



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Evolución de títulos de anticuerpos y potencias neutralizantes de sueros de caballo hiperinmunizados con mezclas complejas de venenos de vipéridos y elápidos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
MVZ Oscar Aguayo Avalos

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Alejandro Alagón Cano  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Gustavo Pedraza Alva  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza  
Instituto Nacional de Salud Pública, SSA

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2023



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.

## **Integrantes del Jurado del examen de grado**

Dra Leonor Pérez Martínez

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr Baltazar Becerril Luján

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra Gloria Saab Rincón

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr Jose Luis Montiel Hernández

Cuerpo académico de Regulación de la Respuesta Inmune en Infección y Autoinmunidad  
Facultad de Farmacia, UAEM

Dr Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Laboratorio de inmunología viral. Facultad de Medicina, UAEM

El presente trabajo de grado (maestría) fue realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, que pertenece al departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México; bajo la tutoría del Dr. Alejandro Alagón Cano y el apoyo técnico de la Dra Hilda Vázquez López.

Oscar Aguayo Avalos recibió una beca de maestría del CONACYT (CVU: 780488). Además, recibió financiamiento mediante el Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP-UNAM) para asistir a un curso nacional.

## Dedicatoria

A mi familia que me apoya en todos y cada uno de los pasos que doy. A los que soy afortunado de tener conmigo y también a los que durante este tiempo he tenido que despedirme de manera temporal.

## Agradecimientos

Al Dr Alejandro Alagón Cano, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, y por las oportunidades de colaboración posteriores al tiempo que estuve en el laboratorio..

A la Dra Hilda Vázquez López, por ser mi maestra para mí durante este proceso. Por una parte en lo profesional al enseñarme cada una de las técnicas y procedimientos llevados a cabo para este trabajo, por su dedicación para la revisión de este trabajo escrito y la asesoría para la preparación de seminarios y tutorales. Y en lo personal por los consejos para superar esta etapa de mi formación profesional. Gracias por tu gran paciencia conmigo.

Al Biólogo Felipe Olvera Rodríguez y al MC Alejandro Olvera Rodríguez por sus observaciones y ayuda con las técnicas de western blot y purificación de anticuerpos.

Al Biólogo Irving Giovanni Archundia Gutierrez por su asesoría y ayuda con los ensayos de dosis letal y dosis efectiva.

Al Dr Edgar Enrique Neri Castro, por su asesoría con los ensayos en ratones y sus observaciones en la presentación de seminarios. Así como la oportunidad de colaboración posterior.

A los miembros de docencia Antonio Guillen y Gloria Villa por su valiosa ayuda y disposición en todos los tramites.

A mis amigas Aranza Xhaly Quintana Armas y Diana Hernández Oaxaca. Por acompañarme en este camino.

## Contenido

<b>Dedicatoria .....</b>	<b>4</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>9</b>
1.1 Epidemiología del ofidismo en el mundo y en el continente africano.....	9
1.2 Clasificación de las serpientes de importancia médica en Medio Oriente y Norte de Africa .....	11
Vipéridos .....	12
Elápidos.....	13
Colúbridos .....	14
1.3 Venenos de serpiente .....	14
Metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMPs).....	16
Serinoproteasas de veneno de serpiente (SVSPs) .....	17
Fosfolipasas A <sub>2</sub> de veneno de serpiente (PLA <sub>2</sub> ).....	17
Toxinas de tres dedos (3FTXs) .....	18
1.4 Antivenenos .....	19
1.4.1 Generación del plasma hiperinmune .....	22
El caballo como productor de plasma hiperinmune .....	27
1.5 Situación de los antivenenos en el continente africano y en el medio oriente.....	29
<b>2 Objetivo general.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivos particulares .....	35
<b>3 Justificación.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>36</b>
<b>5.Materiales .....</b>	<b>36</b>
5.1 Venenos .....	36
5.2 Sueros equinos .....	37
5.3 Sueros de conejo .....	37
5.4 Estándares de las subclases de IgG.....	37
6.Métodos6.1. Determinación de títulos de IgG's en el suero de caballos individuales y en el pool.....	38

6.1.2 Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) .....	38
6.2. Determinación de títulos de las subclases de IgG.....	39
6.2.1. Preparación de las fases estacionarias para cromatografía por afinidad. ....	39
5.2.2.-Purificación por cromatografía por afinidad.....	40
5.2.3. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos purificados. ....	41
5.2.4. ELISA para determinar los títulos de IgG e IgG(T).....	42
5.3 Determinación de títulos de IgM .....	43
5.4 Avance del reconocimiento de las diferentes fracciones de veneno.....	44
5.5 Determinación de la DE <sub>50</sub> .....	45
5.6 Purificación de Inmunoglobulinas del suero.....	46
5.7 Purificación de las subclases de IgG.....	47
5.8 Potencia neutralizante de las subclases de inmunoglobulina G.....	47
<b>6. Resultados .....</b>	<b>48</b>
6.1. Cuantificación de títulos de IgG en el suero de caballos individuales y en el pool..	48
6.1.2 Títulos en los pools de suero .....	48
6.1.3 Títulos de los caballos individuales .....	51
6.2 Cuantificación de las subclases de IgG.....	56
6.2.1 Obtención de inmunoglobulinas anti IgG y anti IgG(T). ....	57
6.2.2 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos purificados .....	58
6.2.3 Subclases de IgG en el grupo AVN .....	59
6.2.2 Subclases de IgG en el grupo AEN.....	61
6.3 Títulos de IgM .....	62
6.4 Potencia neutralizante .....	63
6.5 Purificación de inmunoglobulinas .....	66
6.5.1 Precipitación con ácido caprílico. ....	66
6.5.2 Purificación de las subclases de IgG .....	66
6.6 Neutralización de las subclases.....	68
6.7 Evolución del reconocimiento de las proteínas del veneno .....	70
<b>7.Discusión.....</b>	<b>74</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>84</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Países de la región del Medio Oriente y Norte de África (MENA)	10
Figura 2. Aparato de veneno de vipérido.	15
Figura 3. Esquema de Inmunoglobulina G (IgG).	21
Figura 4. Sitios de inmunización y linfonodos regionales cercanos	23
Figura 5. Círculo vicioso de la producción y distribución de antivenenos en el continente africano.	30
Figura 7. Evolución de títulos de IgG en los caballos del grupo AVN.	51
Figura 8. Evolución de títulos de IgG de los caballos del grupo AEN.	54
Figura 9. Western Blot de prueba de especificidad de inmunoglobulinas purificadas.	58
Figura 10. Gráfica de títulos de las subclases de IgG anti <i>C. cerastes</i>	59
Figura 11. Gráfica de títulos de las subclases de IgG anti <i>N. pallida</i>	61
Figura 13. Títulos normalizados de IgM vs <i>N. pallida</i>	63
Figura 14. Evolución de la potencia neutralizante del suero AVN presentada como $\mu\text{g}$ de veneno neutralizado por ml de suero.	64
Figura 15. Evolución de la potencia neutralizante del suero AEN presentada como $\mu\text{g}$ de veneno neutralizado por ml de suero.	65
Figura 16 Inmunoglobulinas purificadas a partir del suero pool AEN	67
Figura 17 Inmunoglobulinas purificadas a partir del suero pool AVN	67
Figura 18. Evolución del reconocimiento de las proteínas de venenos de vipéridos por el suero AVN..:	70
Figura 19. Evolución del reconocimiento de las proteínas de venenos de elápidos por el suero AEN..:	73

## Índice de tablas

Tabla 1. Esquema base de inmunización de caballos para obtención de suero hiperinmune	32
Tabla 2. Mezcla de venenos utilizados en el esquema de inmunización	33
Tabla 3. Venenos utilizados en las pruebas <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> .	36
Tabla 4. Esquema de inmunización de conejos con IgG's equinas.	38
Tabla 5. Dosis letales $DL_{50}$ en ratón de los venenos utilizados para los ensayos de $DE_{50}$	46
Tabla 6. Títulos de IgG del pool de suero de los caballos AVN	49
Tabla 7. Títulos de IgG del pool de suero de los caballos del grupo AEN	49
Tabla 8. Títulos de IgG de los caballos del grupo AVN	52
Tabla 9. Títulos de IgG de los caballos del grupo AEN	55
Tabla 10. Doble purificación de Inmunoglobulinas de conejo	57
Tabla 11. Títulos de inmunoglobulinas purificadas vs estándares	59
Tabla 12. Títulos de las subclases de IgG anti <i>N. Pallida</i>	60
Tabla 13. Títulos de las subclases de IgG anti <i>N. Pallida</i>	61
Tabla 15. $DE_{50}$ Pool AEN	65
Tabla 16. Rendimiento de precipitación con ácido caprílico	66
Tabla 17. Porcentajes de supervivencia de pruebas de neutralización con las subclases de IgG purificadas*	68

## Resumen

El accidente ofídico es un importante problema de salud pública, cuyo único tratamiento efectivo son los antivenenos obtenidos a partir del suero de caballos hiperinmunizados.

Anteriormente se ha estudiado la respuesta inmune humoral de los animales inmunizados con uno o dos venenos diferentes, sin embargo, para obtener antivenenos con una polivalencia que abarque las especies más importantes de la región del medio oriente y norte de África (MENA, por sus siglas en inglés), se inmunizó a dos grupos de caballos con una variedad muy amplia de venenos. En el presente trabajo, se estudió la evolución de la respuesta inmune humoral de estos animales en términos de títulos generales de anticuerpos clase IgG específicos contra los venenos más importantes, títulos de la clase IgM, y títulos de la subclase IgG(T). Así como potencias neutralizantes (DE50) y perfil de reconocimiento de las diferentes fracciones proteicas del veneno mediante western blot. Todo durante el esquema de inmunización inicial (19 semanas) y fechas de producción posteriores.

Los títulos de IgG contra todos los venenos aumentaron de manera gradual hasta un pico máximo en las semanas 19-21, con una disminución sostenida en las semanas posteriores. A pesar de esto, la potencia neutralizante (DE50) siguió aumentando, siendo especialmente potente contra el veneno de *C. cerastes* y *N. pallida*. IgG(T) resultó la subclase dominante de IgG y se demostró que es responsable de prácticamente toda la potencia neutralizante de los sueros. Por su parte, los títulos de IgM aumentan durante las primeras inmunizaciones, sin un descenso posterior como se esperaba por el fenómeno de cambio de clase. Las proteínas con mayor reconocimiento por parte de las IgG's en el suero fueron las 3FTx's y PLA<sub>2</sub> de los venenos de elápidos y las SVMP de clase III en el veneno de vipéridos. Los caballos son capaces de producir suero hiperinmune con adecuada potencia neutralizante ante un estímulo antigénico muy complejo.

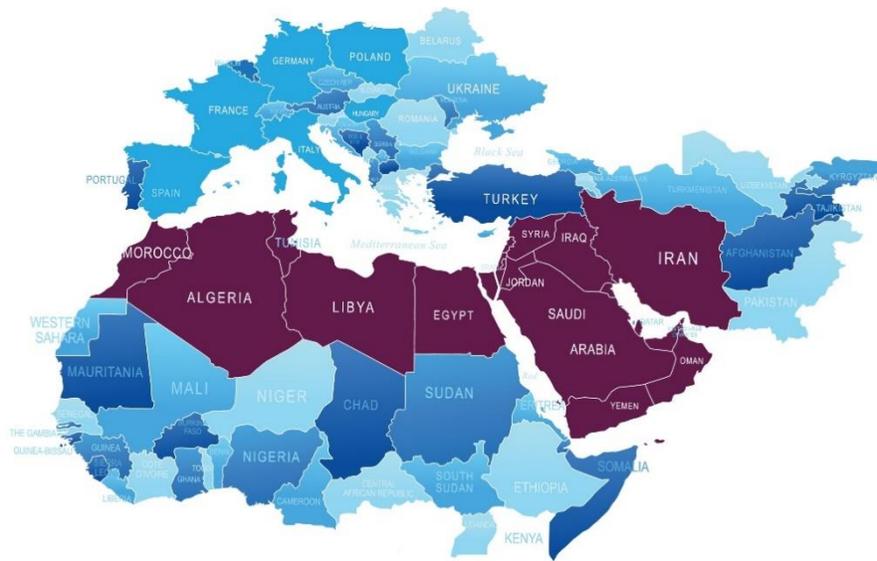
## 1. Introducción

### 1.1 Epidemiología del ofidismo en el mundo y en el continente africano

La mordedura de una serpiente venenosa, conocida como accidente ofídico, es un importante problema de salud pública a nivel mundial considerado por la OMS como una de las enfermedades tropicales ignoradas o NTD's ("Neglected Tropical Diseases")(J. Chippaux, 2017). Estas pueden causar incapacidad permanente y una gran carga económica para las familias en naciones que tienen altos índices de pobreza y que dependen en su economía del trabajo manual en actividades primarias como la agricultura (Harrison et al., 2009; Stock et al., 2007).

Los accidentes ofídicos ocurren en la mayor parte del mundo, sin embargo, la incidencia más alta se reporta en África, Latinoamérica y Asia, en donde representa una seria carga para el desarrollo económico y social (Alirol et al., 2015). En África, las condiciones sociales – predominio de la agricultura poco tecnificada y servicios sanitarios deficientes–, aunadas a la compleja situación geográfica y la consecuente diversidad herpetológica, se traducen en alrededor de 20,000 muertes al año por mordedura de serpiente y en al menos el mismo número de incapacitados permanentes (Stock et al., 2007).

El continente africano es dividido por la OMS en dos subregiones epidemiológicas para fines de estudio e implementación de medidas sanitarias y censos de salud: África subsahariana, que comprende la gran región al sur del desierto del Sahara y el norte de África, formado por los países que limitan con el mar mediterráneo (**Figura. 1**). Esta última región es agrupada junto con el medio oriente debido a similitudes sociales, culturales y sanitarias (UN, n.d.).



**Figura 1. Países de la región del Medio Oriente y Norte de África (MENA) resaltados en morado.** (Hotez et al., 2012)

El problema de salud pública es más apremiante y de mayor magnitud en África subsahariana, en donde se reportan hasta 1000 casos de envenenamiento por cada 100,000 habitantes (Kasturiratne et al., 2008), que causan muertes e incapacidad debida a patologías como el síndrome necrótico, disfunción renal, secuelas neurológicas y amputaciones (Stock et al., 2007). Por el contrario, la región del norte de África presenta tasas de morbilidad que se han estimado en alrededor de 15 envenenamientos por cada 100 000 habitantes (Kasturiratne et al., 2008).

Los antivenenos son los únicos fármacos existentes para el tratamiento del accidente ofídico. Una de las características que se ha priorizado en su fabricación es la polivalencia, es decir, que un solo producto tenga efectividad contra el veneno de varias de las especies de una región. Esta característica permite simplificar la distribución, las pruebas farmacológicas y sobre todo los procedimientos terapéuticos, debido a que no se necesita identificar plenamente la especie de serpiente involucrada en el accidente para decidir que antiveneno usar (Stock et al., 2007).

La fabricación de un antiveneno que pueda neutralizar efectivamente el veneno de varias especies de serpiente está limitada por dos factores: El número de venenos con los que puede

ser inmunizado el animal productor del suero hiperinmune y la máxima concentración de proteína posible en un antiveneno (100 mg/ml)(Stock et al., 2007).

La herpetofauna venenosa en las dos regiones de África es diferente, por tanto, es necesaria la fabricación de un antiveneno polivalente propio para cada una de ellas para lograr la cobertura médica de todo el continente. En este trabajo se estudiarán aspectos inmunológicos de los caballos utilizados para fabricar el antiveneno para la región del medio oriente y norte de África (MENA, por sus siglas en inglés) contra las dos familias de serpientes venenosas más importantes.

## **1.2 Clasificación de las serpientes de importancia médica en Medio Oriente y Norte de Africa**

Las serpientes se encuentran agrupadas en 22 familias dentro del orden squamata, suborden serpentes. Se conocen alrededor de 456 géneros y 3400 especies que comparten características morfológicas distintivas como: cuerpo elongado cubierto de escamas, ausencia de extremidades, articulación temporomandibular laxa que les permite tragar presas más grandes que su cabeza, ausencia de párpados y en la mayoría de los casos presentan un solo pulmón funcional. Además, son amniotas y ectotérmicas (J.Vitt, 2014).

Debido a la ausencia de extremidades, las serpientes capturan, manipulan y consumen su presa utilizando el cuerpo y boca mediante diferentes estrategias. Algunas simplemente capturan a su presa con la boca y la tragan, otras utilizan su cuerpo y su boca para sujetar y constreñir y también existen las que inyectan componentes tóxicos (venenos) que inhabilitan o matan a sus presas. Estos venenos les sirven además para defenderse de sus depredadores y algunos pueden causar daños importantes al ser humano (Estrada et al., 2011; J.Vitt, 2014).

