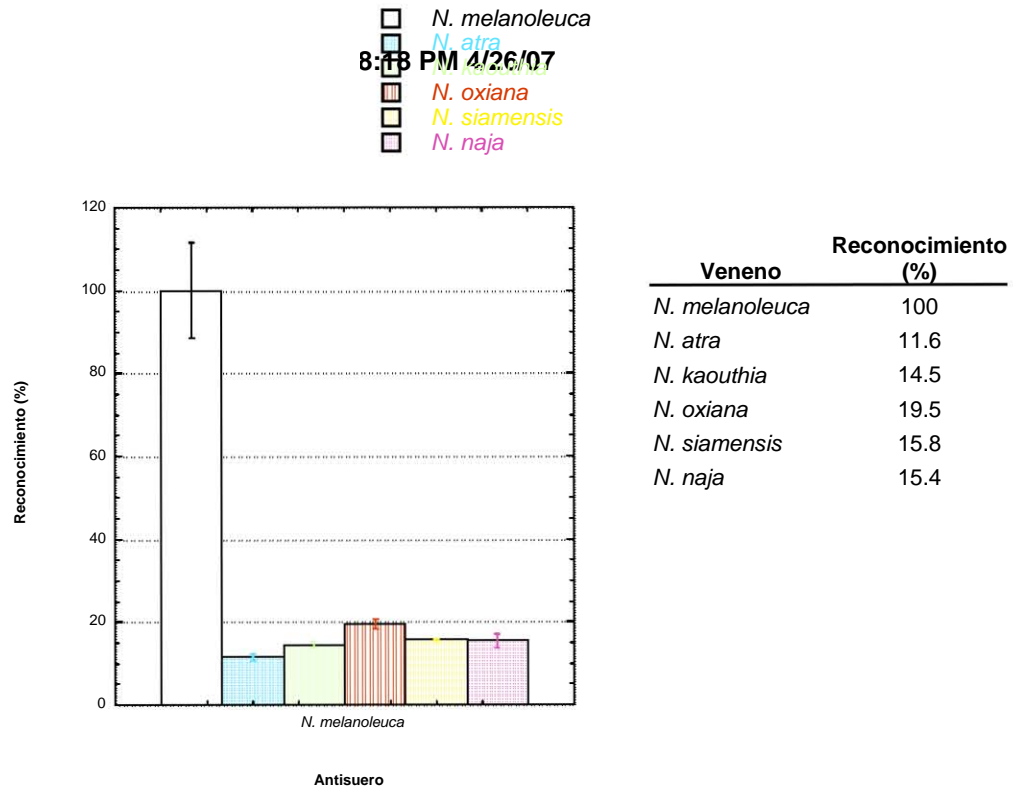


Figura 9. Reconocimiento por el antisuero anti-*N. melanoleuca* (4ª sangría) de los venenos de las cobras asiáticas con respecto al reconocimiento específico del veneno *N. melanoleuca*, utilizado en la inmunización.

VIII.3 Protección paraespecífica del antisuero anti-*N. melanoleuca*.

Para evaluar la potencia neutralizante paraespecífica del antisuero experimental anti-*N. melanoleuca* fue necesario determinar las DL50 de los venenos *N. pallida*, *N. nivea*, *N. annulifera*, *N. nubiae* y *N. naja*. Esta determinación se llevó a cabo mediante la administración de diferentes dosis de veneno a grupos de cinco ratones y midiendo la mortalidad de los mismos (Figura 10). Los datos experimentales se sometieron a un ajuste sigmoide dosis-respuesta por regresión no lineal mediante el programa Prism.

| Veneno <i>N. pallida</i> | |
|---|-----------------------|
| Dosis de veneno (μg) | Mortalidad (%) |
| 7.7 | 0 |
| 8.4 | 0 |
| 12 | 0 |
| 15 | 20 |
| 15.6 | 60 |
| 16.3 | 100 |
| 17.5 | 100 |
| 20 | 100 |
| 25 | 100 |

| Veneno <i>N. annulifera</i> | |
|---|-----------------------|
| Dosis de veneno (μg) | Mortalidad (%) |
| 32 | 0 |
| 37.9 | 20 |
| 48 | 0 |
| 50.4 | 20 |
| 55 | 40 |
| 57 | 20 |
| 65 | 80 |
| 70 | 100 |

| Veneno <i>N. nubiae</i> | |
|---|-----------------------|
| Dosis de veneno (μg) | Mortalidad (%) |
| 5 | 0 |
| 6.5 | 0 |
| 7.5 | 20 |
| 8.5 | 60 |
| 10 | 100 |
| 15 | 100 |
| 20 | 100 |

| Veneno <i>N. naja</i> | |
|---|-----------------------|
| Dosis de veneno (μg) | Mortalidad (%) |
| 5 | 0 |
| 6.5 | 80 |
| 7.5 | 80 |
| 8.5 | 100 |
| 10 | 100 |
| 15 | 100 |
| 20 | 100 |

| Veneno <i>N. nivea</i> | |
|---|-----------------------|
| Dosis de veneno (μg) | Mortalidad (%) |
| 5 | 0 |
| 6.2 | 0 |
| 7.5 | 40 |
| 8.3 | 40 |
| 9 | 80 |
| 10 | 100 |
| 12.5 | 100 |
| 15 | 100 |
| 20 | 100 |

Figura 10. Determinación de las DL50 de los venenos a utilizar. Tablas que indican las distintas dosis de veneno ($\mu\text{g}/\text{ratón}$) de los venenos señalados y el porcentaje de mortalidad registrado en cada grupo de 5 ratones, 48 horas post-inoculación.

Los resultados de la medición de la potencia letal de los venenos analizados en este estudio fueron satisfactorios, ya que no hubo inconsistencias en los valores de relación dosis-mortalidad para ningún caso (Tabla 9).

En la tabla que a continuación se muestra, se presentan los venenos analizados con su respectiva DL50 utilizada en este estudio, determinada en este trabajo o en el Instituto Bioclon.

Tabla 9. DL50 de los venenos utilizados en este estudio.

| Veneno | DL50 (µg/ratón) BIOCLON | DL50 (µg/ratón) Este estudio | R ² DL50 este estudio. | IC 95% DL50 este estudio. | |
|-------------------------|--|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------|
| Cobras africanas | | | | | |
| Escupidoras | <i>N. katiensis</i> (LTXN) | 21.0 | | | |
| | <i>N. pallida</i> (LTXN) | | 15.4 | 0.9970 | 15.38 – 15.51 |
| | <i>N. nubiae</i> (LTXN) | | 8.3 | 0.9976 | 8.13 – 8.36 |
| | <i>N. nigricollis</i> (LTXN) | 16.2 | | | |
| | <i>N. mossambica</i> (LTXN) | 21.0 | | | |
| | <i>H. haemachatus</i> (LTXN) | 30.9 | | | |
| No escupidoras | <i>N. melanoleuca</i> (LTXN, Norte de Camerún) | 8.5 | | | |
| | <i>N. annulifera</i> (Kzoo) | | 59.1 | 0.8848 | 55.35 – 63.13 |
| | <i>N. haje haje</i> (LTXN) | 9.0 | | | |
| | <i>N. nivea</i> (MED) | | 8.1 | 0.9701 | 7.78 – 8.49 |
| Cobras asiáticas | | | | | |
| <i>N. naja</i> (LTXN) | | 6.0 | 0.9600 | 5.52 – 6.59 | |

Los venenos de las cobras escupidoras *N. pallida* y *N. nubiae* resultaron tener una toxicidad elevada, de manera que sus DL50 fluctúan entre 15.0 y 8.0 µg/ratón, respectivamente. Asimismo, se encontró que la DL50 de los venenos de las especies no escupidoras *N. naja* y *N. nivea* fue baja (6.0 y 8.1 µg/ratón, respectivamente), lo cual resulta consistente con la alta potencia letal conocida de estos venenos. Por otro lado, el veneno de la cobra africana *N. annulifera* presentó una DL50 elevada, lo cual refleja la reducida toxicidad del mismo.

Las DL50 del resto de los venenos, proporcionadas por el instituto Bioclon, se consideraron fidedignas ya que éstas son coherentes con la toxicidad de los venenos reportada en diversas fuentes.

VIII.3.1 Determinación de las DE50 paraespecíficas.

La cuantificación de la DE50 paraespecífica del antisuero anti-*N. melanoleuca* se realizó evaluando la protección de los efectos de todos los venenos de las

cobras africanas y del veneno de una cobra asiática. Únicamente se analizó el veneno de la cobra asiática *N. naja* por limitaciones en la disponibilidad del antisuero.

En la Figura 11 se presentan las tablas de las dosis de antisuero que se administró a los distintos grupos de ratones para evaluar la potencia de protección paraespecífica y la sobrevida registrada en los animales experimentales, datos que posteriormente se sometieron a un ajuste por regresión no lineal de una sigmoide dosis-respuesta por el programa Prism, para titular la dosis efectiva media.

| Veneno de <i>N. pallida</i> | |
|------------------------------------|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 225 | 0 |
| 250 | 20 |
| 275 | 20 |
| 285 | 60 |
| 290 | 100 |
| 290 | \emptyset |
| 300 | 60 |
| 305 | 100 |
| 310 | 20 |
| 312 | \emptyset |
| 315 | 100 |
| 317 | 100 |
| 325 | 100 |
| 350 | 100 |

| | |
|----------------|---------------|
| 100 | 20 |
| 120 | 40 |
| 160 | 100 |
| 180 | 100 |
| 200 | 40 |
| 225 | 100 |
| 250 | 100 |
| 350 | 100 |

| Veneno de <i>N. katiensis</i> | |
|--------------------------------------|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 200 | 0 |
| 215 | 40 |
| 235 | 60 |
| 250 | 100 |
| 350 | 100 |

| Veneno de <i>N. nivea</i> | |
|----------------------------------|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 175 | 0 |
| 180 | 0 |
| 185 | 60 |
| 190 | 80 |
| 195 | 80 |
| 200 | 80 |
| 215 | 100 |
| 200 | \emptyset |
| 225 | 80 |
| 230 | 100 |
| 240 | 100 |

| Veneno de <i>N. nigricollis</i> | |
|--|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 200 | 0 |
| 235 | 20 |
| 242 | 20 |
| 250 | 80 |
| 350 | 100 |

| Veneno de <i>N. naja</i> | |
|---------------------------------|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 150 | 0 |
| 165 | 100 |
| 190 | 100 |
| 250 | 100 |

| Veneno <i>N. nubiae</i> | |
|--------------------------------|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 100 | 0 |
| 125 | 0 |
| 137 | 0 |
| 150 | 20 |
| 160 | 40 |
| 175 | 100 |
| 200 | 100 |
| 300 | 100 |

| Veneno de <i>N. mossambica</i>, <i>N. annulifera</i> y <i>H. haemachatus</i>* | |
|--|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 350 | 0 |

* La dosis de antisuero indicada fue retada con cada uno de los venenos y las preparaciones se administraron en tres diferentes grupos de ratones.

| Veneno <i>N. haje haje</i> | |
|-----------------------------------|---------------|
| Dosis de antisuero (μ l) | Sobrevida (%) |
| 80 | 0 |

Figura 11. Determinación de DE50 paraespecíficas del antisuero anti-*N. melanoleuca* (4ª sangría). Tablas que indican las distintas dosis de antisuero ($\mu\text{l}/\text{ratón}$) retado contra 3LD50 de los venenos señalados y el porcentaje de sobrevida registrado en cada grupo de ratones, 48 horas post-inoculación.

En esta fase del estudio se decidió no cuantificar DE50 paraespecíficas contra cualquiera de los venenos analizados mayores a cinco veces la DE50 específica ($70 \mu\text{l}/\text{ratón}$) por las limitaciones en la disponibilidad del suero y con el fin de encontrar la potencia neutralizante por el antisuero anti-*N. melanoleuca* a dosis que resultaran informativas sobre el potencial de protección paraespecífico en situaciones realistas de envenenamientos humanos.

En las determinaciones de la DE50 del antisuero contra algunos venenos, como es el caso del de *N. pallida* y *N. haje haje*, se presentaron resultados inconsistentes en la relación dosis-sobrevida, por lo que éstos fueron excluidos del análisis al ser resueltos por los datos experimentales de dosis contiguas (Figura 11). Las inconsistencias pueden explicarse por errores experimentales que pudieron suscitarse en la determinación, sin embargo es probable que se deba a la variabilidad inherente a la experimentación con animales vivos, donde existen variables difíciles de controlar.