De las 22 familias de serpientes solamente 4 incluyen especies que utilizan la estrategia de envenenar a sus presas y depredadores. Las familias *Viperidae* y *Elapidae* están formadas en su totalidad por especies venenosas, mientras que solo algunas especies dentro de las familias *Colubridae* y *Atractaspididae* tienen esta característica (J.Vitt, 2014; Uetz, 2017).

Las especies más importantes en términos de mortalidad para todo el continente africano son los vipéridos *Echis ocellatus*, *Echis pyramidum*, *Echis leucogaster*, *Bitis gabónica*, *Bitis arietans*, y los elápidos *Naja haje*, *Naja pallida*, *Naja nigricoli*, *Naja melanoleuca*, *Naja*

*nivea*, *Naja mossambica*, *Dendroaspis polylepis*, *Dendroaspis viridis*, *Dendroaspis angusticeps* y *Dendroaspis jamesoni* (Warrell, 1995). Los géneros y las especies con mayor importancia epidemiológica para el Medio Oriente y Norte de África se repasan a continuación.

### **Vipéridos**

Las serpientes de la familia *Viperidae* se caracterizan por un cuerpo robusto y cabeza triangular ensanchada en la base por las glándulas de veneno y los músculos compresores de la glándula, así como por el par de colmillos solenoglifos (huecos y retraíbles hacia el paladar cuando la boca está cerrada). *Viperidae* se divide en dos subfamilias, *viperinae* o “víboras del viejo mundo” y *Crotalinae* o “víboras con fosa” llamadas así por presentar un par de surcos en la porción más craneal de la cabeza en donde se encuentran receptores infrarrojos. El veneno de las serpientes de esta familia tiene manifestaciones diversas con predominio de los efectos citotóxicos y miotóxicos, aunque se ha observado efectos neurotóxicos en varias especies (J.Vitt, 2014).

La distribución geográfica de los géneros de la familia *viperidae* y las manifestaciones clínicas generales del envenenamiento mostradas a continuación provienen de la revisión hecha por Chippaux (J.-P. Chippaux, 2006) a menos que se indique otra fuente bibliográfica.

La subfamilia *viperinae* se caracteriza por un cuerpo robusto y cabeza triangular cubierta de escamas pequeñas, los principales géneros presentes en esta región son:

-*Bitis*. Consta de 16 especies, dentro de las cuáles las de mayor importancia médica son *Bitis arietans*, *Bitis gabonica* y *B. nasicornis*. El veneno de este género causa fuerte inflamación, necrosis y hemorragia.

-*Cerastes*. Las serpientes de este género presentan unos apéndices cutáneos que semejan cuernos. Se distribuye en el norte de África y en el cercano este y las principales especies son *Cerastes cerastes* y *Cerastes vipera*, El veneno provoca inflamación y necrosis graves además de un severo síndrome hemorrágico.

-*Echis*. Género que agrupa a 8 especies distribuídas desde el este de África hasta el centro de Asia, las cuales son parecidas morfológicamente y en algunos casos son difíciles de distinguir. Las especies encontradas en el continente africano y el medio oriente son: *E.*

*coloratus* en la península arábiga, *E. pyramidum* desde el oeste de África hasta Egipto. *E. leucogaster* en los oasis del desierto del Sahara y en la zona de transición con la sabana africana y *E. ocellatus* en la sabana, especie que además está implicada en el 85% de los envenenamientos en el occidente del África subsahariana. El veneno de este género provoca inflamación, necrosis, y un síndrome hemorrágico grave y prolongado.

-*Vipera*. 24 especies, de las cuales la única de importancia médica en el norte de África y medio oriente es *Vipera latastei*. El veneno provoca inflamación severa y hemorragias leves, y en algunas poblaciones se han observado efectos neurotóxicos.

-*Macrovipera*. Incluye dos especies de las cuáles *M. lebetina* es la de distribución más amplia, desde Algeria hasta el centro de Asia. El veneno tiene efectos hemorrágicos y necróticos fuertes.

-*Montivipera*. Formado por ocho especies anteriormente clasificadas dentro del género *vipera*, las más importantes son *Montivipera raddei* en Armenia y *Montivipera xanthina* en Turquía.

### **Elápidos**

Los Elápidos, por su parte, tienen un par de colmillos erectos no retraíbles orientados hacia atrás en la porción craneal de la maxila (dentición proteroglifa) y sus venenos provocan un síndrome neurotóxico conocido como “síndrome cobra” caracterizado por parálisis de las extremidades que progresa hacia los músculos respiratorios y en consecuencia provoca la muerte por asfixia (J.Vitt, 2014).

La familia incluye 60 géneros, sin embargo, solo los siguientes 2 tienen presencia en Medio Oriente y Norte de África:

-*Naja*. Este género agrupa a las cobras, entre las principales en el norte de África está *N. haje* o “cobra egipcia”, que cuenta con subespecies distribuidas en las regiones más septentrionales de Marruecos, Argelia, Libia y Egipto y en todo Túnez. Además de algunas poblaciones en Arabia Saudita (Trape et al., 2009). Otra especie es *N. pallida*, una de las cobras escupidoras que son capaces de arrojar el veneno gracias a modificaciones en sus colmillos, está distribuida en el sur de Egipto y en Sudán.

-*Walterinnesia*. Incluye solamente a *W. aegyptia* y *W. morgani*. Son conocidas como “cobra negra del desierto” y se encuentran en Israel, Siria, Egipto, la península del Sinaí, el sur de la península arábiga, Iran e Iraq. Las dos especies presentan variaciones morfológicas muy sutiles. El efecto del veneno es predominantemente neurotóxico pero presenta también actividad hemorrágica (Gitter et al., 1962).

### **Colúbridos**

La familia *colubridae* representa el grupo más diverso de serpientes en cuanto a estructura y distribución, e incluyen especies con alguno de los siguientes tipos de dentición: aglyfos (sin dientes especializados) opistoglifos (un par de colmillos orientados hacia atrás en la porción caudal de la maxila) y proteroglyfos (Colmillos no retraíbles orientados hacia atrás en la porción craneal de la maxila) (J.Vitt, 2014). A pesar de incluir especies venenosas, este grupo taxonómico tiene poca importancia epidemiológica en la región y no es incluido en los antivenenos con los que se pretende cubrir a los accidentes ocurridos en Medio oriente y Norte de África.

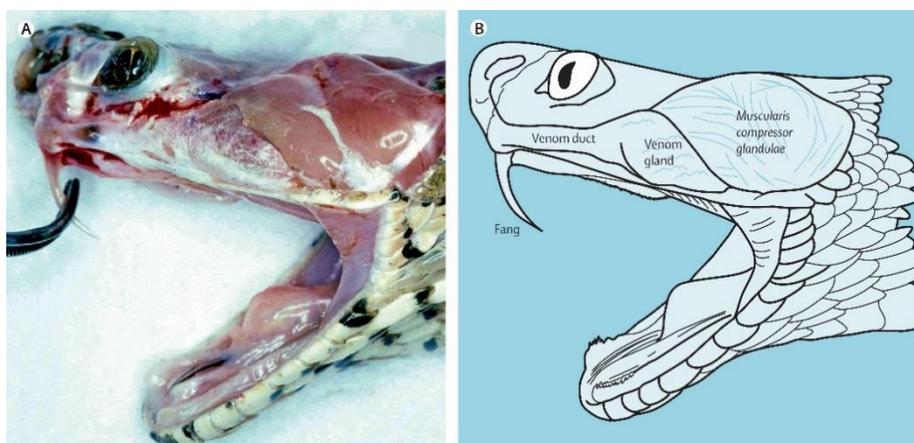
### **1.3 Venenos de serpiente**

Las serpientes producen veneno por medio de glándulas exócrinas modificadas que tienen como origen evolutivo las glándulas salivales. Las glándulas son pares y están situadas en la región temporal, mediales a las escamas labiales, posterior a las narinas y debajo de los ojos (Kochva, 1987). En los vipéridos y elápidos, estas tienen un amplio volumen basal que les permite almacenar el veneno secretado para poder inyectar una cantidad grande de manera casi inmediata en el evento de una mordida. La compresión de la glándula para liberar el veneno es llevada a cabo por músculos especializados, que pueden modular su contracción según la cantidad de veneno que sea necesario excretar (Kochva, 1987; Mackessy, 2010). **(Figura 2).**

El tejido glándular está constituido por túbulos irregulares formados por células columnares con abundantes gránulos en la región apical. La población celular presenta diferencias morfológicas según los componentes que secretan, lo que se corresponde con el amplio repertorio de moléculas que son capaces de sintetizar estos órganos (Mackessy, 2010).

El aparato de inyección comprende un par de dientes modificados (colmillos) con una serie de adaptaciones que cada género de serpientes ha adquirido a lo largo de su evolución (Kochva, 1987).

El veneno es una mezcla compleja de moléculas de diferente peso molecular de las cuales cada una es potencialmente tóxica. Los componentes principales son péptidos y proteínas que representan entre el 90 y 95% del peso seco del veneno, otros componentes son carbohidratos, nucleótidos, nucleósidos, iones, aminoácidos y lípidos (Kochva, 1987).



**Figura 2. Aparato de veneno de vipérido.** A) espécimen disecado. B) esquema del espécimen. (Warrell, 2010)

El componente proteico de los venenos está formado por gran cantidad de enzimas como fosfolipasas, fosfodiesterasas, acetilcolinesterasas, metaloproteasas, serin-proteasas, hialuronidas, endonucleasas y glicoproteínas. También contienen neurotoxinas pre y post sinápticas, miotoxinas y cardiotoxinas (Gutiérrez et al., 2009).

Algunas toxinas proteicas del veneno evolucionaron a partir de genes activos en las glándulas orales de los reptiles. Este es el caso de las kallikreínas y las proteínas CRiSP (Cysteine rich secretory proteins), que son de las proteínas más expresadas en muchas especies (Fry, 2015).

En otros casos, las proteínas parecen haber derivado de genes específicamente expresados en otros tejidos. Un ejemplo de esto son las fosfolipasas tipo II (PLA<sub>2</sub>), que evolucionaron

de genes específicamente expresados en el hígado y algunas toxinas derivadas de factores de la coagulación (Fry et al., 2015).

A pesar de la complejidad de los venenos de serpiente, la mayoría de los componentes con relevancia médica pertenecen a un grupo limitado de familias de toxinas. Las más importantes son: Toxinas de tres dedos (3FTxs), fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), Metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMPs), Serino proteasas de veneno de serpiente (SVSPs) y dendrotoxinas (Bermúdez-Méndez et al., 2018).

### **Metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMPs)**

Las SVMPs son enzimas con actividad biológica predominantemente hemorrágica. Otras actividades son fibrinolítica y apoptótica. Su mecanismo de acción se centra en la hidrólisis de proteínas de la membrana basal del endotelio vascular, principalmente de colágeno IV. La pérdida de integridad de la pared del vaso sanguíneo provoca hemorragias por rexis. También son capaces de activar el factor X de la coagulación y de activar la protrombina, lo que lleva a la llamada coagulopatía por consumo (W. Fox & M.T. Serranao, 2010).

Las SVMPs no tienen actividad mionecrótica directa, sin embargo, el daño a los vasos sanguíneos provoca la formación de microtrombos causantes de infartos en los músculos. El compromiso vascular también afecta a la regeneración de los tejidos en los pacientes que sobreviven a la mordida (Bermúdez-Méndez et al., 2018).

Debido al daño tisular extendido provocan la liberación de los mediadores de la inflamación IL1 $\beta$ , IL-8, IL-6 y prostaciclina. La inflamación excesiva contribuye al daño tisular y puede provocar el síndrome compartimental que agrava la isquemia en el músculo y nervios (W. Fox & M.T. Serranao, 2010).

Las SVMPs están divididas en 3 clases: PI (20-30 kDa), PII (30-60 kDa), PIII (60-100 kDa). Son un componente mayor en los venenos de los vipéridos (Estrada et al., 2011).

### **Serinoproteasas de veneno de serpiente (SVSPs)**

Son enzimas con una actividad catalítica similar a la tripsina con un peso molecular de entre 26 y 67 kDa y una actividad biológica principalmente hemorrágica (Bermúdez-Méndez et al., 2018).

Su fisiopatología difiere de las SVMPs en que no dañan la pared de los vasos sanguíneos, sino que catalizan la transformación anómala del fibrinógeno en fibrina mediante hidrólisis del enlace peptídico entre los residuos Arg y Lys de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . La fibrina se polimeriza dentro de los vasos sanguíneos y forma coágulos frágiles que se disuelven rápidamente por acción de la plasmina (J. Phillips et al., 2010).

La rápida disolución de estos coágulos no permite que ocluyan los vasos sanguíneos y que generen infartos, por lo cual estas enzimas no son las responsables de cuadros necróticos en las víctimas. Sin embargo, la formación sistémica de coágulos provoca que la tasa de consumo de fibrinógeno supere a la de su síntesis en el hígado, generando coagulopatía por consumo que genera hemorragias generalizadas en la microvasculatura de manera sistémica. La manifestación observable clínicamente es el sangrado de tubo digestivo alto y bajo, de encías y en algunos casos hemorragias intracraneales (Bermúdez-Méndez et al., 2018).

Otra actividad biológica que se ha relacionado a estas enzimas es la neurotoxicidad manifestada como el llamado “síndrome giroxina”, sin que se entienda aún su fisiopatología (J. Phillips et al., 2010).

Estas enzimas son abundantes en los venenos de vipéridos aunque también se encuentran en los venenos de algunos elápidos (Bermúdez-Méndez et al., 2018).

### **Fosfolipasas A<sub>2</sub> de veneno de serpiente (PLA<sub>2</sub>)**

Las fosfolipasas son enzimas con numerosas funciones en el organismo. Las que se encuentran en el veneno de serpiente pertenecen al grupo de las fosfolipasas A<sub>2</sub> secretadas y tienen diversos efectos farmacológicos en las víctimas del envenenamiento, entre ellos: Neurotoxicidad pre sináptica, miotoxicidad, cardiotoxicidad, actividad hemolítica, hipotensiva y causantes de edema (Doley et al., 2010).

Los efectos farmacológicos de las PLA<sub>2</sub> pueden ser dependientes o independientes de su actividad enzimática. Los efectos dependientes de la actividad enzimática ocurren por la

acción directa sobre los fosfolípidos de membrana o por los metabolitos sintetizados a partir de los ácidos grasos liberados, como las prostaglandinas y prostaciclina. Los efectos independientes de la actividad enzimática ocurren por unión de la fosfolipasa con su ligando (que puede ser un canal iónico o un receptor), actuando como agonista o antagonista (Doley et al., 2010; Estrada et al., 2011).

Las PLA<sub>2</sub> presentes en los venenos de serpiente pertenecen al Grupo I y Grupo II. El Grupo I son proteínas de 115 a 120 residuos de aminoácidos que se encuentran en los venenos de los elápidos. El Grupo II son proteínas de 120-125 residuos y se encuentran en los venenos de vipéridos. La masa molecular de las PLA<sub>2</sub> es de 13-18 kDa (Doley et al., 2010).

### **Toxinas de tres dedos (3FTXs)**

Proteínas de 60-74 residuos de aminoácidos con un núcleo hidrofóbico central a partir del cual se extienden tres asas polipeptídicas que asemejan la apariencia de dedos. Estas proteínas han pasado por un proceso de evolución dinámica que les ha dado numerosas variaciones estructurales y funcionales (Estrada et al., 2011; Utkin et al., 2015). Los efectos principales de las toxinas dentro de este grupo se describen a continuación:

- $\alpha$ -neurotoxinas. Interfieren la sinapsis neuromuscular al unirse a los receptores  $\alpha$  nicotínicos de acetilcolina postsinápticos, lo que resulta en el bloqueo de la transmisión neuromuscular que se manifiesta clínicamente como parálisis flácida (P. Hedge et al., 2010).
- K- neurotoxinas. Se unen específicamente a un receptor nicotínico neuronal ( $\alpha$ 3 $\beta$ 4 nAChRs) de acetilcolina. Se ha encontrado en el veneno de *Bungarus multicinctus* (P. Hedge et al., 2010).
- Fasciculinas. Son inhibidoras de acetilcolinesterasa. Provocan parálisis rígida de los músculos que es precedida por fasciculaciones. Se han identificado sólo en los venenos de algunas mambas (género *Dendroaspis*). (P. Hedge et al., 2010; Utkin et al., 2015)
- Neurotoxinas muscarínicas. Estas toxinas fueron las primeras identificadas que se unen a receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs). Estos receptores controlan numerosos procesos fisiológicos entre los que se encuentran la contracción del

músculo liso y músculo cardíaco, secreciones glandulares, liberación de neurotransmisores (P. Hedge et al., 2010).

- Cardiotoxinas/citotoxinas. Provocan lisis celular al unirse a la membrana citoplasmática y afectando su integridad. La despolarización resultante provoca paro cardíaco sistólico, necrosis y apoptosis. Son especialmente abundantes en los venenos de cobras al representar hasta el 50% del peso seco del veneno, lo que las hace las causantes de la mortalidad en la mayoría de los casos (P. Hedge et al., 2010).