La potencia neutralizante paraespecífica del antisuero anti-*N. melanoleuca* resultó ser alta, ya que el antisuero presentó un amplio espectro de protección que incluye a la mayoría de los venenos de las serpientes africanas del género *Naja*. Sin embargo, es evidente que la protección contra los efectos del veneno *N. melanoleuca* por el antisuero fue la más efectiva (Tabla 11). Por otro lado, los venenos heterólogos mejor neutralizados por el antisuero anti-*N. melanoleuca* fueron los de las cobras africanas no escupidoras *N. nivea* y *N. haje haje* y los de las escupidoras *N. nubiae* y *N. katiensis*, tanto en términos de μl por ratón como en μl de antisuero por mg de veneno. En contraste, no existió neutralización de los efectos tóxicos de los venenos de *N. mossambica*, *N. annulifera* y *H. haemachatus* por el antisuero, al menos con la dosis máxima de antisuero utilizada en este estudio ($350 \mu\text{l}$).

Por otra parte, se estableció que el antisuero anti-*N. melanoleuca* fue capaz de neutralizar la toxicidad del veneno de la cobra asiática *N. naja*, sin embargo, las limitaciones en el rendimiento del antisuero imposibilitaron la determinación exacta de la DE50

paraespecífica contra este veneno. A pesar de lo anterior, fue posible encontrar el intervalo dentro del cual se podría encontrar la DE50 (150 -165 µl de antisuero/ratón) (Tabla 11).

A continuación se presenta la tabla que resume los resultados del análisis no paramétrico de los datos experimentales obtenidos en la determinación de la DE50 paraespecífica del antisuero anti-*N. melanoleuca* contra los venenos analizados.

Tabla 10. DE50 del antisuero anti-*N. melanoleuca* contra los venenos de cobra analizados.

| | Veneno | DE50 (µl/ratón) | IC 95% | R ² | DE50 (ml de antisuero/mg de veneno) | DE50 (%)* |
|-------------------------|--|--------------------|---------------|----------------|--|--------------|
| Cobras africanas | | | | | | |
| Escupidoras | <i>N. pallida</i> (LTXN) | 281.6 | 275.2 - 288.1 | 0.8667 | 6.079 | 24.85 |
| | <i>N. mossambica</i> (LTXN) | | >350 | | | |
| | <i>N. katiensis</i> (LTXN) | 224.4 | 211.3 - 238.3 | 0.9407 | 3.561 | 31.2 |
| | <i>N. nigricollis</i> (LTXN) | 245.6 | 241.4 - 249.9 | 0.9617 | 5.037 | 28.5 |
| | <i>N. nubiae</i> (LTXN) | 160.9 | 158.3 - 163.6 | 0.9891 | 6.501 | 43.5 |
| | <i>H. haemachatus</i> (LTXN) | | >350 | | | |
| No escupidoras | <i>N. melanoleuca</i> (LTXN, Norte de Camerún) | 70 | 69.65 – 70.35 | 0.7917 | 2.751 | 100 |
| | <i>N. annulifera</i> (Kzoo) | | >350 | | | |
| | <i>N. haje haje</i> (LTXN) | 122.4 | 116.9 - 128.1 | 0.9889 | 4.548 | 57.1 |
| | <i>N. nivea</i> (MED) | 185.3 | 182.4 - 188.3 | 0.8926 | 7.595 | 37.8 |
| Cobras asiáticas | | | | | | |
| | <i>N. naja</i> (LTXN) | | 150< DE50>165 | | | |

* DE50 porcentual respecto a la específica. (ED50 específica/ED50 paraespecífica x 100%).
 DE50 específica.

IX. DISCUSIÓN.

IX.1. Evolución de títulos del antisuero anti-*N. melanoleuca* contra el veneno de *N. melanoleuca* y evolución del potencial neutralizante específico.

El veneno de *N. melanoleuca* fue inmunogénico en el animal productor del antisuero. Mediante la medición de títulos por ELISA se pudo demostrar la presencia de anticuerpos contra el veneno de *N. melanoleuca*. La determinación de los títulos de las diferentes sangrías del antisuero permitió analizar la evolución de los mismos a lo largo del esquema de inmunización del animal productor. Los ensayos *in vitro* demostraron que la producción de anticuerpos anti-*N. melanoleuca* se mantuvo elevada desde la primera hasta la cuarta sangría, ya que para la quinta y sexta se presentó un decaimiento sustancial en los títulos, coincidente con una interrupción en la regularidad de las inmunizaciones y las sangrías respectivas.

Los ensayos de neutralización en ratones permitieron evaluar el potencial neutralizante contra el veneno *N. melanoleuca* del suero de la primera, cuarta y sexta sangría, cuyos títulos fueron altos (29061, 25683 y 14119, respectivamente). Lo anterior se realizó con el objetivo de seleccionar la sangría con mayor potencia neutralizante que sería usada en los experimentos subsecuentes. La primera sangría fue incapaz de neutralizar en ratones los efectos del veneno de *N. melanoleuca* a pesar de que presentó el título más alto. En contraste, la cuarta y sexta sangría protegieron contra los efectos del mismo veneno, sin embargo, se demostró que la cuarta sangría tenía la mayor potencia neutralizante específica. Estos resultados sugieren que no existe una relación directa entre los títulos del antisuero medidos *in vitro* y su potencial neutralizante.

El comportamiento del potencial neutralizante del antisuero probablemente se deba al estado de los anticuerpos en las diferentes etapas del desarrollo de la respuesta inmune contra el veneno *N. melanoleuca* a lo largo del esquema de inmunización en el caballo. La elevada inmunogenicidad del veneno indujo la producción de anticuerpos desde las primeras inmunizaciones, resultado medido en la primera sangría. Sin embargo, es probable que en

esta sangría existan una baja proporción de anticuerpos capaces de reconocer a los componentes relevantes para la toxicidad del veneno, por lo que no existe neutralización. Por otro lado, los anticuerpos de la cuarta sangría detectados en los experimentos *in vitro*, probablemente fueron producto de un proceso selectivo en la respuesta inmune adquirida presentando la mayor afinidad por los componentes tóxicos del veneno, ya que para entonces habían pasado doce inmunizaciones. Posiblemente esta característica le confirió al antisuero anti-*N. melanoleuca* de la cuarta sangría la potencia neutralizante más alta. Finalmente, una posible explicación del bajo potencial de protección de la sexta sangría, es que después de las trece inmunizaciones se presentó un decaimiento de los anticuerpos neutralizantes debido a que la producción de estas proteínas por la respuesta inmune llegó a su límite, fenómeno donde podría estar implicada la vida media de los anticuerpos en la sangre circulante del caballo y, quizás, la irregularidad de las últimas inoculaciones.