Otras proteínas tóxicas presentes en los venenos de serpiente son hialuronidasas, nucleasas, nucleotidasas, fosfomonoesterasas, acetilcolinesterasas, L-amino oxidasas, proteínas secretorías ricas en cisteínas (CRISP), desintegrinas y lectinas tipo C (Bermúdez-Méndez et al., 2018).

La composición general de los venenos varía entre familias y géneros de serpientes debido a la especialización que les permite producir toxinas altamente afines a un blanco. La mayoría de los venenos de vipéridos tienen abundantes componentes enzimáticos de alto peso molecular que le confieren actividades necróticas y hemorrágicas. Por su parte, los venenos de elápidos contienen mayor cantidad de toxinas y enzimas con acciones sobre el sistema nervioso que son de menor peso molecular (J. P. Chippaux et al., 1991; Mackessy, 2010).

Además de las variaciones interespecíficas, se sabe que existen variaciones intraespecíficas (entre individuos de la misma especie), mediadas por factores ambientales, geográficos y alimentarios (J. P. Chippaux et al., 1991)

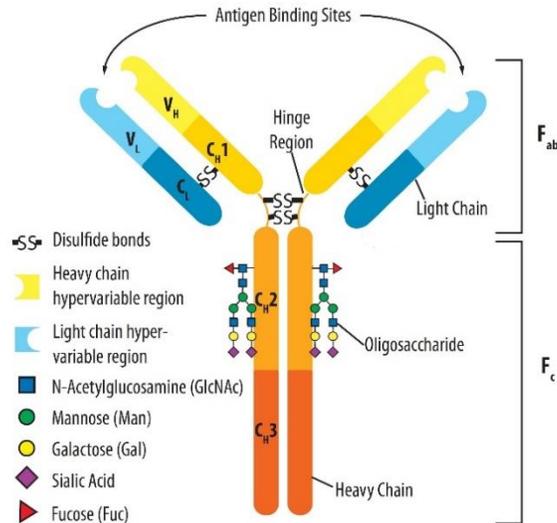
#### **1.4 Antivenenos**

El único método efectivo conocido para tratar un accidente ofídico es la administración de antivenenos con la especificidad y la potencia adecuadas. Los antivenenos son concentrados de inmunoglobulinas o partes de éstas obtenidas a partir del plasma de animales hiperinmunizados (generalmente caballos) con veneno de serpiente que estimula su respuesta inmune humoral (WHO, 2010). Los anticuerpos o fragmentos en los antivenenos se unen a las toxinas y son capaces de neutralizar sus efectos (Estrada et al., 2011).

Los experimentos de Phisalix y Bertrand y de Calmette en 1894 sobre las propiedades antitóxicas de sueros de conejos y cuyos inmunizados con venenos de cobra y víbora constituyen el primer antecedente del uso del suero de animales contra el ofidismo (Bochner, 2016). Calmette participó en estudios que probaban la eficacia de los sueros para tratar el envenenamiento en humanos y en 1897, desarrolló el primer antisuero contra veneno de cobra de uso clínico obtenido a partir de caballos (WHO, 2010).

Para los antivenenos actuales, el plasma es obtenido de los caballos después de ser sometidos a un esquema de inmunización con los venenos que se pretende neutralizar. Se obtiene un volumen determinado de sangre que se almacena en un reservorio con anticoagulante. Evitar la coagulación de la sangre permite obtener el plasma después de la sedimentación de los elementos celulares y regresar estos al caballo para evitar problemas de salud como la anemia. Este proceso es llamado plasmaféresis y el resultado final es el plasma rico en inmunoglobulinas, que es la materia prima que será sometida a procesos posteriores para fabricar el antiveneno (WHO, 2016).

Las moléculas de Inmunoglobulina G (IgG) son la principal clase implicada en la neutralización de toxinas. Tienen un peso aproximado de 150 kDa y están compuestas de dos diferentes tipos de cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas o H de 50 kDa con cuatro dominios ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) y dos cadenas ligeras o L de 25 kDa con dos dominios ( $V_L$  y  $C_L$ ). Cada molécula presenta dos regiones  $F_{ab}$  formadas por  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $V_L$  y  $C_L$ , en las cuales los dominios variables  $V_H$  y  $V_L$  tienen los sitios de unión al antígeno (Fig 1). La otra región es la  $F_c$  que participa en la función efectora de la molécula y está formada por los dominios constantes  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$  de las cadenas pesadas (Shi & Goudar, 2014). **(Figura 3)**



**Figura 3. Esquema de Inmunoglobulina G (IgG).** (Shi & Goudar, 2014).

El desarrollo de antivenenos a partir del suero de caballos hiperinmunizados ha pasado por varias etapas y en todas ellas la base ha sido la estimulación del sistema inmune de un animal por medio de la administración de dosis subletales de veneno para utilizar sus anticuerpos y transferir la inmunidad humoral a la víctima del accidente ofídico. Los sueros crudos utilizados directamente en las víctimas del accidente ofídico constituyeron la primera generación de antivenenos. En la segunda generación se utilizaron las inmunoglobulinas purificadas, lo que permitió separar del producto proteínas altamente inmunogénicas sin utilidad para la neutralización. En la actualidad se encuentra en uso la tercera generación de dichos fármacos, que presenta avances importantes que permiten disminuir drásticamente la posibilidad de reacciones adversas de índole inmunitaria como el choque anafiláctico (Stock et al., 2007). La principal mejora de la generación actual de antivenenos es la digestión de los anticuerpos con pepsina para obtener fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que son los responsables del reconocimiento de los epítopes. De esta manera se descartan las porciones Fc de los anticuerpos, las cuales no son necesarias para la neutralización de las toxinas y están implicadas en respuestas adversas tal como la activación del complemento en el individuo que recibe la terapia con antiveneno (A. De Roodt et al., 2010; Tizard, 2013a).

Los antivenenos están incluidos en la lista de medicamentos esenciales de la Organización mundial de la salud debido a la magnitud del accidente ofídico. La Guía de la OMS para la

producción, control y regulación de inmunoglobulinas de antivenenos de serpiente (WHO, 2016) especifica las buenas prácticas de manufactura, entre las que se encuentran: la trazabilidad de los lotes de veneno en las mezclas para inmunizar a los caballos, las dosis, los adyuvantes y las fechas de inmunización, así como el registro de la persona encargada y las posibles reacciones adversas observadas en el caballo (WHO, 2016).

Otra de las prácticas recomendadas es medir los títulos de anticuerpos en el plasma durante el esquema de inmunización por métodos *in vitro* y la potencia neutralizante por métodos *in vivo* (WHO, 2016). La potencia neutralizante se expresa como dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>), que es la cantidad de suero necesario para rescatar a la mitad de la población de ratones expuestos a tres dosis letales medias (LD<sub>50</sub>).

#### **1.4.1 Generación del plasma hiperinmune**

##### *Inmunización, inflamación y respuesta inmune innata*

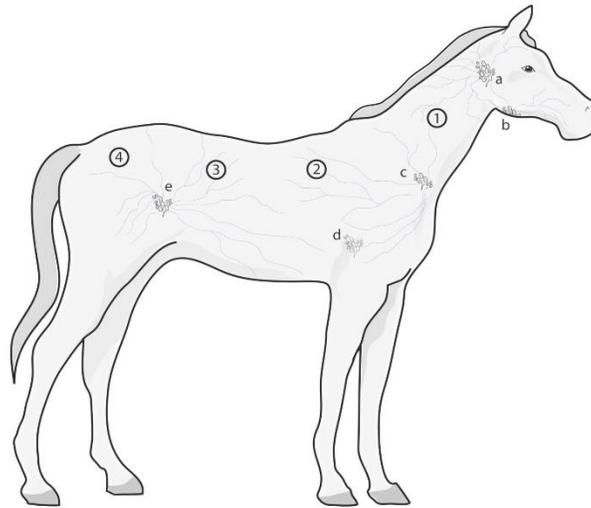
La hiperinmunización de los caballos se realiza por vía subcutánea o intradérmica en alguna de las regiones señaladas en la **Figura 4**, siendo las tablas del cuello la más utilizada. El volumen total de cada inmunización es repartido en varios sitios para aumentar la superficie de exposición y disminuir los efectos nocivos de la inoculación con veneno (Estrada et al., 2011).

El diseño de la mezcla de venenos para inmunizar debe de considerar las especies con mayor importancia clínica de la región objetivo, además de incluir veneno de regiones geográficas diferentes e incluso de ejemplares juveniles y sub-juveniles debido a la variación intraespecífica. La inmunización con venenos de especies cercanas taxonómicamente puede resultar en mayores títulos de anticuerpos debido a un efecto sinérgico (WHO, 2016).

La vía de administración subcutánea sitúa a las moléculas en el tejido conectivo de la región, en donde las llamadas células centinela (mastocitos, neutrófilos, fibroblastos, etc.) reconocen la presencia de partículas extrañas y asociadas al daño celular mediante receptores tipo Toll (TLR), lectinas tipo C y receptores fagocíticos, entre otros (Tizard, 2013c). El ligando de estos receptores son los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), generados por la acción enzimática de algunos componentes del veneno (Siegrist, 2008). El uso de adyuvantes como la alumina, que potencia la expresión de coestimuladores y citocinas, así como del adyuvante incompleto

de Freund que emulsifica el material inyectado y permite la liberación lenta de los antígenos promoviendo una respuesta duradera, son utilizados para optimizar la respuesta inmune humoral hacia las moléculas de veneno.

El uso de adyuvantes como la alúmina y el adyuvante incompleto de Freund contribuyen a expandir o a alargar esta fase de la respuesta inmune innata y a mejorar el proceso posterior de presentación de antígenos (WHO, 2016).



**Figura 4. Sitios de inmunización y linfonodos regionales cercanos** (Estrada et al., 2011).

De los siguientes sitios, el 1 y el 4 son los recomendados por la WHO (WHO, 2016): 1) Tabla del cuello. 2) Espalda. 3) Lomo. 4) Anca. Linfonodos que drenan estos sitios: a) retrofaríngeos, b) submandibulares, c) preescapulares, d) subescapulares, e) femorales.

La activación de los receptores de PAMPS y DAMPS dispara una cascada de señalización en las células centinela que resulta en la transcripción y traducción de genes de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-1, IL-2, así como moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (Tizard, 2013c). Las citocinas en el tejido inician la reacción inflamatoria que incluye el reclutamiento de neutrófilos en la reacción temprana y la activación de macrófagos y células dendríticas en la fase tardía.

Los macrófagos y las células dendríticas fagocitan los restos celulares resultantes de la reacción inflamatoria. Las proteínas del veneno que son capaces de estimular al sistema inmune adaptativo (antígenos) son procesadas por ambas células, conocidas como células

presentadoras de antígeno. El papel de las células dendríticas en una primoexposición es de mayor importancia en el proceso de presentación de antígenos, el cual marca el inicio de la respuesta inmune adaptativa.

Las células dendríticas viajan por vía linfática hacia los linfonodos regionales (submandibulares, retrofaríngeos y preescapulares en el caso de inmunización en tablas del cuello)(**Figura 4**). Durante el trayecto, terminan de procesar los antígenos y acoplan los fragmentos a un complejo de proteínas membranales llamado complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII)(Tizard, 2013b). Además, expresan moléculas coestimuladoras que funcionan en conjunto con los antígenos para activar a los linfocitos en la respuesta inmune adaptativa.

#### *Respuesta inmune adaptativa hacia las moléculas de veneno*

Los linfonodos son el lugar de encuentro entre los antígenos (acoplados a MHCII) y los linfocitos T y B vírgenes (Tizard, 2013b). El organismo cuenta con un repertorio muy amplio (hasta  $10^{15}$ ) de estos linfocitos capaces de reconocer antígenos a los cuales no ha sido expuesto debido a un proceso conocido como generación de diversidad. En este proceso, los linfocitos generan variantes de sus receptores BCR en el caso de linfocitos B y TCR en el caso de linfocitos T mediante recombinación genética de los segmentos VDJ del gen de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos (Siegrist, 2008).

Los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas en el caballo se encuentran en el cromosoma 24 (Bettina Wagner, 2006). Cada evento de recombinación genera un linfocito virgen con una especificidad única, alcanzando un número de receptores diferentes de alrededor de  $10^{15}$ . Después de sufrir procesos de selección en la médula ósea y en el timo, los linfocitos con estos receptores de membrana resultado de la recombinación aguardan en los linfonodos la exposición a los antígenos presentados por las células dendríticas (Siegrist, 2008).

Al encontrarse la célula dendrítica y el linfocito T cooperador virgen con un TCR lo suficientemente afín al antígeno en sus moléculas de MHCII se establece la llamada sinapsis inmunológica (Tizard, 2013b). El primer evento en esta sinapsis es la expresión de CD154 por la célula T, una molécula coestimuladora que se unirá al CD40 de la célula dendrítica. Esta unión inicia una amplificación de la señal inicial y la expresión de otras moléculas

coestimuladoras y citocinas como IL-1, IL-4 e IL-13 por parte de la célula presentadora de antígeno.

Estos tres estímulos (presentación de antígeno, moléculas coestimuladoras y citocinas IL-1, IL-4 e IL-3) llevan a la activación, multiplicación y diferenciación de la célula T cooperadora hacia el subtipo Th2, implicado en el desarrollo de la respuesta inmune de tipo humoral.

El perfil de citocinas secretadas por los linfocitos Th2 consta de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Estas citocinas actúan sobre los linfocitos B que reconocen el mismo antígeno presentado por las células dendríticas y promueven la maduración de linfocitos B a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Dufaud et al., 2017).

En una primera exposición al antígeno, la intensidad de la señal requerida para activar a las células T y B solo puede ser llevada a cabo por las células dendríticas, sin embargo, en exposiciones subsecuentes otras células como los macrófagos e incluso las mismas células B funcionan como células presentadoras de antígenos.

#### *Reacción extrafolicular*

La producción de anticuerpos en una primera exposición tarda 5-7 días en poder detectarse en el suero. Esta respuesta primaria depende de inmunoglobulinas de la clase M (IgM), las cuáles son poco afines y sus funciones efectoras son sobre todo para potenciar eventos de la respuesta inmune innata como la activación del complemento (Capolunghi et al., 2013). Esta primera reacción es llevada a cabo principalmente por linfocitos B fuera de centros germinales en la llamada “reacción extrafolicular”, la cual es corta debido a que la mayoría de las células activadas mueren por apoptosis unos días después. Esta reacción juega un papel menor en el desarrollo de la inmunidad (Siegrist, 2008).

La respuesta inmune humoral hacia antígenos no proteícos como los polisacáridos y ácidos nucleicos se basa solamente en estas reacciones extrafoliculares, por lo cual las concentraciones de inmunoglobulinas son muy bajas, transitorias y no hay generación de memoria (Siegrist, 2008).

#### *Cambio de clase y maduración de la afinidad*

Los antígenos que generan una respuesta lo suficientemente fuerte por parte de los linfocitos T y B promueven una respuesta llamada “reacción de centro germinal”. En esta reacción, los

linfocitos B afines son reclutados hacia una zona específica del linfonodo por células dendríticas foliculares en donde proliferan de manera masiva y se dan origen a dos poblaciones distintas: células B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos (Dufaud et al., 2017).

Las células plasmáticas secretan inmunoglobulina M (IgM) al principio de la reacción e IgG después del proceso de cambio de clase. La secreción de inmunoglobulinas alcanza un máximo en pocos días y después persiste con concentraciones más bajas por tiempos prolongados. La secreción prolongada depende de células plasmáticas de vida larga que se establecen en nichos especializados de la médula ósea (Siegrist, 2008).

La inmunoglobulina G (IgG) es la clase de inmunoglobulinas más abundante en el suero y la de menor peso molecular de las 4 clases principales (IgG, IgM, IgE e IgA), por lo cual su difusión del plasma hacia los tejidos es mayor y es la principal clase involucrada en la defensa de tejidos y superficies corporales ante patógenos extracelulares (Tizard, 2013a).

Después de la respuesta inicial de las células B de memoria llevan a cabo un proceso esencial para el desarrollo de anticuerpos con alta afinidad y capacidad neutralizante contra las toxinas. El fenómeno consiste en la hipermutación somática de los segmentos hipervariables de los genes de inmunoglobulinas llamado maduración de la afinidad. Este proceso se extiende por meses después de que finaliza la reacción de centro germinal y genera células B con un BCR de mayor afinidad (Dufaud et al., 2017).

El resultado de la hiperinmunización es la expansión masiva de las clonas de linfocitos B de memoria con receptores cada vez más afines a las toxinas. Además, se forman gran cantidad de células plasmáticas de vida larga que mantendrán concentraciones plasmáticas altas de inmunoglobulinas por varios meses.

## **El caballo como productor de plasma hiperinmune**

La hiperinmunización para la obtención de plasma rico en anticuerpos neutralizantes se ha realizado en borregos, caballos, burros y conejos. De ellos, el caballo es el más comúnmente usado (WHO, 2016).

El caballo es uno de los animales que de manera histórica han recibido mayor importancia dentro de la medicina veterinaria debido a su papel fundamental en actividades bélicas y de transporte. El amplio conocimiento médico y zootécnico de la especie representa una ventaja para su utilización como animal productor de inmunoglobulinas debido a que las características como el ambiente, la alimentación y la medicina preventiva están bien establecidas y son fáciles de cumplir.

Las características anatómicas del caballo facilitan la producción de suero hiperinmune; su talla grande (usualmente mayor de 400 kg) permite obtener entre 3 y 6 l de sangre (WHO, 2016) sin afectar la salud del animal por disminución del volumen plasmático. Además, la facilidad de acceder a venas grandes como la yugular externa con catéteres de un gran caudal disminuye el tiempo necesario para la obtención de sangre.

Por último, las características del comportamiento de este animal el cual es considerado generalmente dócil, fácil de habituar a rutinas de trabajo y al contacto cercano con el humano, facilitan su manejo dentro de un establecimiento productor de suero hiperinmune que requiere el manejo de muchos animales en un día.

En los primeros años de la utilización de suero hiperinmune de caballo como agente terapéutico, el procedimiento de inmunización y obtención de sangre suponía un grave riesgo para la salud de los animales. El volumen de sangre obtenido ante la gran demanda de suero antidifteria a finales del siglo 19 en el instituto Pasteur, exponía a los animales a una gran carga metabólica, que generaba debilidad, emaciación progresiva y enfermedades concomitantes. Por los mismos años, en la producción de suero para la generación de sueros anti escorpión en el instituto Vital Brasil, se documentaron gran cantidad de reacciones adversas y procedimientos como la exanguinación completa. (Camphora & Pucca, 2021)

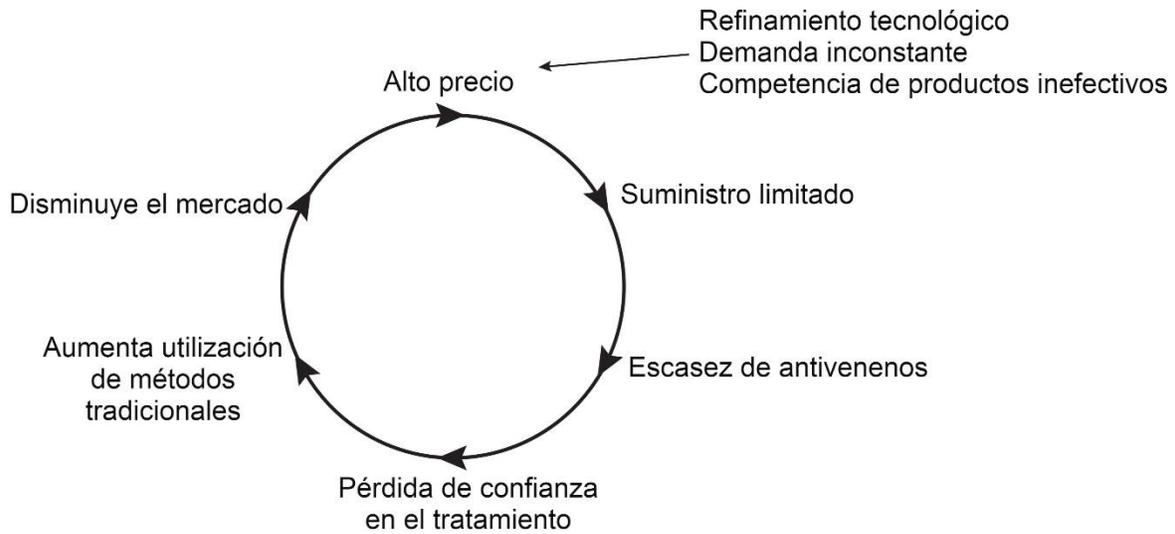
Las claras implicaciones bioéticas han permitido notables avances en el bienestar animal. Hoy los animales son revisados en cada evento de inmunización y colecta de sangre por un Médico veterinario que realiza examen físico general y pruebas de laboratorio, y ningún animal es colectado si se encuentra enfermo y/o anémico (WHO 2016). La colecta de sangre no sobrepasa el 1% del peso corporal o el 10% del volumen plasmático total. Además, se utiliza la plasmaféresis, la cual permite regresar al animal donante el paquete celular después de separar el plasma, lo que reduce la carga metabólica y la ocurrencia de anemia u otras citopenias. (Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals & Animal Welfare Division, 2001) Como particularidad del caballo, Scheer y Wickoff (Scheer J. Van Der, 1941) encontraron en el suero hiperinmune anti toxina tetánica un componente ausente en sueros de caballos sin hiperinmunizar, que fue llamado componente "T". El aumento de este durante los esquemas de inmunización estaba relacionado con el aumento de la potencia neutralizante contra la toxina tetánica, y se observaba su aparición hasta nueve semanas después de iniciado el esquema (Scheer J. Van Der, 1941). Mediante estudios inmunoeléctroforéticos posteriores, se identificó que este componente era una de las varias subclases o isotipos de la clase IgG en el equino, que son IgGa, IgGb, IgGc, IgG(B) y el componente T ahora llamado IgG(T) (B. Wagner, 2006). De estas, se ha observado que la IgG(T), con diferencias en la glicosilación en las cadenas pesadas gamma que le resultan en diferentes propiedades inmunogénicas y electroforéticas. Se ha observado mayor efectividad de esta subclase para disminuir la letalidad de venenos de vipéridos y en neutralización efectiva de lesiones como la dermonecrosis, hemorragias y manifestaciones como el dolor causadas por venenos de araña del género *Loxosceles*. (Fernandes, Tavares, & Sano-martins, 2000; Fernandes, Takehara, & Mota, 1991; Lewis, Wagner, & Woof, 2008; Toro et al., 2006).

Las subclases de inmunoglobulina G mencionadas han sido relacionadas con los correspondientes genes de la región constante de cadenas pesadas gamma (IGHG), siendo la IgG(T) codificada por dos de los siete genes diferentes, IGHG3 y IGHG5 (B. Wagner et al., 2004).

## **1.5 Situación de los antivenenos en el continente africano y en el medio oriente**

El estudio de la prevalencia e incidencia del accidente ofídico en el continente africano se dificulta debido a las deficiencias de los sistemas de salud que no permiten tener un estimado correcto de los casos (Kasturiratne et al., 2008). Además, se considera que entre 20-70% de las víctimas en algunas regiones no llegan a los hospitales y son tratados con métodos tradicionales totalmente inefectivos, lo que resulta en una subestimación del número verdadero de casos (Brown, 2012).

Las mejoras necesarias en la tecnología para la fabricación de antivenenos, la falta de una demanda constante y la competencia con productos sin las especificaciones necesarias lleva a un aumento de precios en los antivenenos (Stock et al., 2007; Williams et al., 2011). Este aumento de precio provoca que los gobiernos de países africanos disminuyan o en el peor de los casos cancelen la compra de los productos generando un suministro limitado y la desatención de muchos casos recibidos en los sistemas de salud. Los casos desatendidos por falta de antivenenos y la falta de personal capacitado provocan que la población pierda confianza en el tratamiento hospitalario y busquen tratamientos tradicionales que son totalmente inefectivos. Esta falta de confianza genera disminución en la demanda y menor rentabilidad en la producción, lo que lleva a las empresas farmacéuticas a disminuir su producción (lo que encarece más el precio de cada vial) o incluso a eliminarla (Stock et al., 2007).



**Figura 5. Círculo vicioso de la producción y distribución de antivenenos en el continente africano.** Modificado de (Stock et al., 2007)

En la década de 1970 existían tres grandes fabricantes de antiveneno que proveían al continente africano: Instituto Pasteur con “Ipser Afrique” contra especies de los géneros *Bitis*, *Echis*, *Naja*, *Dendroaspis*. Behringwerke con “North Africa” contra *Cerastes*, *Bitis*, *Naja*, y *Echis* y “Central Africa” contra *Cerastes*, *Bitis*, *Naja*, *Hemachatus* y *Dendroaspis*. SAIMR con antivenenos polivalentes y monovalente contra *Echis* (Williams et al., 2011).

Este ciclo vicioso (**Figura 5**) en la producción y distribución de antivenenos ha provocado el retiro de dos de estos principales productores. En la década de 1980 Behringwerke cesa la producción de antivenenos, el aumento en la fatalidad del accidente ofídico no fue documentada de manera consistente debido a las deficiencias en los sistemas de salud (Williams et al., 2011). Para la década de los 2000 se alcanzó una producción de trescientos mil viales para el continente, sin embargo, 90% de estos eran productos originarios de la India de bajo costo y de efectividad dudosa (ASNA-C y VINS PanAfrican). En 2014 Sanofi-Pasteur dejó de producir “Fav-Afrique” debido a la baja demanda al competir con estos productos de menor costo. “Fav-Afrique” había resultado inaccesible para la mayoría de la población y los gobiernos desde la implementación de mejoras tecnológicas que, paradójicamente, le conferían buenos resultados en pruebas clínicas (*How Sanofi Slithered*

*Its Way out of the Neglected Antivenom Market | Médecins Sans Frontières Access Campaign*, n.d.; Williams et al., 2011). “Fav-Afrique” era el producto que presentaba mayor efectividad contra un amplio rango de especies. El vencimiento de los últimos viales en 2016 agudizó la crisis en África. (WHO / WHO Working Group on Snakebite Envenoming, 2017; Williams et al., 2011).

El retiro de Sanofi-Pasteur afectó también a la región MENA que contaba con el producto “Favirept” que cubría los accidentes de especies con importancia epidemiológica de la región como como *Cerastes cerastes*, *Echis leucogaster*, *Daboia deserti* y *Naja haje* (*Acquisition of Sanofi Pasteur’s Equine Antivenom Immunoglobulin Products | Flynn Pharma*, n.d.). En esta región existen alrededor de 65 millones de personas debajo del nivel de pobreza y vulnerables a las NTD’s (Hotez et al., 2012), de las cuáles el accidente ofídico es de las más frecuentes y graves (J. Chippaux, 2017).

Revertir la situación actual del suministro de antivenenos en el continente Africano depende de la reducción de precios de los tratamientos como parte central de la estrategia. Para lograrlo, autores como Brown (Brown, 2012) y Williams (Gutiérrez et al., 2010) proponen los siguientes ejes principales: a) Hacer visible el problema mediante cifras exactas de la magnitud del accidente ofídico, b) la intervención de organismos gubernamentales y ONG’s para subsidiar la compra y la distribución de estos fármacos. y c) Fabricación de antivenenos polivalentes con estudios suficientes de eficacia y seguridad y para grandes regiones del continente

El conocimiento exacto de la magnitud del problema permitirá establecer una demanda confiable y los subsidios serán un impulso inicial que favorecerá la disponibilidad de antivenenos en todo el continente. Esto creará un ambiente de rentabilidad que permitirá a las farmacéuticas utilizar al máximo su capacidad de producción y en consecuencia disminuir el costo individual de cada tratamiento (Brown, 2012).

La fabricación de antivenenos polivalentes para las grandes regiones del continente, así como su cuidadosa regulación y el aseguramiento de su eficacia permitirá que la confianza de los prestadores de servicios y de la población aumente, lo que estabilizará la demanda y representará otro factor para la disminución de los precios (Stock et al., 2007).

En este tercer punto es esencial la participación de múltiples laboratorios internacionales públicos y privados en la elaboración de antivenenos “redundantes” para una misma región. Esto además de establecer la competencia permitirá evitar la dependencia del suministro de solo uno o dos fabricantes principales (Gutierrez, 2019).

Como respuesta a esta necesidad surgen antivenenos como INOSERP MENA de Inosan Pharma, que cubre los accidentes ofídicos del norte del continente africano y del Medio oriente.

Para obtener el plasma hiperinmune para la fabricación de este antiveneno se utiliza el siguiente protocolo de inmunización (**Tabla 1**) en dos diferentes grupos de caballos:

**Tabla 1. Esquema base de inmunización de caballos para obtención de suero hiperinmune**

<b>No. Inmunización</b>	<b>Semana</b>	<b>Veneno por caballo (µg)</b>	<b>Adyuvante</b>
<b>1</b>	0	100	IFA*
<b>2</b>	1	100	IFA
<b>3</b>	3	250	ALUM*
<b>4</b>	5	500	IFA
<b>5</b>	7	1000	ALUM
<b>6</b>	9	2000	-
<b>7</b>	11	3000	IFA
<b>8</b>	13	5000	ALUM
<b>9</b>	15	7500	-
<b>10</b>	17	10000	IFA
<b>11</b>	19	10000	ALUM

IFA=Adyuvante Incompleto de Freund. ALUM= Hidróxido de aluminio (40µg/ml) e hidróxido de magnesio (40 µg/ml)

Para obtener el suero hiperinmune, se inmunizan dos grupos de cuatro caballos, uno se inmuniza con venenos de vipéridos (Grupo AVN) y otro con veneno de elápidos (Grupo AEN) (**Tabla 2**). Con esto se pretende obtener una sinergia en la respuesta a las proteínas del veneno al inyectar en un mismo animal venenos con la mayor similitud posible al provenir de especies de la misma familia.

**Tabla 2. Mezcla de venenos utilizados en el esquema de inmunización**

Vipéridos (grupo AVN)		Elápidos (grupo AEN)	
Especie	%	Especie	%
<i>Bitis arietans</i>	4	<i>Naja pallida</i>	50
<i>Cerastes cerastes</i> (Egipto)	2	<i>Naja haje</i> (Egipto)	14
<i>Cerastes cerastes</i> (Túnez)	2	<i>N. haje</i> (Marruecos)	12
<i>Cerastes vipera</i>	2	<i>Walterinnesia aegyptia</i>	24
<i>Cerastes gasperetti</i>	2		
<i>Echis leucogaster</i>	10		
<i>Echis pyramidum</i>	10		
<i>Echis coloratus</i>	10		
<i>Echis carinatus</i>	10		
<i>Vipera palestinae</i>	12		
<i>Macrovipera deserti</i>	12		
<i>Macrovipera xanthina</i>	8		
<i>Macrovipera levetina obtusa</i>	8		
<i>Macrovipera l. turánica</i>	5		
<i>Macrovipera mauritanica</i>	5		

Las mezclas de venenos utilizados resultan en una mezcla compleja de antígenos con la cual se pretende obtener un antiveneno eficaz contra las especies con importancia médica de la región. Para asegurar que el resultado final sea un antiveneno con la eficacia y especificidad

adecuadas, es necesario llevar a cabo pruebas *in vitro* e *in vivo* que evalúen la respuesta inmune de los caballos ante esta amplia variedad de venenos.

Sin embargo, debido a que los esquemas de inmunización han sido planteados de manera empírica, no se ha caracterizado la evolución del sistema inmune humoral en caballos de producción ante una mezcla tan compleja de moléculas. Hasta el día de hoy, se han realizado los siguientes estudios sobre el sistema inmune humoral bajo estimulación de esquemas complejos:

- **Medina Bahena, 2013.** Neutralización y títulos de IgG suero de cuatro caballos inmunizados con veneno de *Bothrops asper* y *Crotalus simus*.
- **Calderón 2011.** Reactividad cruzada en títulos de IgG y neutralización de suero de tres caballos inmunizados con *Micrurus tener* contra *Micrurus fulvius* y *Micrurus nigrocinctus*.
- **De la Rosa 2011.** Títulos de IgG y potencia neutralizante de caballos inmunizados con una mezcla de venenos de vipéridos y elápidos sometidos a radiación gamma. Los títulos fueron medidos contra la mezcla de venenos.
- **Casasola 2007.** Títulos y neutralización de suero de caballos inmunizados con *Naja melaleuca* contra ese mismo veneno y contra otros del género *Naja*.

Caracterizar parámetros como los títulos de anticuerpos y potencia neutralizante a lo largo y al final del esquema de inmunización, permitiría optimizarlos y contribuir a la disminución de los costos de producción, impactando directamente al problema de escases en países en desarrollo (A. R. De Roodt et al., 2004; Medina Bahena, 2013; Ramos-Cerrillo et al., 2008).

## 2 Objetivo general

Caracterizar la respuesta inmune humoral de dos grupos de caballos sometidos a un esquema de hiperinmunización con mezclas complejas de venenos de serpientes del norte de África y Medio Oriente.