En la determinación de la potencia neutralizante del antisuero anti-*N. melanoleuca* (cuarta sangría) con el veneno homólogo se encontró que la DE50 fue de 70 μ l/ratón, o bien de 2.75 ml/mg de veneno. A pesar de que los resultados de la R^2 y del IC (95%) fueron aceptables en el ajuste de los datos experimentales de la determinación de la DE50 específica, resultó imposible encontrar datos de dosis-sobrevida en la fase logarítmica de la sigmoide dosis-respuesta debido a que el intervalo de dosis de antisuero entre el que se encontró la DE50 fue muy estrecho. Lo anterior se puede explicar por el comportamiento en la neutralización de los venenos de elápidos, en donde, los anticuerpos neutralizantes bloquean la actividad de las toxinas responsables de la letalidad, las cuales actúan sobre un blanco específico. Es posible que este modo de acción de las toxinas dificulta la detección de resultados (dosis-sobrevida) en la fase logarítmica de la sigmoide en este tipo de experimentos.

IX.2 Reconocimiento paraespecífico de otros venenos de cobra.

En el inicio de este trabajo se evaluó la reactividad cruzada mediante ELISA directo entre el antisuero monovalente experimental de origen equino anti-*N. mossambica* y los venenos de diferentes serpientes del género *Naja*. En estos estudios se demostró que el antisuero anti-*N. mossambica* reconoció significativamente a los venenos de las serpientes africanas del género *Naja*, particularmente a los de las cobras escupidoras. Además, el antisuero presentó una reactividad cruzada media frente a los venenos de las cobras no

escupidoras. Estos resultados son consistentes con el análisis de la reactividad cruzada de antisueros de conejo frente a diferentes venenos de cobras que se realizó en el mismo laboratorio, en donde el antisuero anti-*N. mossambica* presentó un reconocimiento paraespecífico elevado por los venenos de las cobras africanas escupidoras.

Posteriormente, mediante ensayos *in vivo* se demostró que la potencia neutralizante del antisuero de caballo anti-*N. mossambica* tanto específica como paraespecífica fue nula. Lo anterior puede explicarse por la presencia de anticuerpos en el antisuero que reconocen molécula(s) o epítotope(s) irrelevantes para la actividad tóxica de los venenos, y que, probablemente, sean los más inmunogénicos o se encuentren mayormente representados en el veneno de las cobras escupidoras.

Para elucidar las relaciones antigénicas entre los venenos de las serpientes africanas y asiáticas del género *Naja* se continuó con el análisis de la reactividad cruzada entre un antisuero de caballo producido a partir de la inmunización con el veneno de la cobra africana *N. melanoleuca* y los venenos de las cobras tanto africanas como asiáticas. La reactividad cruzada entre el antisuero anti-*N. melanoleuca* con los venenos resultó significativa, lo que se vió respaldado por el bajo reconocimiento de este antisuero hacia el veneno de *D. viridis*, utilizado como control negativo, dado que su composición es muy diferente a la del veneno de las cobras.

Estos resultados sugieren una relación estrecha en la composición y antigenicidad entre los venenos de las cobras.

IX.2.1 Reactividad cruzada entre el antisuero anti-*N. melanoleuca* con los venenos de cobras africanas.

La reactividad cruzada entre el antisuero anti-*N. melanoleuca* con los venenos de las cobras africanas se reflejó en un porcentaje de reconocimiento paraespecífico del 10 al 40% medido *in vitro*. Este antisuero presentó una reactividad cruzada más elevada (30 a 40%) frente a los venenos de las cobras escupidoras *N. katiensis* y *N. nigricollis*, y al de la cobra no escupidora *N. nivea*. Por otro lado, la reactividad cruzada del antisuero hacia el veneno de las especies escupidoras *N. nubiae*, *N. mossambica* y *N. pallida*, de las no escupidoras *N. annulifera*, *N. haje* y *N. nubiae* y de la cobra *H. haemachatus* fue de un 10 a 30%. Estos

resultados apoyan los reportes anteriores de las relaciones antigénicas entre el veneno de *H. haemachatus* y los venenos de las serpientes del género *Naja* (Christensen, 1955).

En contraste con los resultados de la reactividad cruzada medida por ELISA de los antisueros tanto de caballo como de conejo anti-*N. mossambica*, se demostró que el antisuero anti-*N. melanoleuca* no parece discriminar entre los venenos de las cobras escupidoras y no escupidoras. Una posible explicación, es que los anticuerpos del antisuero anti-*N. melanoleuca*, reconocen mayoritariamente a uno o varios antígenos comunes en la mayoría de los venenos analizados, independientemente de que las especies sean escupidoras o no. Un ejemplo de ello son los venenos de la serpiente escupidora *N. katiensis* y el de la cobra no escupidora *N. nivea*, cuya reactividad cruzada con el antisuero fue de alrededor del 40% en ambos casos.

IX.2.2 Reactividad cruzada entre el antisuero anti-*N. melanoleuca* con los venenos de cobras asiáticas.

El reconocimiento paraespecífico por el antisuero anti-*N. melanoleuca* de los venenos de las cobras asiáticas fue menor a un 20 %, resultados que probablemente reflejan tanto una composición como una inmunogenicidad diferencial entre los venenos de las cobras asiáticas y africanas que puede estar relacionada tanto con diferencias en los componentes como en sus cantidades relativas en los venenos.

IX.3 Neutralización paraespecífica de los venenos de serpientes del género *Naja* por el antisuero anti-*N. melanoleuca*.

En este estudio se demostró, a través de los experimentos *in vivo*, que el antisuero anti-*N. melanoleuca* presentó un amplio espectro de protección contra los efectos tóxicos de la mayoría de los venenos de las serpientes del género *Naja*. El antisuero neutralizó paraespecíficamente a los venenos de las cobras escupidoras: *N. nubiae*, *N. pallida*, *N. kaiensis* y *N. nigricollis* y a los venenos de las cobras no escupidoras *N. naja*, *N. nivea* y *N. haje haje*, sugiriendo una evidente similitud en la inmunogenicidad, composición, y toxicidad entre éstos. Los venenos mejor neutralizados en términos de la DE50 fueron los de *N. nivea*, *N. nubiae*, *N. katiensis*, *N. nigricollis* y *N. haje*.

Para clarificar la relación entre la reactividad cruzada medida *in vitro* y los resultados de la potencia neutralizante del antisuero anti-*N. melanoleuca* se realizó un análisis de correlación. Para este estudio se obtuvo la potencia neutralizante relativa del antisuero (DE50 porcentual) contra los venenos neutralizados con respecto a la DE50 específica. La DE50 porcentual (%DE50) es el resultado de la división de la DE50 específica (DE50s) entre la DE50 paraespecífica (DE50p), multiplicado por el 100% de neutralización (DE50s/DE50p*100%). A modo de ejemplo, la DE50 del antisuero anti-*N. melanoleuca* contra el veneno de *N. pallida* fue de 6.08 ml/mg de veneno y la DE50 específica fue de 2.75 ml/mg de veneno, de manera que la DE50 porcentual es de alrededor del 45% (2.75 ml/mg /6.08 ml/mg *100%=45%).

Existe una relación laxa entre la potencia neutralizante relativa y la reactividad cruzada del antisuero anti-*N. melanoleuca* con los venenos neutralizados como se muestra en la Figura 12. Una posible explicación es que dentro de los anticuerpos del antisuero anti-*N. melanoleuca* exista una proporción que reconoce y neutraliza eficazmente a los antígenos responsables de la toxicidad que son comunes en los venenos de *N. pallida*, *N. katiensis*, *N. nigricollis*, *N. nubiae*, *N. melanoleuca*, *N. haje haje* y *N. naja*, mientras que el resto de los anticuerpos presentes en el antisuero reconoce a antígenos irrelevantes para la toxicidad en los venenos neutralizados. Debido a que todos los venenos neutralizados fueron reconocidos por el antisuero anti-*N. melanoleuca* en un porcentaje menor al 40%, se puede decir que la existencia de una reactividad cruzada elevada entre el antisuero y dichos venenos resultó innecesaria para la capacidad de protección del antisuero contra los efectos tóxicos de los mismos.

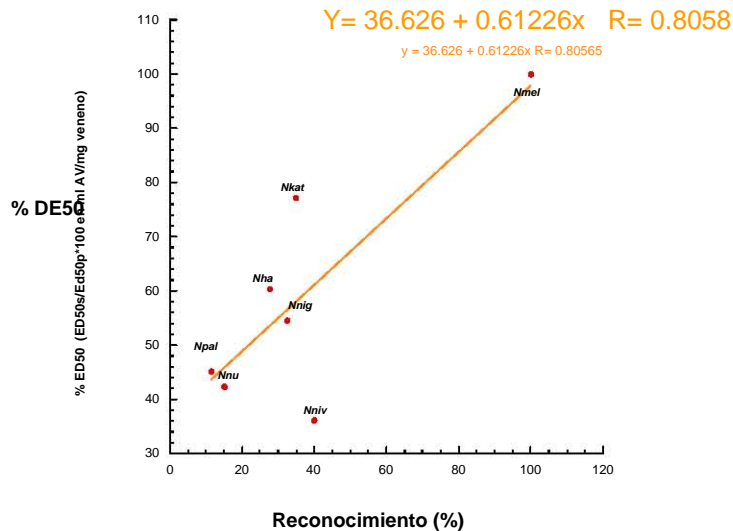


Figura 12. Reconocimiento medido *in vitro* por el antisuero anti-*N. melanoleuca* de los venenos de las cobras escupidoras *N. katiensis* (*Nka*), *N. nigricollis* (*Nni*), *N. pallida* (*Npa*) y *N. nubiae* (*Nnu*) y de las no escupidoras *N. haje haje* (*Nha*) y *N. nivea* (*Nniv*) en donde el 100% corresponde al reconocimiento específico (abscisa) contra la potencia neutralizante relativa paraespecífica en DE50 porcentual (ordenada).

Por otro lado, se realizó el estudio de correlación entre la reactividad cruzada con la DE50 porcentual del antisuero anti-*N. melanoleuca* frente a los venenos neutralizados de las cobras escupidoras y de las no escupidoras, por separado.

Como se ilustra en la Figura 13a, al parecer existe una correlación entre el reconocimiento del antisuero anti-*N. melanoleuca* hacia los venenos de las cobras escupidoras y la potencia neutralizante relativa del antisuero (DE50 porcentual). Esta relación sugiere un parentesco antigénico entre los venenos de las especies escupidoras. En contraste, no se presentó una correlación tan clara entre la potencia neutralizante relativa (DE50 porcentual) y el reconocimiento del antisuero anti-*N. melanoleuca* frente a los venenos de las cobras no escupidoras (Figura 13b). Esto sugiere que los grupos de cobras escupidoras y no escupidoras que han sido definidos por algunos autores (Warrell, 1995), de acuerdo a los efectos de su envenenamiento (cobras citotóxicas y neuróticas, respectivamente), en realidad no son tan claros.

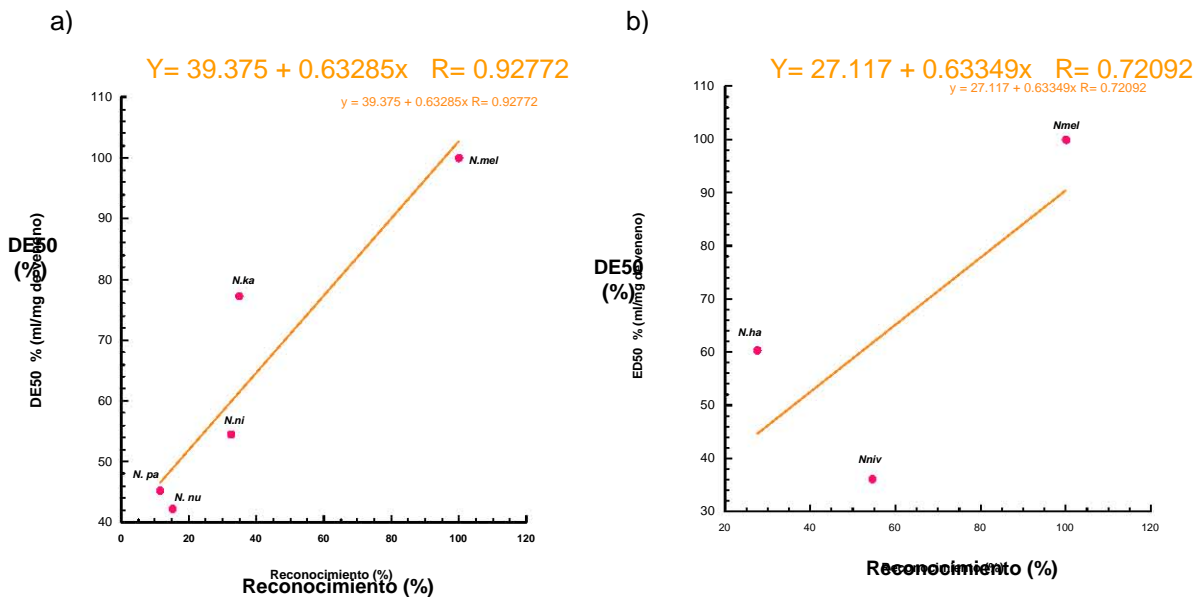


Figura 13. Reconocimiento medido *in vitro* por el antisuero anti-*N. melanoleuca* de los venenos de: a) las cobras escupidoras *N. katiensis* (Nka), *N. nigricollis* (Nni), *N. pallida* (Npa) y *N. nubiae* (Nnu); b) y no escupidoras *N. haje haje* (Nha) y *N. nivea* (Nniv), en donde el cien por ciento corresponde al reconocimiento específico (abscisa) contra la potencia neutralizante relativa paraespecífica representada en DE50 porcentual ($DE50\% = DE50s / DE50p * 100$) (ordenada).