### 2.1 Objetivos particulares

1. Estudiar las diferencias en la respuesta inmune humoral de cada uno de los caballos.
2. Estudiar el desarrollo de diferentes isotipos de anticuerpos y de la subclase IgG(T) en ambos grupos de caballos a lo largo del esquema de inmunización.
3. Determinar el avance en la capacidad neutralizante y en el reconocimiento de las distintas fracciones de veneno

## 3 Justificación

Se necesita de un panorama completo de la respuesta inmune humoral de los caballos ante la estimulación con mezclas complejas de venenos para determinar si esta estrategia es adecuada para producir los antivenenos tan necesarios contra las especies de vipéridos y elápidos con importancia médica de la región MENA. Trabajos previos sobre la evolución de la respuesta inmune de caballos productores de suero hiperinmune han estudiado solamente la respuesta dependiente de una clase de inmunoglobulinas (IgG) y solo ante estímulos antigénicos simples que constan de uno o dos venenos.

Este trabajo estudia los títulos de diferentes clases de inmunoglobulinas e incluso la subclase IgG(T) en el suero de diferentes momentos del esquema de inmunización con una mezcla compleja de venenos. Esto permitirá entender el desarrollo de procesos importantes como el cambio de clase y la maduración de la afinidad en el contexto de una hiperinmunización, así como determinar la importancia de la subclase IgG(T), exclusiva del caballo, en la neutralización de los venenos

El estudio de la evolución de la respuesta inmune conforme avanza el esquema y su relación con las propiedades funcionales del suero hiperinmune como la potencia neutralizante y el reconocimiento de las familias proteicas más importantes brinda información objetiva para mantener o hacer modificaciones al esquema de inmunización utilizado actualmente.

El reconocimiento de las diferentes familias proteicas por parte del suero hiperinmune y su relación con la potencia neutralizante brinda información sobre las moléculas más importantes en la letalidad de los venenos de algunos vipéridos y los cuatro elápidos incluidos en el antiveneno.

Además, se estudia la respuesta inmune de los caballos ante múltiples antígenos. Esto es útil incluso en contextos diferentes a la fabricación de antivenenos como la medicina preventiva equina y la vacunología en esta especie.

#### 4. Hipótesis

A pesar de emplear una mezcla compleja de venenos para hiperinmunizar, se generará una maduración de la respuesta inmune humoral de manera progresiva a lo largo del esquema de inmunización que resultará en sueros con títulos altos y neutralización adecuada contra los venenos más importantes.

#### 5. Materiales

##### 5.1 Venenos

El proveedor de los venenos de la **Tabla 3** fue Latoxan. Se utilizaron 15 mg en peso seco de cada uno y se diluyeron en 3 ml de PBS para llegar a una concentración de 5 mg/ml. Se dividieron en alícuotas de 200 µl las cuáles fueron guardadas a -20°C hasta su utilización.

**Tabla 3. Venenos utilizados en las pruebas In vitro e In vivo.**

<b>Veneno</b>	<b>No. Lote*</b>
<i>Naja haje (Egypt)</i>	822.090
<i>Naja pallida (Kenia)</i>	302.070
<i>Walterinnesia</i>	
<i>aegyptya</i>	729.030
<i>Bitis arietans</i>	613.090
<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	106.011
<i>Echis pyramidum</i>	523.070
<i>Cerastes cerastes</i>	201.100

\*Latoxan, Valance, Francia

## **5.2 Sueros equinos**

Los animales inmunizados eran de raza criolla, machos castrados, de alrededor de 400 kg de peso, cuyos cuidados y bienestar se aseguró siguiendo los lineamientos de la organización mundial de la salud para la producción de plasma equino hiperinmune (WHO, 2016) Se recibieron sueros equinos de cada una de las fechas del esquema de inmunización (**Tablas 1 y 2**) además de 3 fechas adicionales de las semanas 21, 28 y 31 del grupo AVN y 23, 26 y 30 del grupo AEN. Las fechas adicionales corresponden a la fase de producción del suero hiperinmune y se obtenían 10 días después de las inmunizaciones de refuerzo realizadas cada mes con 15 mg de la mezcla de venenos por caballo.

Todos los sueros fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  desde su obtención y fueron descongelados para formar alícuotas de 2 ml de cada caballo individual. Además se hizo una mezcla del suero de los 4 caballos del grupo AVN (pool AVN) y una de los cuatro del grupo AEN (pool AEN) de cada una de las fechas de inmunización.

## **5.3 Sueros de conejo**

Los sueros de conejo a partir de los cuales se purificaron inmunoglobulinas anti IgG y anti IgG(T) equinas fueron obtenidos del suero de animales que fueron sometidos al esquema de inmunización de la **Tabla 4** con estándares de inmunoglobulinas purificadas.

## **5.4 Estándares de las subclases de IgG**

Los estándares de las subclases de inmunoglobulina G fueron donados por la Dra. Hilda Vázquez López, quien precipitó con ácido caprílico las inmunoglobulinas del suero de caballos hiperinmunizados y posteriormente separó las subclases mediante un sistema cromatográfico de baja presión (FPLC). Uno de los estándares correspondía a IgG(T) sin el resto de las subclases (IgGa, IgGb, IgGc e IgG(B)), otro a todas las subclases menos IgG(T) y un tercero contenía todas las subclases de IgG. Estos estándares serán nombrados a partir de ahora simplemente como IgG(T), IgG e IgG+IgG(T), respectivamente.

**Tabla 4. Esquema de inmunización de conejos con IgG's equinas.**

No. inmunización	Día	Dosis (µg/conejo)	Adyuvante
1	0	500	IFA*
2	7	500	ALUM*
3	14	500	-
4	21	500	IFA
5	28	500	ALUM
6	35	500	-
7	42	500	IFA
8	49	500	ALUM
9	56	1000	IFA
10	63	1000	ALUM
70 (sangrado)			

### **6. Métodos 6.1. Determinación de títulos de IgG's en el suero de caballos individuales y en el pool.**

La determinación de los títulos de cada uno de los sueros obtenidos a lo largo de todo el esquema de inmunización se llevó a cabo por medio de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA). Se midieron los títulos de anticuerpos contra los venenos de los vipéridos *Cerastes cerastes*, *Echis pyramidum*, *Bitis arietans* y *Macrovipera lebetina obtusa*, y los elápidos *Naja haje*, *Naja pallida* y *Walterinesia aegyptia*.

#### **6.1.2 Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA)**

Se cubrieron los 96 pozos de las placas Maxisorp (Nunc Inc, USA) con 100 µl de una solución a 5 µg/ml de veneno en buffer de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 9.5, se incubó por una hora a 37°C. Después se lavaron las placas con 250 µl/pozo de solución de lavado (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20, pH 8) utilizando el sistema automatizado de lavado de microplacas (BIORAD, modelo 1575). El bloqueo se realizó con 200 µl/pozo de una solución 50 mM de Tris-HCl pH 8 con 0.5% de gelatina, 0.2% de tween 20 que se incubó por 2 h a 37°C. Las placas fueron lavadas tres veces más como fue descrito anteriormente. Los sueros equinos fueron mezclados con buffer vehículo o de reacción (50 mM de Tris-HCl pH 8, 0.5 M de NaCl, 0.1% de gelatina y 0.05% de tween 20) en una dilución 1:10 que fue a su vez diluída 10 veces de manera triple seriada en los pozos de la

placa con el buffer de reacción. Se incubaron las placas por una hora a 37°C y se lavaron otras tres veces. Después se vertieron 100 µl/pozo de una solución 1:3000 de un anticuerpo comercial cabra anti IgG equina (Goat anti-horse IgG HRP conjugated, Genetex) diluído en buffer vehículo y se incubaron las placas por una hora a 37°C. Después de 5 lavados se revelaron las placas con 100 µl/pozo de una solución de ABTS en buffer de citratos (70 mM de Citrato-fosfato pH 4.2) a 0.3 mg/ml y peróxido de hidrógeno que se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 25 µl/pozo de dodecil sulfato de sodio al 20%. Las absorbancias fueron medidas a 405 nm en un lector de placas (Marca Tecan, modelo sunrise). Los datos fueron procesados con el programa Graphpad Prism 6 por medio de una curva dosis-respuesta y regresión no lineal para calcular la EC50 (dilución a la cual se observó la mitad de la absorbancia máxima), la cual fue designada como el título.

## **6.2. Determinación de títulos de las subclases de IgG**

La cuantificación se llevó a cabo por medio de ELISA indirecto utilizando como segundo anticuerpo inmunoglobulinas de conejo específicas para IgG(T) y otro lote específico para IgG sin el componente IgG(T). Estas inmunoglobulinas fueron obtenidas a partir de la inmunopurificación de suero de conejos inmunizados con IgG's equinas. El proceso de inmunopurificación y la evaluación de los anticuerpos resultantes se detalla a continuación.

### **6.2.1. Preparación de las fases estacionarias para cromatografía por afinidad.**

Se utilizaron 0.7g de resina sepharosa 4BCnBr (GE Healthcare Life Sciences, aproximadamente 1mL de resina hidratada) para cada una de las dos fases a prepararse.

Se rehidrataron cada una de las resinas en 10 ml de solución HCl 1 mM y se dejaron en el agitador orbital por una hora, al término de la incubación se recuperó la resina filtrando en un filtro de papel Whatmann, se les agregaron 7 mg del estándar de IgG o bien 7 mg del estándar de IgG(T) en 10 ml de solución NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador orbital. Al término de la incubación se obtuvo 1 ml de cada muestra, se centrifugó por 2 minutos a 14000 revoluciones/minuto y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Esta se dividió sobre el coeficiente de extinción para las inmunoglobulinas (1.4) para obtener la concentración y el total de proteína presente.

### Resina-IgG

$$Abs_{280} 0.031 \rightarrow \frac{0.031}{1.4} = 0.022 \frac{mg}{ml} \times 12 ml = 0.26 mg$$

0.26 mg de inmunoglobulinas no acopladas y 6.73 mg de IgG acopladas a Sefarosa (96.14%)

### Resina- IgG(T)

$$Abs_{280} 0.069 \rightarrow \frac{0.069}{1.4} = 0.049 \frac{mg}{ml} \times 12 ml = 0.59 mg$$

0.59 mg de inmunoglobulinas no acopladas y 6.40 mg acopladas a Sefarosa (91.5%)

Finalmente, se concluyó el pegado de inmunoglobulinas equilibrando con 10 ml de Tris-HCl 25 mM pH 8.5.

### **5.2.2.-Purificación por cromatografía por afinidad.**

Con las dos fases estacionarias preparadas, se realizó una doble inmunopurificación. Uno de los volúmenes de suero fue pasado primero por la columna Sph-IgG, y el volumen eluido fue pasado después por la columna Sph-IgG(T), el volumen no pegado resultó en anticuerpos con especificidad  $\alpha$ IgG. Para el otro volumen se cambió el orden de las columnas (primero Sph-IgG(T) y luego Sph-IgG) y se obtuvieron anticuerpos con especificidad  $\alpha$ IgG(T).

La purificación por cromatografía de afinidad en las columnas de sepharosa se llevó a cabo de la siguiente manera:

La muestra de suero se eluyó en volúmenes de 10 ml, cada uno de los cuales fue inyectado en la columna dos veces y recuperado después de su paso por la columna, el material no adherido a la resina lo denominamos No pegado.

Se agregaron 10 ml de buffer de lavado (Tris HCl 25mM pH 8.5), las primeras gotas que salieron de la columna se colectaron con el no pegado del paso anterior y el resto del volumen fue guardado, a este material lo llamamos lavado.

Los anticuerpos adheridos se eluyeron con una solución de elución (Ácido acético 100 mM, el volumen fue recolectado inmediatamente en tubos eppendorf de 1.5 ml que con 200  $\mu$ l de TRIS-HCL 1M para amortiguar el pH de la elución y evitar daño sobre las inmunoglobulinas. Se recolectaron 20 fracciones y se midió la  $Abs_{280}$  de todas ellas. Se conservaron solo las que tuvieran una absorbancia mayor a 0.3 (pegado)

Al final de la elución se amortigua el pH de la resina con 5 ml de TRIS-HCl 1M y después se reequilibra con 10 ml de Tris-HCl 25 mM.

Los anticuerpos purificados fueron dializados con una membrana del No.1 MWCO: 6-8 kD en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8.5 y conservado con Azida de sodio al 0.05% a 4°C hasta su utilización.

### **5.2.3. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos purificados.**

Se evaluó la especificidad con Western blot y con ELISA, cuyos procedimientos se detallan a continuación.

#### *SDS PAGE*

Se realizó el procedimiento en condiciones desnaturalizantes a los estándares de IgG, IgG(T) e IgG+IgG(T) para separar las cadenas pesadas y ligeras y evaluar el reconocimiento de los anticuerpos purificados hacia estos.

El gel de SDS PAGE al 12.5% se corrió en Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell Bio-Rad™. En diferentes carriles se cargaron el marcador de peso molecular (Bio Rad Precision Plus Protein Dual Xtra) y 2 µg de los estándares de IgG, IgG(T) e IgG + IgG(T) mezclados con buffer de muestra desnaturalizante 2x (10% glicerol + 2.5% SDS + 50mM Tris HCl pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.02% de azul de bromofenol) y las muestras se desnaturalizaron con agua hirviendo en baño maría durante 6 minutos. La corrida se llevó a cabo con 80 mV por 20 minutos y 120 mV por 80 minutos. La tinción del gel se llevó a cabo con Solución de tinción con azul de Coomasie (25% Isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% azul de Coomasie R250), para desteñir se utilizó la solución de desteñido (10% Metanol + 10% ácido acético),

#### *Western Blot*

Las proteínas que se separaron por medio de un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µM HATF, Millipore) utilizando un Sistema de electrotransferencia semiseco (Thermo Scientific™) con corriente constante 400 mAmps durante 1 hora, con buffer de transferencia 39 mM glicina, 48 mM Tris, 0.037% SDS y 20% metanol). La membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche (Svelty) en TBST 1x (1M Tris-HCl pH 7.5, 5M de NaCl y 0.2% de tween 20) + 5 gr de leche Svelty® durante toda la noche a 4°C. Se incubaron 100 µg de los anticuerpos purificados αIgG y a la otra la

misma cantidad de  $\alpha$ IgG(T) en la etapa del bloqueo. Se descartó la solución de bloqueo más anticuerpo y se hicieron 3 lavados de 10 minutos en TBST. La incubación del segundo anticuerpo se realizó colocando las membranas en 10 ml de una solución de anticuerpo cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen) diluido 1:2000 en TBS. Se descartó la solución y se hicieron 3 lavados de 10 minutos en TBST.

Para el revelado se preparó una solución con BCIP y NBT1 (sigma aldrich) que funciona como sustrato de la fosfatasa alcalina; 1 ml de BCIP y 1 ml de NBT1 aforado a 10 ml con agua destilada.

Se descartó la solución y se hicieron 3 lavados de 10 minutos en TBST y se agregaron 5 ml de la solución de revelado, se mantuvo en agitación hasta que se hizo evidente una marca oscura sobre las bandas de proteínas. En ese momento se detiene la reacción decantando la solución de revelado y agregando 100  $\mu$ l de EDTA.

#### *ELISA para evaluar la especificidad de los anticuerpos purificados*

Se sensibilizó una placa con el estándar de IgG y el estándar de IgG(T), ambas a 5  $\mu$ g/ml. Las inmunoglobulinas de conejo purificadas se colocaron en la primera columna a una concentración de 10  $\mu$ g/ml y se realizaron diluciones doble seriadas hasta la columna 11.

Como anticuerpo secundario se utilizó Goat  $\alpha$ rabbit-HRP conjugated (thermofisher scientific) en una dilución 1:2000.

#### **5.2.4. ELISA para determinar los títulos de IgG e IgG(T)**

Debido a la especificidad demostrada por el western Blot y ELISA (apartado 6.2.2), se utilizaron los anticuerpos para llevar a cabo un ensayo con las siguientes características con los pools de suero de ambos grupos:

Se sensibilizó con veneno de *Cerastes cerastes* para probar los sueros del grupo AVN y con veneno de *Naja pallida* para el grupo de los elápidos. Se utilizó una solución de cada veneno a 5  $\mu$ g/ml en buffer de carbonatos, se incubó por una hora a 37°C. Después se lavaron las placas con 250  $\mu$ l/pozo de solución de lavado (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20, pH 8), utilizando el sistema automatizado de lavado de microplacas. El bloqueo se realizó con 200  $\mu$ l/pozo de una solución 50 mM de Tris-HCl pH 8 con 0.5% de gelatina, 0.2% de tween 20 que se incubó por 2 h a 37°C. Se lavaron las placas con solución de lavado. La

incubación de los sueros de caballo se hizo dilución 1:10 para continuar con diluciones triple seriadas hasta la fila número 11, dejando la 12 como blanco, se incubó por una hora a 37°C. Después se lavaron las placas. La incubación con el segundo anticuerpo se realizó con los anticuerpos de conejo inmunopurificados por el proceso descrito anteriormente (6.2.2), según el caso, se utilizaron 100µl de una dilución de αIgG o αIgG(T) a 5 µg/ml en buffer vehículo para cada uno de los 96 pozos de la placa, se incubó por una hora a 37°C. Después se lavaron las placas. Incubación de anticuerpo conjugado, se utilizó anticuerpo cabra α IgG de conejo conjugado con HRP (thermofisher scientific) a una dilución de 1:2000. Al termino de la incubación se lavaron las placas y se revelaron utilizando ABTS disuelto en buffer para ABTS a una concentración de 0.3 mg/ml, más peróxido de hidrógeno. Se vertieron 100 µl de la solución en cada uno de los pozos y se dejó correr la reacción por 10 minutos. Se detuvo con 25 µl dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%.

Los datos de absorbancia de cada una de las diluciones fueron procesados por medio del programa Graphpad Prism 6. Se utilizó un modelo de curva Dosis respuesta y regresión no lineal para calcular la EC50 (dilución a la cual se observó la mitad de la absorbancia máxima), la cual fue designada como el título.

### **5.3 Determinación de títulos de IgM**

Se sensibilizó con una solución a 5 µg/ml de veneno de *Cerastes cerastes* para cuantificar los títulos del suero de los caballos del grupo AVN y de *N. pallida* para el grupo AEN, se incubó por una hora a 37°C. Después se lavaron las placas con 250 µl/pozo de solución de lavado (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20, pH 8), utilizando el sistema automatizado de lavado de microplacas. El bloqueo se realizó con 200 µl/pozo de una solución 50 mM de Tris-HCl pH 8 con 0.5% de gelatina, 0.2% de tween 20 que se incubó por 2 h a 37°C. Se lavaron las placas con solución de lavado.

La incubación con los sueros de caballo se realizó utilizando pools de suero de cada una de las fechas disponibles. Se comenzó con una dilución 1:10 para continuar con diluciones triple seriadas hasta la columna 11, dejando la 12 como blanco, y se incubó por una hora a 37°C. Después se lavaron las placas con 250 µl/pozo de solución de lavado. La incubación con el segundo anticuerpo, se utilizó un anticuerpo comercial αIgM hecho en cabra (KPL) a 2

$\mu\text{g/ml}$ , y se incubó por una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después se lavaron las placas con  $250\ \mu\text{l/pozo}$  de solución de lavado. Incubación de anticuerpo conjugado, el anticuerpo utilizado fue un  $\alpha\text{IgG}$  de cabra hecho en conejo conjugado con HRP (thermofisher scientific) a una dilución de 1:2000. Al término de la incubación se lavaron las placas y se revelaron utilizando ABTS disuelto en buffer para ABTS a una concentración de  $0.3\ \text{mg/ml}$ , más peróxido de hidrógeno. Se vertieron  $100\ \mu\text{l}$  de la solución en cada uno de los pozos y se dejó correr la reacción por 10 minutos. Se detuvo con  $25\ \mu\text{l}$  dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%.

Los datos de absorbancia de cada una de las diluciones fueron procesados por medio del programa Graphpad Prism 6. Se utilizó un modelo de curva Dosis respuesta y regresión no lineal para calcular la  $\text{EC}_{50}$  (dilución a la cual se observó la mitad de la absorbancia máxima), la cual fue designada como el título.

#### **5.4 Avance del reconocimiento de las diferentes fracciones de veneno.**

Para evaluar el avance en el reconocimiento de las distintas fracciones de veneno de los sueros a lo largo del esquema de inmunización se utilizó Western Blot con transferencia de proteínas semiseca semiseco, descrito en la sección 5.2.3. Se realizó un gel de referencia con los componentes de los tres venenos de elápidos y cuatro de los vipéridos (*Macrovipera lebetina obtusa*, *Cerastes cerastes*, *Bitis arietans* y *Echis pyramidum*) según su peso molecular. Se utilizaron  $20\ \mu\text{g}$  de veneno completo por carril diluidos en buffer de muestra desnaturizante 2x. Se cargaron  $20\ \mu\text{l}$  de la muestra en cada uno de los carriles reservando el primero para el Marcador de peso molecular (Bio Rad Precision Plus Protein Dual Xtra) y se corrió 20 min a 80 mV y 80 min a 120 mV. La tinción de este gel se llevó a cabo con solución de azul de Coomassie.

Se realizó un gel para cada fecha a evaluar con  $2\ \mu\text{g}$  de veneno por carril y  $2\ \mu\text{l}$  de marcador de peso molecular. El suero de caballo de las semanas 0,1,3,5,9,11,15 y 21 se utilizó a una dilución 1:500 y como anticuerpo secundario se utilizó Goat  $\alpha$  horse AP conjugated (Jackson immunoresearch) a una dilución 1:1000. La transferencia, el bloqueo y los lavados se realizaron igual que el procedimiento de western descrito anteriormente.

## 5.5 Determinación de la DE<sub>50</sub>

La DE<sub>50</sub> se define como la dosis de suero que incubada con 3 DL<sub>50</sub> (Dosis letal 50%) de veneno, es necesaria para que sobreviva la mitad de una población de animales. Para los ensayos se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa CD-1 (Harlan Sprague Dawley Inc.), con una edad de entre 4 y 6 semanas y peso entre 18 y 20 g. El protocolo experimental presentado a continuación fue aprobado por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología, UNAM, en Cuernavaca, Morelos, México (372 ESTUDIO DE VENENOS Y ANTIVENENOS).

Se utilizaron 3 ratones por dosis de suero a probar. La solución para un grupo se preparó con el volumen de veneno correspondiente a 9 DL<sub>50</sub> (3 por ratón) y 3 dosis del suero a probar y se aforó a 1500 µl con una solución isotónica 150 mM de NaCl. La solución se incubó durante 30 min a 37°C.

A cada ratón se le inocularon 500 µl de la solución por vía IV en la vena caudal con una jeringa de 3 ml y aguja calibre 25. El porcentaje de supervivencia del grupo expuesto se registró a las 12 horas. El porcentaje de todos los grupos retados con diferentes dosis de suero fue compilado y analizado mediante regresión sigmoide de cuatro parámetros con el software Prism GraphPad para obtener la DE<sub>50</sub> (A. R. De Roodt et al., 2004).

Los animales fueron observados de manera continua durante cuatro horas posterior a la inoculación y a las 6, 8 y 10 horas para retirar de las jaulas a los muertos y para someter a eutanasia por medio de sobredosis de CO<sub>2</sub> a los que mostraran signos de envenenamiento irreversibles. Esta medida fue tomada con el fin de disminuir lo mayor posible la magnitud y el tiempo de sufrimiento de los animales experimentales.

Los signos determinantes para decidir aplicar la eutanasia previa a las 12 horas fueron taquipnea con un patrón abdominal de respiración junto con un estado de conciencia estuporoso con respuesta nula a estímulos externos.

La reducción del número de animales experimentales utilizados se logró al planear los grupos experimentales en función del resultado anterior, con el fin de no redundar o llevar a cabo experimentos innecesarios.

Las DL<sub>50</sub> utilizadas para 6 de las especies utilizadas para este apartado (**Tabla 5**) habían sido determinadas previamente en el laboratorio por Irving Archundia, a excepción de *E. pyramydum*.

**Tabla 5. Dosis letales DL<sub>50</sub> en ratón de los venenos utilizados para los ensayos de DE<sub>50</sub>**

<b>Veneno</b>	<b>DL<sub>50</sub> µg/ratón</b>
<i>Naja haje (Egypt)</i>	0.91
<i>Naja pallida (Kenia)</i>	15.4
<i>Walterinnesia aegyptya</i>	4.965
<i>Bitis arietans</i>	10.14
<i>Echis pyramidum</i>	39.49*
<i>Cerastes cerastes</i>	9.24

. \*DL<sub>50</sub> determinada específicamente para este trabajo.

### **5.6 Purificación de Inmunoglobulinas del suero**

Se realizó la precipitación de los componentes del suero con ácido caprílico con un procedimiento previamente descrito (Rojas et al., 1994). Se purificaron las inmunoglobulinas de las últimas fechas disponibles de cada uno de los grupos: la semana 60 en el caso del grupo AVN y la semana 58 para el grupo AEN.

Para cada caso, se tomaron 20 ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 rpm para separar los residuos presentes en el suero. El suero clarificado se ajustó a pH 5 con ácido acético 0.1 M y posteriormente se adicionó ácido caprílico (Sigma Aldrich) hasta un porcentaje v/v de 5% a una velocidad de adición de 1 ml/min en agitación constante. Una vez que se terminó de adicionar se dejó en agitación durante 30 minutos para garantizar una precipitación completa.

Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm y se recuperó el sobrenadante (fracción de inmunoglobulinas). Se dializó con una membrana (Spectra/Por NWCO; 12-14000) en TRIS HCL 25 mm pH 8.5, con tres cambios de dos horas cada uno.

## **5.7 Purificación de las subclases de IgG**

Las inmunoglobulinas G obtenidas a partir de la purificación con ácido caprílico fueron separadas en la porción IgG(T) y en otra correspondiente a las otras subclases (IgGa, IgGb, IgGc e IgG(B)) por medio de cromatografía de intercambio iónico mediante un sistema de cromatografía líquida de baja presión (FPLC) mediante un método previamente descrito (Vázquez et al., 2010).

Como fase estacionaria se utilizó una columna HiPrep Q HP 16/10 (GE Healthcare) para cromatografía de intercambio aniónico con un volumen de columna (VC) de 20 ml. La fase móvil utilizada fue Tris- HCl 25 mM pH 8.5.

La elución de la muestra se realizó con un gradiente lineal de 0 a 0.6 M de NaCl en 3.5 VC con flujo de 2ml/min. El lavado de la columna se realizó llevando el gradiente de NaCl a 100% en 1 VC.

El volumen de la elución fue separado en volúmenes de 2 ml los cuales fueron analizados mediante SDS page para identificar la subclase predominante en cada uno. Las fracciones con mayor pureza fueron colectadas y dializadas en PBS 1x para su posterior utilización en pruebas de neutralización.

El rendimiento de todo el proceso y la concentración de inmunoglobulinas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en cada una de las fases, considerando el coeficiente de extinción molar de 1.4 utilizado para las inmunoglobulinas.

## **5.8 Potencia neutralizante de las subclases de inmunoglobulina G**

La concentración de la fracción de inmunoglobulinas del suero posterior a la precipitación con ácido caprílico permitió calcular la concentración total de IgG en las muestras de la semana 60 del grupo AVN y 58 del grupo AEN.

Una vez conocida esta concentración, se determinó la cantidad en microgramos de Inmunoglobulinas en el volumen correspondiente a las DE<sub>50</sub> de las muestras mencionadas contra *N. pallida* y *C. cerastes*.

El procedimiento para comparar la potencia neutralizante de la fracción constituida por IgG (T) con la de la fracción constituida por el resto de las subclases (IgGa, IgGb, IgGc e IgG(B)) fue el siguiente:

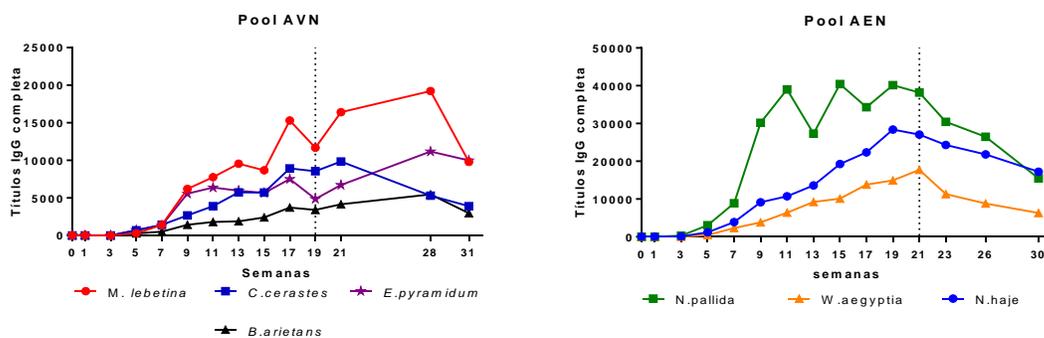
- Se calculó el volumen necesario de la fracción purificada que contuviera tres veces la cantidad de microgramos en el volumen de DE<sub>50</sub> de la fecha correspondiente.
- En los casos en los que el volumen de la fracción purificada era muy cercana o mayor a los 500 µl a inyectar a cada ratón se utilizaron tubos Millipore para concentrar.
- La cantidad de la fracción purificada fue incubada con 3 DL<sub>50</sub> del veneno de *N. pallida* y de *C. cerastes* según el suero a evaluar.
- Con los datos de sobrevivencia observados, se decidió la cantidad de inmunoglobulinas a probar en el siguiente ensayo.

## 6. Resultados

### 6.1. Cuantificación de títulos de IgG en el suero de caballos individuales y en el pool.

#### 6.1.2 Títulos en los pools de suero

La primera evaluación de la respuesta inmune humoral de los caballos se realizó con el pool de los sueros de cada uno de los grupos. El pool AVN se formó con el suero de tres caballos (inmunizados con venenos de vipéridos) debido al retiro de un animal por circunstancias ajenas a este trabajo. El pool AEN se mantuvo con 4 animales (inmunizados con venenos de elápidos). Se midieron los títulos de cada una de las fechas del esquema inicial (21 semanas para el grupo AVN y 23 para el grupo AEN) y 3 fechas posteriores correspondientes a la etapa de producción de suero hiperinmune (Tabla 6).



**Figura 6. Evolución de los títulos de IgG en los pools de suero** La línea punteada vertical indica el final del esquema de inmunización inicial.

**Tabla 6. Títulos de IgG del pool de suero de los caballos AVN**

<b>Pool AVN</b>				
<b>Semanas</b>	<b><i>M. lebetina</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>C. cerastes</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>B. arietans</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>E. pyramidum</i> (C.I.95%)</b>
0	0	0	0	0
1	33 (26-41)	0 (0-0)	39 (33-46)	5 (2-12)
3	8 (4-14)	5 (1-17)	22 (18-27)	16 (7-37)
5	293 (246-348)	690 (481-988)	274 (212-353)	716 (619-828)
7	1415 (1248-1604)	1420 (1076-1874)	512 (488-538)	1365 (1181-1578)
9	6193 (5521-6946)	2687 (2268-3183)	1422 (1365-1481)	5582 (4632-6727)
11	7765 (6277-9607)	3898 (3445-4410)	1810 (1597-2051)	6394 (5339-7655)
13	9556 (8121-11246)	5736 (4953-6642)	1881 (1490-2377)	5967 (4597-7744)
15	8686 (7662-9847)	5722 (4918-6659)	2397 (2144-2679)	5654 (4851-6589)
17	15303 (11249-20815)	8930 (7416-10753)	3724 (3137-4422)	7506 (6153-9156)
19	11683 (9156-14908)	8555 (6589-11109)	3400 (2655-4354)	4872 (4123-5758)
21	16407 (12372-21756)	9838 (8119-11920)	4153 (3632-4750)	6718 (5032-8969)
28	19217 (17578-21009)	5298 (1311-21404)	5464 (4852-6153)	11185 (10151-12327)
31	9810 (8678-11089)	3906 (808-18866)	2976 (2584-3428)	9991 (9164-10891)

**Tabla 7. Títulos de IgG del pool de suero de los caballos del grupo AEN**

<b>Pool AEN</b>			
<b>Semanas</b>	<b><i>Naja pallida</i></b>	<b><i>W. aegyptia</i></b>	<b><i>Naja haje</i></b>
0	0	0	0
1	38 (24-61)	19 (14-26)	44 (37-54)
3	320 (292-349)	21 (11-40)	96 (87-106)
5	3051 (2300-4046)	494 (468-522)	1167 (1079-1263)
7	8885 (5955-13256)	2314 (2078-2578)	3885 (3216-4692)
9	30208 (16419-55578)	3820 (3379-4317)	9144 (7457-11213)
11	39040 (25395-60017)	6399 (5579-7339)	10741 (8583-13442)
13	27304 (18025-41358)	9212 (8562-9910)	13599 (10509-17597)
15	40433 (22560-72469)	10106 (9072-11258)	21240 (15447-42701)
17	34300 (20920-56238)	13823 (12259-15586)	22596 (17080-51865)
19	40127 (24306-66244)	14939 (11981-18629)	21520 (24143-59372)
21	38169 (26567-54837)	17716 (15469-20288)	32332 (26390-49326)
23	30428 (21091-43900)	11298 (9681-13185)	29081 (20865-50355)
26	26477 (19464-36019)	8817 (8087-9612)	15896 (22089-38222)
30	15480 (10777-22237)	6332 (5761-6959)	16380 (16380-32119)

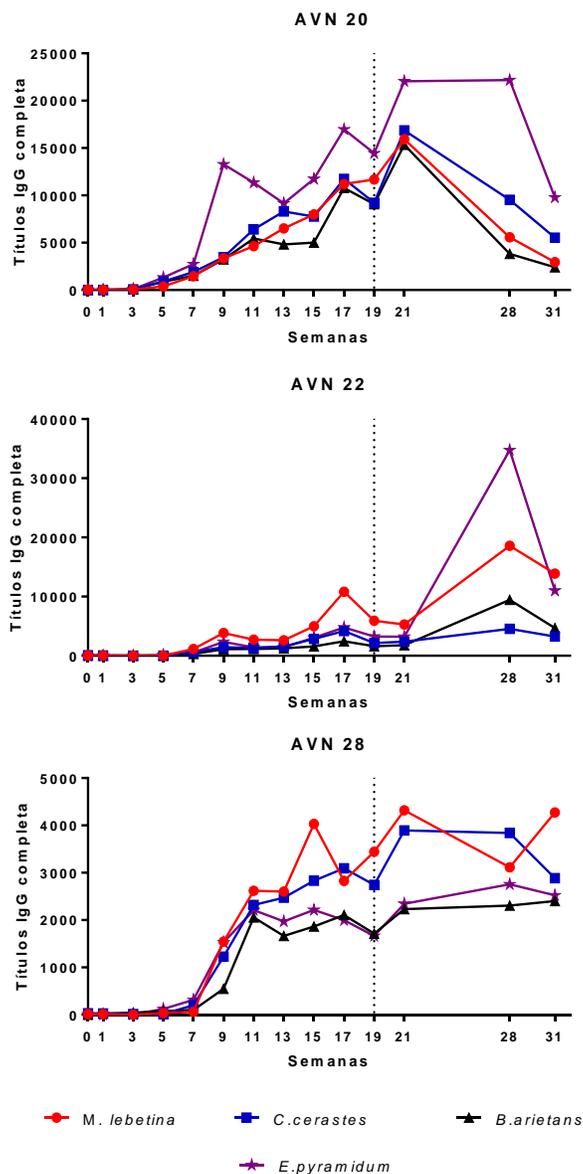
En ambos grupos se observaron títulos importantes a la semana 5 que ascendieron en magnitud hasta la semana 17-19, coincidiendo con la máxima cantidad de veneno inoculada a los caballos. Después de esta fecha los títulos contra *M. lebetina* y *Echis pyramidum*

continuaron aumentando. Mientras que para los dos venenos restantes del grupo AVN y los tres del grupo AEN los títulos disminuyeron después del fin del esquema de inmunización.