Como ya se mencionó, el antisuero contra un veneno de cobra no escupidora (*N. melanoleuca*) neutralizó los efectos de venenos de cobras escupidoras y no escupidoras indistintamente. Además, en el análisis de correlación no se observó una relación clara entre la potencia neutralizante del antisuero y reconocimiento paraespecífico de los venenos. Estos resultados permiten abordar las relaciones entre la composición de los venenos y sus efectos desde otra perspectiva.

Las neurotoxinas son componentes proteicos importantes de los venenos de serpientes del género *Naja*, así como de muchos otros venenos de elápidos (Chippaux, J.P., 2006; Ismail y col., 1996; Chiu, 1995; Hung, 1998), y se presentan tanto en los venenos de cobras escupidoras (*N. mossambica*, *N. nigricollis*) como en los de las cobras no escupidoras (*N. naja*, *N. nivea*, *N. haje haje*) (Warrell, 1995; Hung, 1998).

Las neurotoxinas son responsables del envenenamiento que se caracteriza por síndromes fuertemente neurotóxicos en las víctimas (Warrell, 1995; Ismail 1996) y es causado por las cobras no escupidoras *N. melanoleuca*, *N. haje haje*, *N. nivea* y *N. naja* (serpientes cuyos venenos fueron neutralizados eficazmente por el antisuero anti-*N. melanoleuca*). Sin embargo, los efectos del envenenamiento por la mordedura de estas cobras no están definidos, pues aunque se sabe que causan principalmente síndromes neurotóxicos, se ha reportado que en algunos casos han llegado a desencadenar efectos citotóxicos (Reid, 1976). Asimismo, envenenamientos causados por serpientes de la misma especie pueden desencadenar afecciones sustancialmente diferentes en individuos distintos, fenómeno que se explica por la variabilidad intraespecífica que existe dentro de los venenos (Chippaux, 2006; Shashidharamurthy, 2006).

En cuanto a los venenos de *N. pallida* y *N. nubiae*, neutralizados por el antisuero anti-*N. melanoleuca*, no existen suficientes reportes clínicos, ni mucho menos estudios prospectivos, que permitan elucidar los principales efectos que causa su envenenamiento y se da por hecho que son venenos citotóxicos únicamente por ser cobras escupidoras (Warrell, 1995) y por los escasos reportes que existen.

Por otro lado, dentro de los venenos que no fueron neutralizados por el antisuero, están los de *N. mossambica* y *H. haemachatus* cuyos efectos son, según algunos autores, principalmente citotóxicos (Warrell, 1995; Ismail, 1996; Ismail, 1993; Tilbury; 1982). El veneno de *N. annulifera*, tampoco fue neutralizado. Este veneno se ha estudiado poco pues al parecer hay una baja incidencia de mordeduras por esta serpiente (Warrell, 1995), sin embargo se ha encontrado que existe una similitud con el veneno *N. melanoleuca* aunque los efectos que causa son diferentes (Joubert, 1975).

En base a lo anterior y a lo que se sabe en cuanto a la composición y efectos de estos venenos, planteamos una nueva hipótesis, en la que sugerimos que la medición de letalidad y la neutralización, usando como organismo el modelo de ratón en los experimentos *in vivo*, es principalmente informativa en términos de neurotoxicidad. Asimismo, se presentó una correlación inversa entre la DL50 de los venenos y la DE50 paraespecífica del antisuero anti-*N. melanoleuca*, de forma que los venenos con baja potencia letal, como los de *H. haemachatus* y *N.annulifera*, no fueron neutralizados con el antisuero anti-*N. melanoleuca*. En contraste, los venenos con toxicidad elevada, y probablemente con mayor neurotoxicidad,

fueron los mejor neutralizados por el antisuero como es el caso de los venenos de *N. nubiae*, *N. nivea*, *N. haje haje* y *N. katiensis*.

Estos resultados apoyan la idea de que las neurotoxinas están altamente conservadas en los venenos de serpientes del género *Naja*, como lo han propuesto algunos autores (Hung y col., 1998; Joubert, 1978), y que la reactividad cruzada medida *in vitro* y la neutralización del antisuero anti-*N. melanoleuca* contra los venenos de las cobras africanas y de la cobra *N. naja* se debe al reconocimiento del antisuero por estas toxinas. Es probable que el antisuero neutralizó venenos donde las neurotoxinas juegan un papel primordial en el envenenamiento, como son los venenos de *N. haje haje*, *N. nubiae*, *N. pallida*, *N. katiensis*, *N. nigricollis*, *N. nivea* y *N. naja*. Si lo anterior es cierto, es probable que el envenenamiento por los venenos de las cobras africanas escupidoras *N. nubiae*, *N. pallida*, *N. katiensis* y *N. nigricollis* desarrollen síndromes neurotóxicos responsables de la letalidad de los venenos contrario a lo que se ha reportado anteriormente (Warrell, 1995).

IX.4 Medición del potencial neutralizante en el modelo murino.

El potencial neutralizante específico y paraespecífico de un antisuero depende de la respuesta inmune inducida por los determinantes antigénicos del veneno utilizado en la inmunización del animal productor (Figura 14). Es probable que los antisueros que presentan un alto potencial de protección tanto específico como paraespecífico, como es el caso del anti-*N. melanoleuca*, estén constituídos por anticuerpos que reconocen específicamente a los componentes responsables de la toxicidad comunes en los venenos neutralizados. Asimismo, la eficacia del antisuero se determina, entre otras cosas, por la capacidad neutralizante de los anticuerpos contra los efectos tóxicos de los venenos, tanto en el organismo modelo utilizado en la experimentación en el laboratorio, así como en los humanos víctimas del envenenamiento en pruebas clínicas.