Los venenos con mayor inmunogenicidad fueron los de *M.lebetina* y *N.pallida*. En general, el pool AEN alcanzó una magnitud en la respuesta inmune humoral de prácticamente el doble respecto al grupo AVN. (**Tabla 6 y Figura 6**)

### 6.1.3 Títulos de los caballos individuales

En el grupo AVN se evaluaron 3 de los 4 caballos que se encontraban originalmente en este grupo debido al retiro de uno de ellos por circunstancias ajenas a este trabajo.



**Figura 7. Evolución de títulos de IgG en los caballos del grupo AVN.** La línea punteada vertical indica el final del esquema de inmunización inicial.

En los tres caballos se observa una tendencia ascendente en los títulos que acompaña al aumento en la cantidad de veneno dosificado. En el caso del caballo número 20, los títulos

bajan al entrar en la fase de producción (semanas 28 y 31). El caballo 22 mantiene magnitudes similares durante la implementación del esquema pero tiene un aumento significativo en las semanas posteriores sobre todo contra el veneno de *Echis pyramidum* y *Macrovipera lebetina*. Por su parte, el caballo 28 presenta la menor cantidad de títulos pero mantiene una tendencia ascendente hasta la última fecha evaluada. En cuanto a la respuesta hacia los venenos, la única tendencia es la menor respuesta hacia el veneno de *B. arietans*.

**Tabla 8. Títulos de IgG de los caballos del grupo AVN**

<b>AVN 20</b>				
<b>Semanas</b>	<b><i>M.lebetina</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>C. cerastes</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>B.arietans</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>E. pyramidum</i> (C.I.95%)</b>
<b>0</b>	22 (12-41)	17 (11-26)	16 (1-160)	20 (14-29)
<b>1</b>	21 (9-47)	19 (14-26)	26 (6-106)	27 (23-32)
<b>3</b>	45 (36-56)	67 (43-104)	65 (42-100)	86 (82-90)
<b>5</b>	383 (183-804)	912 (637-1307)	879 (758-1018)	1321 (1121-1557)
<b>7</b>	1469 (1132-1907)	1906 (1665-2183)	1518 (1083-2127)	2746 (2672-2822)
<b>9</b>	3341 (3081-3623)	3460 (3236-3700)	3238 (2743-3822)	13274 (11904-14802)
<b>11</b>	4628 (4368-4904)	6398 (5773-7090)	5443 (4598-6445)	11336 (861-14178)
<b>13</b>	6517 (4409-9632)	8303 (6961-9904)	4828 (4276-5451)	9159 (7549-11110)
<b>15</b>	7999 (5006-12781)	7759 (6252-9628)	4999 (4628-5402)	11736 (9418-14624)
<b>17</b>	11200 (10003-12541)	11746 (7844-17588)	10787 (9703-11992)	16963 (12719-22621)
<b>19</b>	11683 (4187-32604)	9221 (7108-11961)	9064 (8408-9771)	14452 (11945-17487)
<b>21</b>	15917 (6327-40047)	16856 (12675-22417)	15338 (7744-30378)	22062 (17431-27922)
<b>28</b>	5566 (4767-6499)	9523 (8274-10961)	3830 (3517-4172)	22177 (19280-25509)
<b>31</b>	2940 (2640-3274)	5533 (5007-6114)	2403 (2206-2617)	9784 (8696-11009)
<b>AVN 22</b>				
<b>Semanas</b>	<b><i>M.lebetina</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>C. cerastes</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>B.arietans</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>E. pyramidum</i> (C.I.95%)</b>
<b>0</b>	36 (26-50)	75 (33-171)	11 (0-1982)	6 (4-11)
<b>1</b>	34 (24-47)	48 (26-87)	26 (11-58)	7 (4-14)
<b>3</b>	4 (1-10)	24 (8-67)	24 (8-72)	9 (6-15)
<b>5</b>	16 (12-20)	1 (0-48)	1 (0-553)	105 (82-137)
<b>7</b>	1153 (1005-1323)	601 (461-786)	330 (295-369)	559 (501-625)
<b>9</b>	3858 (3652-4075)	1465 (1335-1608)	1117 (1015-1230)	2344 (2098-2620)
<b>11</b>	2723 (2136-3471)	1320 (1078-1614)	1162 (868-1557)	1425 (1091-1860)
<b>13</b>	2618 (2305-2972)	1595 (1360-1870)	1259 (1070-1482)	1428 (1216-1677)
<b>15</b>	4981 (4575-5421)	2849 (2375-3418)	1573 (1211-2042)	3061 (2703-3466)
<b>17</b>	10828 (8757-13388)	4197 (2892-6090)	2458 (1755-3444)	4770 (3881-5864)
<b>19</b>	5916 (4919-7114)	2151 (1742-2657)	1599 (1025-2493)	3248 (2795-3775)
<b>21</b>	5274 (4780-5822)	2367 (1967-2848)	1788 (1570-2036)	3207 (2845-3615)
<b>28</b>	18593 (16036-21559)	4537 (4132-4981)	9455 (9017-9913)	34742 (28468-42400)
<b>31</b>	13897 (12396-15580)	3245 (2985-3528)	4678 (4288-5103)	11019 (8987-13509)

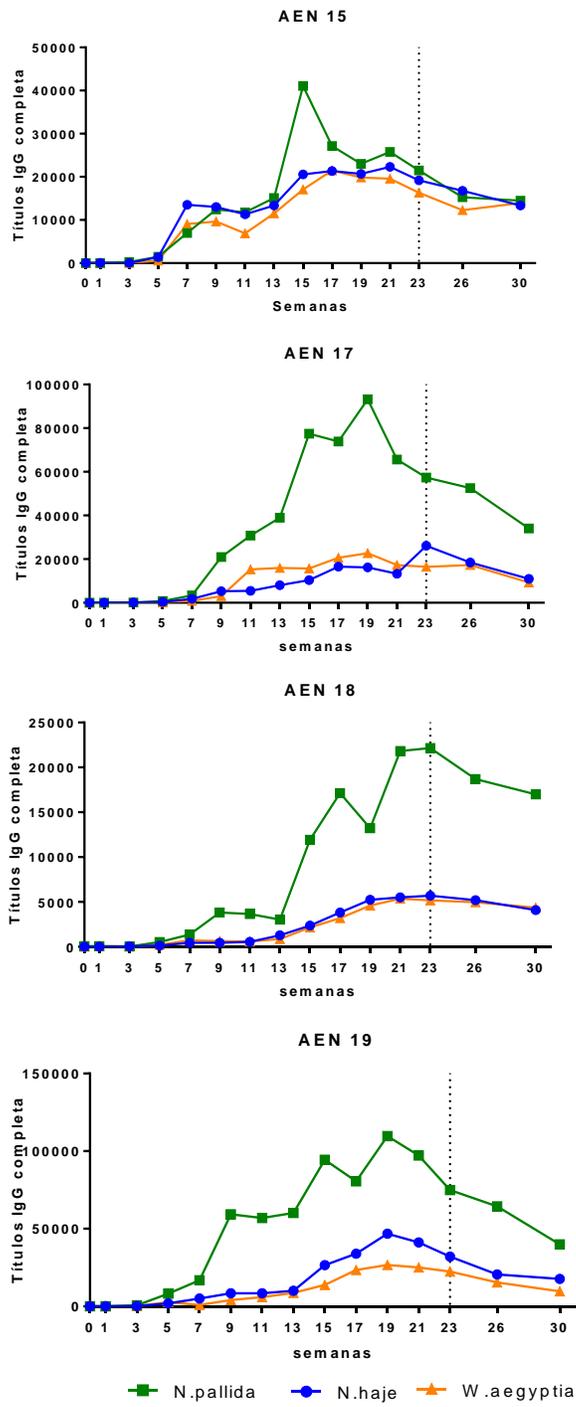
**AVN 28**

<b>Semanas</b>	<b><i>M.lebetina</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>C. cerastes</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>B. arietans</i> (C.I. 95%)</b>	<b><i>E. pyramidum</i> (C.I.95%)</b>
<b>0</b>	14 (7-29)	31 (16-62)	0 (0-0)	6 (3-12)
<b>1</b>	15 (10-25)	28 (13-62)	28 (8-96)	4 (1-16)
<b>3</b>	0	12 (4-42)	43 (32-57)	6 (2-24)
<b>5</b>	34 (24-50)	14 (4-46)	76 (68-86)	124 (109-142)
<b>7</b>	65 (20-215)	201 (165-246)	99 (92-109)	314 (308-322)
<b>9</b>	1544 (1420-1678)	1227 (1120-1345)	545 (322-925)	1527 (1247-1870)
<b>11</b>	2617 (2341-2925)	2318 (2108-2551)	2056 (1582-2674)	2208 (1982-2460)
<b>13</b>	2604 (2272-2983)	2470 (2131-2863)	1664 (1436-1928)	1975 (1739-2243)
<b>15</b>	4029 (3735-4346)	2829 (2367-3382)	1862 (1365-2541)	2214 (2036-2408)
<b>17</b>	2825 (2518-3167)	3094 (2688-3560)	2105 (1725-2567)	1999 (1760-2270)
<b>19</b>	3445 (3226-3679)	2745 (2424-3107)	1715 (1159-2539)	1666 (1549-1791)
<b>21</b>	4317 (4038-4615)	3895 (3420-4435)	2233 (1790-2785)	2343 (2022-2714)
<b>28</b>	3113 (2975-3257)	3838 (3004-4902)	2308 (2199-2423)	2757 (2586-2939)
<b>31</b>	4273 (3958-4614)	2886 (2469-3374)	2404 (2213-2611)	2523 (2288-2783)

En general, la magnitud de los títulos de los caballos inmunizados con veneno de elápidos es más alta que los del grupo AVN, alcanzando en algunos casos hasta 100 000. La tendencia de los títulos es también ascendente conforme la dosis de veneno por animal va en aumento y descendente después que alcanza el máximo.

El veneno con mayor inmunogenicidad es el de *N. pallida*, mientras que los dos restantes mantienen magnitudes muy similares entre sí.

En ambos grupos de caballos se encontró un animal particularmente débil en su respuesta inmune contra los venenos, en el caso del grupo AEN el 18 apenas llegó a 20 000 contra *N. pallida* (20% de la respuesta del mejor caballo), y una respuesta muy baja para los otros dos venenos.



**Figura 8. Evolución de títulos de IgG de los caballos del grupo AEN.** La línea puntada vertical indica el fin del esquema de inmunización inicial.

**Tabla 9. Títulos de IgG de los caballos del grupo AEN**

<b>AEN 15</b>			
<b>Semanas</b>	<b>Naja pallida</b>	<b>W. aegyptia</b>	<b>Naja haje</b>
0	40 (33-49)	37 (31-44)	32 (22-46)
1	32 (23-45)	29 (20-42)	46 (27-78)
3	271 (227-323)	3 (0-16)	8 (4-13)
5	1480 (1245-1760)	577 (499-666)	1390 (1297-1489)
7	6968 (5269-9215)	9043 (7939-10299)	13532 (10663-17172)
9	12443 (9296-16657)	9662 (7935-11765)	13006 (10506-16101)
11	11770 (9516-14557)	6912 (6230-7668)	11316 (10138-12631)
13	15105 (10986-20768)	11512 (9473-13989)	13340 (11786-15098)
15	41065 (27605-61088)	17055 (13801-21078)	20582 (17988-23551)
17	27125 (22583-32581)	21493 (16608-27814)	21362 (16748-27248)
19	23017 (17634-30043)	19873 (17385-22715)	20688 (18030-23737)
21	25764 (20743-32000)	19563 (17349-22058)	22316 (19500-25538)
23	21499 (19325-23916)	16296 (12797-20750)	19189 (17320-21260)
26	15283 (13461-17351)	12288 (10893-13862)	16774 (14752-19074)
30	14484 (13574-15453)	13934 (12962-14978)	13357 (11897-14996)
<b>AEN 17</b>			
<b>Semanas</b>	<b>Naja pallida</b>	<b>W. aegyptia</b>	<b>Naja haje</b>
0	50 (35-70)	57 (45-71)	44 (30-66)
1	50 (35-70)	44 (36-53)	39 (23-67)
3	131 (110-155)	0	107 (100-114)
5	825 (762-894)	120 (99-145)	396 (378-414)
7	3393 (2624-4388)	845 (744-959)	1787 (1591-2007)
9	20977 (13915-31623)	3073 (2852-3309)	5278 (4615-6036)
11	30790 (23860-39733)	15303 (13648-17159)	5485 (4649-6470)
13	38997 (27294-55718)	15940 (14179-17920)	8080 (6699-9746)
15	77473 (63048-95199)	15744 (14550-17035)	10397 (9525-11347)
17	73838 (60175-90604)	20641 (17800-23934)	16512 (15834-17217)
19	93177 (71768-120970)	22701 (19689-26175)	16248 (15150-17424)
21	65662 (53099-81198)	17304 (16471-18179)	13305 (12113-14613)
23	57414 (45984-71684)	16465 (13802-19641)	26116 (22946-29726)
26	52537 (41416-66644)	17256 (15541-19161)	18484 (16111-21207)
30	34014 (27977-41356)	9286 (7992-10789)	10971 (9869-12195)

**AEN 18**

<b>Semanas</b>	<b>Naja pallida</b>	<b>W. aegyptia</b>	<b>Naja haje</b>
0	73 (63-86)	0	0 (0-0)
1	80 (67-95)	78 (60-102)	0 (0-0)
3	36 (34-38)	59 (52-65)	55 (49-61)
5	539 (430-674)	214 (190-240)	129 (111-150)
7	1363 (1200-1548)	724 (680-770)	437 (391-490)
9	3828 (3165-4628)	629 (568-697)	438 (424-453)
11	3659 (2987-4481)	601 (577-626)	543 (492-600)
13	3031 (2646-3472)	869 (767-985)	1291 (1094-1524)
15	11934 (10052-14170)	2156 (1958-2375)	2367 (2101-2667)
17	17141 (12809-22940)	3198 (2570-3979)	3828 (3370-4349)
19	13226 (9599-18226)	4597 (4051-5217)	5247 (4464-6168)
21	21829 (16844-28289)	5365 (4929-5840)	5517 (4512-6747)
23	22164 (16445-29869)	5186 (4697-5727)	5707 (4588-7098)
26	18705 (15131-23125)	4965 (4441-5550)	5191 (4426-6088)
30	16995 (12140-23792)	4365 (3541-5379)	4103 (3509-4796)

**AEN 19**

<b>Semanas</b>	<b>Naja pallida</b>	<b>W. aegyptia</b>	<b>Naja haje</b>
0	71 (59-84)	163 (36-727)	32 (24-42)
1	62 (44-87)	94 (68-130)	25 (17-38)
3	672 (583-776)	149 (133-166)	202 (183-224)
5	8227 (3325-20354)	2636 (2225-3122)	1915 (1627-2253)
7	16760 (9753-28800)	879 (793-974)	5014 (4126-6094)
9	59335 (27948-125970)	4013 (3426-4699)	8435 (7280-9773)
11	56913 (34490-93913)	5889 (5117-6777)	8451 (7507-9514)
13	60131 (37810-95631)	8704 (7245-10458)	10010 (8223-12186)
15	94491 (60802-146844)	13840 (11715-16352)	26568 (21894-32241)
17	80511 (50681-127897)	23401 (19207-28512)	33941 (25922-44441)
19	109708 (57684-208650)	26748 (20859-34298)	46857 (32039-68530)
21	97161 (68098-138628)	25105 (22395-28142)	41208 (30612-55473)
23	74918 (44272-126776)	22416 (16688-30106)	32120 (24524-42067)
26	64391 (43217-95939)	15408 (13378-17744)	20557 (17008-24846)
30	39881 (29524-53872)	9660 (8635-10807)	17629 (14718-21116)

**6.2 Cuantificación de las subclases de IgG**

Los anticuerpos secundarios para ELISA para detección de las subclases de IgG se obtuvieron de sueros de conejo mediante cromatografía por afinidad, los resultados y el rendimiento se muestran a continuación.