En los ensayos de neutralización realizados en este estudio se utilizó el modelo murino principalmente por las ventajas experimentales que éste presenta. Además, resulta importante mencionar que numerosos estudios, en donde se han llevado a cabo pruebas *in vivo* utilizando ratones, demuestran que es posible extrapolar los resultados con datos de pruebas clínicas en el humano, tomando las consideraciones pertinentes. A pesar de que el humano y el ratón son organismos biológicamente diferentes, es posible evaluar el potencial

neutralizante de antisueros/antivenenos siempre que exista una equivalencia en la medición de la toxicidad y en la neutralización de la misma, en términos de masa de veneno neutralizado por mililitro de antiveneno (mg/ml de antisuero), que permita correlacionar los fenómenos que se observan tanto en el envenenamiento como en la administración de un antisuero/antiveneno en el ratón y en los humanos (Figura 14).

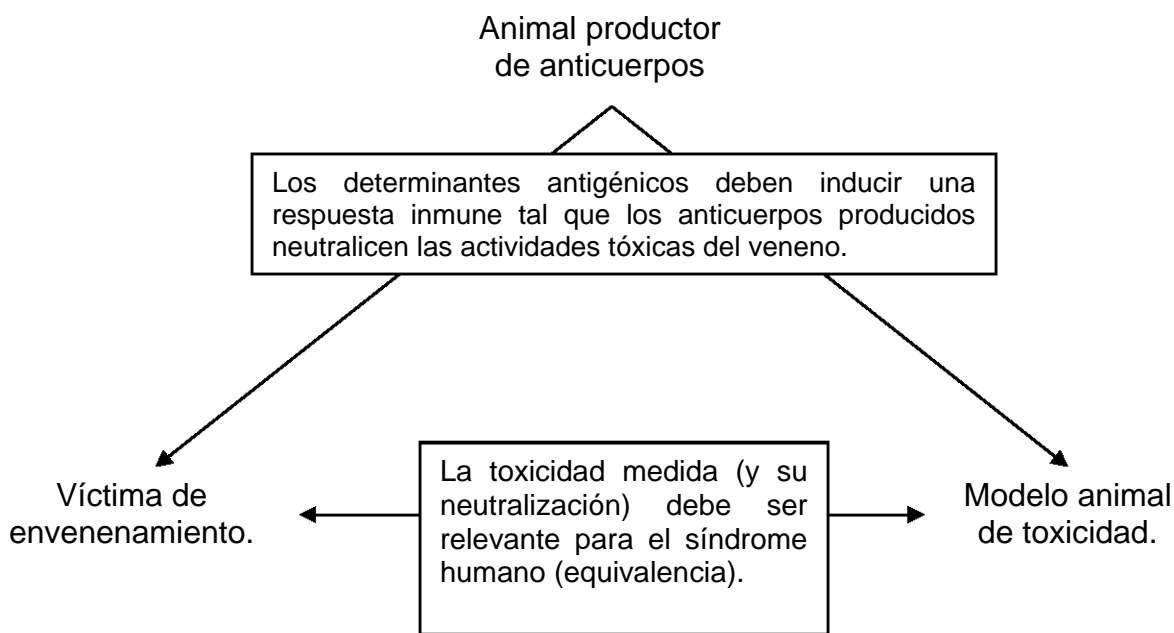


Figura 14. Relación entre la producción de anticuerpos, la evaluación de la potencia neutralizante de un antisuero en el organismo modelo y en la víctima del envenenamiento.

X. CONCLUSIONES.

- Los venenos de las cobras *N. mossambica* y *N. melanoleuca* son altamente inmunogénicos por lo que se pudieron determinar grados de parentesco antigénico entre los venenos de las serpientes del género *Naja*.

- Existió una reactividad cruzada entre los antisueros de caballo tanto anti-*N. mossambica* como anti-*N. melanoleuca* contra los venenos de las serpientes del género *Naja*, ya que éstos reconocen en medida variable pero significativa a todos los venenos de cobras analizados. Sin embargo, esto no asegura que exista una neutralización medible, como es evidente en el caso del antisuero anti-*N. mossambica* y en el de los venenos no neutralizados por el antisuero anti-*N. melanoleuca*.

- El potencial neutralizante específico del antisuero anti-*N. melanoleuca* fue mayor que cualquiera de las neutralizaciones paraespecíficas.

- La mayoría de los venenos de las especies del género *Naja* estudiados son neutralizados por el antisuero anti-*N. melanoleuca* a dosis que van desde 2 a 4 veces la DE50 específica, demostrando un parentesco antigénico entre los componentes responsables de la toxicidad en el modelo murino. La neutralización paraespecífica abarca especies escupidoras y no escupidoras, poniendo de manifiesto la necesidad de realizar más estudios de los grupos de venenos definidos por los efectos que su envenenamiento desencadena (neurotóxicos o citotóxicos).

- Parece existir una correlación entre el reconocimiento medido *in vitro* y la potencia neutralizante relativa (DE50 porcentual) del antisuero anti-*N. melanoleuca* contra los venenos neutralizados, sin embargo, esta relación no es clara. Probablemente, la realización de estudios con el resto de los venenos de serpientes del género *Naja* y de otros antisueros experimentales, permitiría establecer la correlación de forma más satisfactoria.

- La correlación inversa entre las DE50 paraespecíficas del antisuero anti-*N. melanoleuca* con la DL50 de los venenos neutralizados apoya la hipótesis planteada en este trabajo. Ésta sugiere que un antisuero contra un veneno fundamentalmente neurotóxico como lo es *N. melanoleuca*, posee una potencia neutralizante elevada contra venenos que

comparten las propiedades neurotóxicas, de manera que es probable que las proteínas que son relevantes para la toxicidad de los venenos neutralizados sean neurotoxinas, mismas que se encuentran conservadas en los venenos de las serpientes del género *Naja*.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

Alagón, A. (2002) Anticuerpos seguros y eficaces: La revolución de lo nuevos antivenenos. Revista de la Universidad Autónoma de México, No. 17.

Alagón, A. (2006) Conferencia magistral "Anticuerpos terapéuticos: el caso de los antivenenos". XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guanajuato, Gto.

Blaylock, R.S., Lichtman, A.R., Potgieter, P.D. (1985) Clinical manifestations of Cape cobra (*Naja nivea*) bites. A report of 2 cases. S Afr Med J. 68:342-344.

Chippaux J.P. & Goyffon, M. (1998) Venoms, Antivenoms and immunotherapy. Toxicon. 36:823-846.

Chippaux, J.P. (1998) Snake bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health Organ 76:515-524.

Chippaux, J.P. (2006) Snake venoms Envenomations Krieger Publisher company, Malabar Florida. 279 p.

Chippaux, J.P., Lang, J., Amadi-Eddine, S., Fagot, P., Le Mener, V. (1999) Short report: treatment of snake envenomations by a new polyvalent antivenom composed of highly purified F(ab)₂: results of a clinical trial in northern Cameroon. Am J Trop Med Hyg. 61:1017-8.

Chiu, S.H., Hung, C.C., Huang, H.C., Chen, S.T., Wang, K.T., Yang, C.C. (1995) Sequence comparison and computer modelling of cardiotoxin and cobrotoxin isolated from Taiwan cobra. Bioch. And bioph. Research communications. 206:22-32.

Christensen, P.A. (1955) South African Snake Venoms and Antivenoms. S. Afr. Inst. Med. Res., Johannesburg.

de Roodt, A., Dolab, J.A., Fernández, T., Segre, L., Hajos, S.E. (1998) Cross-reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used on Argentina. Toxicon 36:1025-1038.

Funk, R. S. (1996) Snakes. In Reptile Medicine and Surgery. Ed D. R. Mader. Philadelphia, W. B. Saunders. 39-46.

Gold, B.S. (1997) Neostigmine for the treatment of neurotoxicity following envenomation by the Asiatic cobra. Ann Emerg Med. 29:195.

Gutiérrez, J.M., Theakston, R.G.D., Warrell, DA. (2006) Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. PLoS Med. 3: 150.

Hawgood, B.J. (2001) Poul Agerholm Christensen MD (1912-1991): antivenim production at the South African Institute for Medical Research. *Toxicon*. 39: 749-756.

Hung, C.C., Wu S.H., Chiou S.H. (1998) Two Novel α -Neurotoxins Isolated from Taiwan Cobra: Sequence Characterization and Phylogenetic Comparison of Homologous Neurotoxins. *Journal of Protein Chemistry*. 17:107-114.

Ismail, M. (1993) The ocular effects of spitting cobras: The ringhals cobra (*Hemachatus haemachatus*) venom-induced corneal opacification syndrome. *J Toxicol Clin Toxicol*. 31:31-41.

Ismail, M., Aly, M.H., Abd-Elsalam, M.A., Morad, A.M. (1996) A three-compartment open pharmacokinetic model can explain variable toxicities of cobra venoms and their alpha toxins. *Toxicon*. 34:1011-1026.

Joubert, F.J. & Taljaard, N. (1980) Snake venoms. The amino acid sequences of two Melanoleuca-type toxins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 361:425-36

Koh, D.C.I., Armugam, A. & Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci*. 63:3030–3041.

Laing, D.G., Renjifo, J.M., Ruiz, R., Harrison, R.A., Nasidi, A., Gutiérrez, J.M., Rowley, P.D., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A. (2003) A new Pan African polyspecific antivenom developed in response to the antivenom crisis in Africa. *Toxicon* 42: 35–41.

Machiah, D.K. & Gowda, T.V. (2006) Purification of a post-synaptic neurotoxic phospholipase A2 from *Naja naja* venom and its inhibition by a glycoprotein from *Withania somnifera*. *Biochimie* 8:701-710.

Markland, F.S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 36:1749-1800. Review.

Warrell, D.A. (1995) "Clinical toxicology of snakebite in Africa and the middle east/arabian peninsula", en *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC-Press, Boca Raton, 433-491.

Warrell, D.A. (1995) "Clinical toxicology of snakebite in Asia", en *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC-Press, Boca Raton, 493-593.

Meier, J., Stocker, K. F. (1995) "Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms", en *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC-Press, Boca Raton, 367-411.

Porto, N.B., Telli, C.A., Dutra, T.P., Alves, L.S., Bozza, M., Fin, C.A., Thiesen, F.V., Rennerd, F.M. (2007) Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon*.

Ramos, E., Carbajal-Saucedo, A. y Rivas-Garcia, H.A. (2000) Serpientes venenosas, reconocimiento y tratamiento general de su mordedura. *Revista digital UNAM*, vol. 1, Num. 3.

Ramos-Cerrillo, B.M. (2005) Producción, evaluación y caracterización de los inmunógenos recombinantes de las esfingomielinasas de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Reid, H.A. (1976) In: Russell, F.A. & Saunders, P.R. *Animal toxins*, Oxford Pergamon Press.

Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D. (2001) *Immunology*. USA, Editorial Mosby, 6ª edición.

Rudrammaji, S. & Gowda, T.V. (1997) Purification and characterization of tree acid, cytoxic phospholipases A₂ from indian cobra (*Naja naja naja*) venom. *Oxford Pergomon Press* 36: 921-936.

Shashidharamurthy, R., Kemparaju K. (2006) A neurotoxic phospholipase A₂ variant: Isolation and characterization from eastern regional Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Toxicon* 47:727-733

Stock R.P., Massougbojji, A., Alagón, A. & Chippaux, J.P. (2007) Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. *Nature Biotechnology* 25:173 – 177.

Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., Griffiths, E. (2003) A report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41: 541-557.

Tilbury, C.R. (1982) Observations on the bite of the Mozambique spitting cobra (*Naja mossambica mossambica*). *S Afr Med J.* 61:308-13.

Vidal, N. & Hedges, SB. (2005) The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C R Biol.* 328:1000-1008.

Ward, C. M. (1996) Characterization of mocoarhagin, a cobra venom metalloproteinase from *Naja Mocambique Mocambique*. *Elsevier Science Ltd Tmmn.* 34:1203-1206.

Watt, G., Padre, L., Tuazon, L., Theakston, R.D.G. (1988) Bites by the Philippine cobra (*Naja naja philippinensis*): prominent neurotoxicity with minimal local signs. *Am J Trop Med Hyg.* 39:306-311.

Westhoff, G. & Tzscha K. (2005) The spitting behavior of two species of spitting cobras. *J Comp Physiol A.* 191: 873-881.

Wüster, W. (1996) Taxonomic changes and toxinology: systematic revisions of the Asiatic cobras (*Naja naja* species complex). Review. *Toxicon*, 34: 399-406.

Young, B.A. Dunlap, K., Koenig, K., Singer, M. (2004) The buccal buckle: the functional morphology of venom spitting in cobras. *The Journal of Experimental Biology*. 207:3483-3494.

Zug, G.R., Vitt, L.J. & Caldwell, J.P. (2001) *Herpetology*. 2nd ed. Academic Press San Diego, London. 630 p.