### 6.2.1 Obtención de inmunoglobulinas anti IgG y anti IgG(T).

La tabla 10 muestra los resultados de la doble purificación por medio de cromatografía por afinidad. Se muestran los datos de ambas purificaciones; en la primera de ellas se separaron las inmunoglobulinas afines a una de las subclases a partir del suero equino, para la segunda se descartaron los anticuerpos que se pegaron a la segunda columna a partir de la solución resultado de la primera purificación.

**Tabla 10. Doble purificación de Inmunoglobulinas de conejo**

Columna	Volumen 1 (40 ml)			
	Purificación 1 Sph-IgG		Purificación 2 Sph-IgG(T)	
	Pegado	No pegado	Pegado	No pegado ( $\alpha$ IgG)
Volumen (ml)	20		17.5	38
Concentración (mg/ml)	1.16		0.22	0.43
Total (mg)	23.35		3.87	<b>16.63</b>
Rendimiento (%)			15.78	<b>71.22</b>
				87
Columna	Volumen 2 (40 ml)			
	Purificación 1 Sph-IgG(T)		Purificación 2 Sph-IgG	
	Pegado	No pegado	Pegado	No pegado ( $\alpha$ IgG(T))
Volumen (ml)	76		37	43
Concentración (mg/ml)	0.181		0.14	0.07
Total (mg)	13.76		5.32	<b>3.02</b>
Rendimiento (%)			38.8	<b>21.9</b>
				60.78

El total de proteínas recuperadas al final de todo el proceso se expresa como un porcentaje de la cantidad de proteínas obtenidas en la primera purificación.

En este proceso de obtención de los anticuerpos leporinos con especificidad contra las subclases de IgG equina se presentó pérdida de proteínas en la segunda purificación. En el volumen 1, el 87% de las proteínas obtenidas en el primer paso fueron recuperadas al final de la segunda purificación. Mientras que en el volumen 2 solo alrededor del 61% fueron recuperadas.

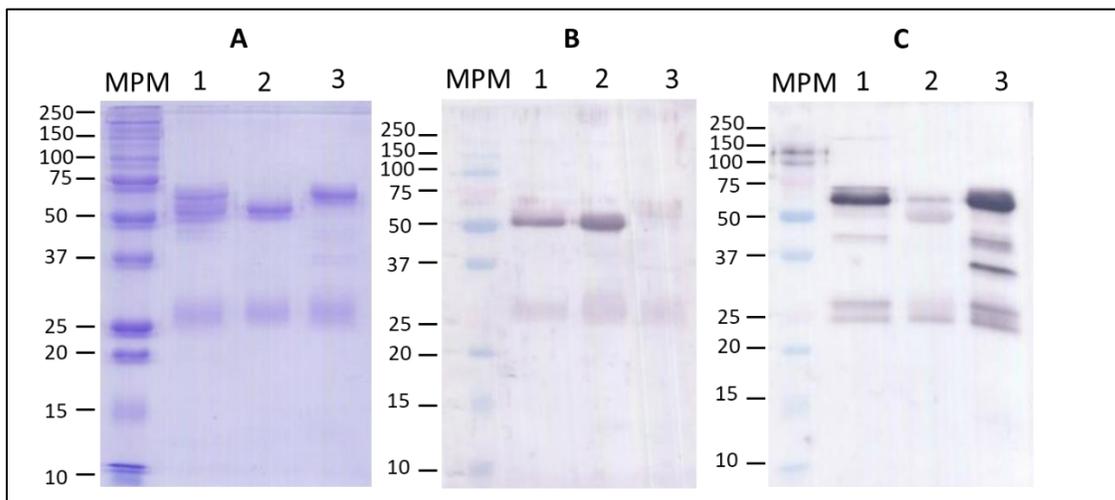
Los 16.63 mg obtenidos del volumen 1 de suero corresponden a inmunoglobulinas con especificidad anti IgG sin reactividad contra IgG(T). El 71.22 % de las inmunoglobulinas

obtenidas en la purificación 1 tienen afinidad exclusiva por IgG. Por su parte, del volumen 2 se obtuvieron 3.02 mg de inmunoglobulinas con especificidad anti IgG(T) que no reaccionan ante IgG. Solo el 21.9 % de las inmunoglobulinas purificadas en el primer paso no tuvieron doble reactividad.

### 6.2.2 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos purificados

#### *Western Blot*

En el carril 1 del gel de referencia de la **Figura 9 (A)** se observa la diferencia en el desplazamiento de las cadenas pesadas de IgG y de IgG(T) entre los 50 y 75 kDa, la banda de IgG(T) se desplaza un poco menos y está más cerca de los 75 kDa, mientras que la banda de IgG es la inferior y más cercana a las 50 kDa. Las bandas cercanas a los 25 kDa en los tres carriles corresponden a las cadenas ligeras. En el WB de prueba de anti IgG (**B**), el marcaje es intenso en las bandas correspondientes a IgG. Por su parte, en la prueba del purificado anti IgG(T) (**C**) Las bandas más intensamente marcadas son las correspondientes a IgG(T), pero se observa un leve marcado inespecífico de las bandas de IgG de la misma intensidad que la observada hacia otras moléculas como las cadenas ligeras cercanas a los 25 kDa.



**Figura 9. Western Blot de prueba de especificidad de inmunoglobulinas purificadas.**

**A.** Gel de referencia SDS-PAGE al 12.5% condiciones reductoras, 1-Estándar IgG+IgG(T) (2  $\mu$ g), 2-Estándar IgG (2  $\mu$ g), 3-Estándar IgG (T) (2  $\mu$ g). **B.** WB anticuerpo primario purificado **anti IgG** (100  $\mu$ g), anticuerpo secundario goat anti rabbit IgG PA conjugated (1:2000). **C.** WB anticuerpo primario purificado **anti IgG(T)** (100  $\mu$ g) anticuerpo secundario goat anti rabbit IgG PA conjugated (1:2000).

### ELISA para evaluar la especificidad de los anticuerpos purificados

Se obtuvieron los títulos de las inmunoglobulinas purificadas contra los estándares. En total se obtuvieron 4 magnitudes de títulos: anti IgG vs IgG, anti IgG vs IgG(T), anti IgG(T) vs IgG, anti IgG(T) vs IgG. Los resultados se muestran a continuación

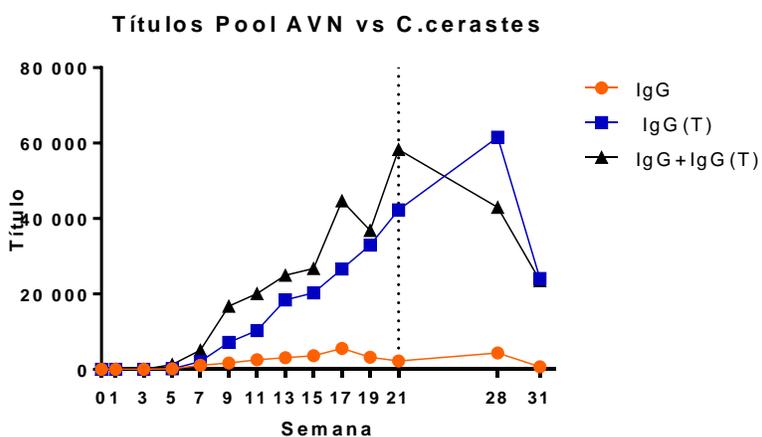
**Tabla 11. Títulos de inmunoglobulinas purificadas vs estándares**

	Título ng/ml		
	vs IgG	vs IgG(T)	Selectividad
<b>Purificado <math>\alpha</math>IgG</b>	5361	23033	4
<b>Purificado <math>\alpha</math>IgG(T)</b>	5910	472	13

La selectividad mostrada en el cuadro es un cociente resultado de dividir el título contra el estándar no específico entre el título contra el estándar específico. Así, el purificado anti IgG es 4 veces más afin contra IgG que contra IgG (T) y el purificado anti IgG(T) es 13 veces más específico contra IgG(T) que contra IgG.

### 6.2.3 Subclases de IgG en el grupo AVN

La determinación de los títulos de IgG e IgG(T) se llevó a cabo en el suero de todas las semanas del esquema inicial de inmunización y en dos correspondientes a la fase de producción (semana 28 y 31).



**Figura 10. Gráfica de títulos de las subclases de IgG anti *C. cerastes***

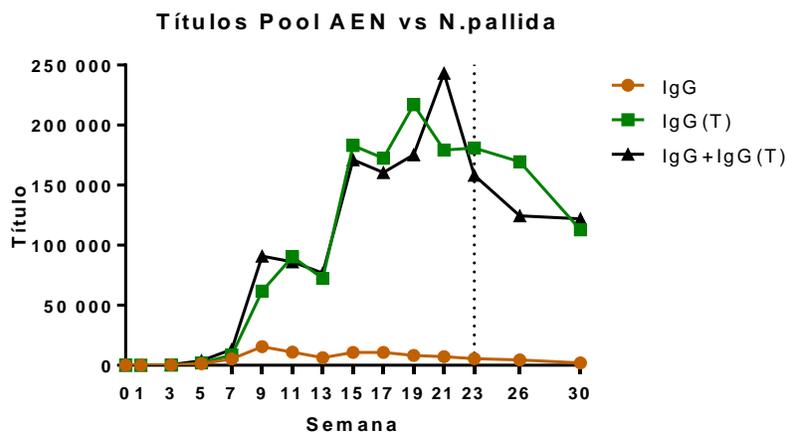
**Tabla 12. Títulos de las subclases de IgG anti *N. Pallida***

<b>Títulos anti <i>C.cerastes</i></b>			
<b>Semanas</b>	<b>IgG (C.I. 95%)</b>	<b>IgG(T) (C.I. 95%)</b>	<b>IgG+IgG(T) (C.I. 95%)</b>
<b>0</b>	0	0	0
<b>1</b>	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0
<b>5</b>	178 (134-237)	150 (132-170)	1302 (1051-1616)
<b>7</b>	1115 (948-1312)	2109 (1791-2482)	5067 (4529-5669)
<b>9</b>	1721 (1331-2225)	7134 (6413-7936)	16747 (13740-20411)
<b>11</b>	2576 (1896-3500)	10322 (8659-12304)	20125 (17082-23709)
<b>13</b>	3122 (2449-3980)	18452 (15294-22262)	24938 (22558-27568)
<b>15</b>	3608 (2828-4603)	20302 (17796-23162)	26770 (23197-30892)
<b>17</b>	5535 (4249-7210)	26632 (23800-29799)	44668 (37033-53877)
<b>19</b>	3262 (2282-4664)	32963 (29044-37411)	36824 (28481-47611)
<b>21</b>	2230 (1792-2774)	42267 (35435-50416)	58320 (46515-73120)
<b>28</b>	4347 (2225-8493)	61597 (35988-105433)	42980 (31785-58118)
<b>31</b>	695 (406-1189)	24121 (17107-34012)	23584 (20504-27126)

Las primeras tres semanas del esquema de inmunización no presentan títulos de ninguna de las subclases. En la semana 5 los títulos de IgG son muy cercanos a los de IgG(T) pero para la semana 7 el predominio de esta última se establece con un título que casi duplica al de IgG. A partir de esta semana la IgG presenta un incremento discreto en los títulos hasta la semana 17 después de la cual comienza a tener un descenso. Por su parte, la IgG(T) presenta un aumento muy marcado que se prolonga hasta la semana 28, para después comenzar a descender.

La magnitud tan cercana de los títulos de IgG(T) con los títulos de todas las subclases juntas sugiere que la mayor parte de inmunoglobulinas presentes en el suero contra el veneno de *Cerastes cerastes* son de la subclase IgG(T).

## 6.2.2 Subclases de IgG en el grupo AEN



**Figura 11. Gráfica de títulos de las subclases de IgG anti *N.pallida***

**Tabla 13. Títulos de las subclases de IgG anti *N. Pallida***

Títulos vs <i>N.pallida</i>			
Semana	IgG (C.I. 95%)	IgG(T) (C.I. 95%)	IgG+IgG(T) (C.I. 95%)
<b>0</b>	0	0	<b>0</b>
<b>1</b>	20 (10-40)	47 (42-54)	68 (41-112)
<b>3</b>	275 (222-343)	116 (103-131)	417 (373-467)
<b>5</b>	1352 (1249-1463)	1964 (1764-2189)	3936 (3724-4158)
<b>7</b>	5355 (4791-5985)	8585 (7865-9372)	13290 (11147-15845)
<b>9</b>	15434 (11913-19996)	61706 (50827-74915)	90859 (54132-152505)
<b>11</b>	10880 (9120-12980)	90312 (70974-114918)	86208 (62059-119753)
<b>13</b>	6437 (5681-7293)	72354 (62009-84426)	76842 (54142-109059)
<b>15</b>	10802 (6340-18407)	183008 (144919-231109)	171045 (109273-267736)
<b>17</b>	10795 (7916-14722)	172487 (105613-281707)	160580 (120385-214196)
<b>19</b>	8248 (6671-10196)	216989 (104067-452438)	175395 (124343-247407)
<b>21</b>	7185 (6282-10063)	179235 (112120-286525)	243266 (118165-500808)
<b>23</b>	5471 (4965-7383)	181021 (121124-270537)	158258 (113326-221005)
<b>26</b>	4542 (4258-5933)	169414 (116752-245830)	124471 (72587-213440)
<b>30</b>	1969 (1723-2755)	112770 (87373-145548)	121886 (90470-164211)

Los títulos de las subclases son también mayores para el grupo AEN al igual que en las determinaciones de los títulos generales.

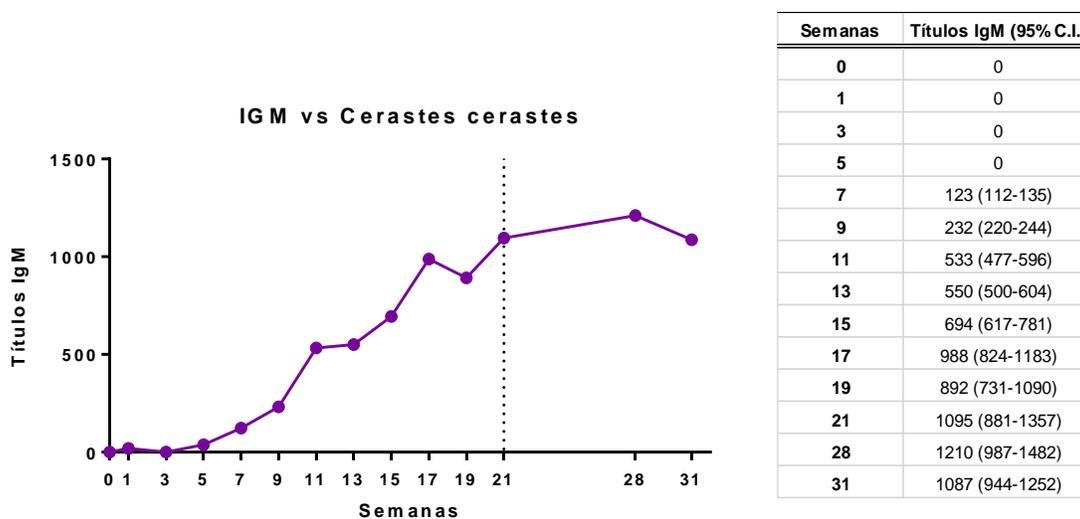
En este caso, la aparición de títulos de todas las subclases comienza desde la semana 1 y para la semana tres se observa predominio de las IgG (275 vs 116) pero a partir de la semana 5 el predominio de la IgG(T) se establece y se mantiene durante todo el periodo estudiado. La

mayor magnitud de ambas subclases difiere en el tiempo que es alcanzado; la IgG alcanza un máximo de 10802 alrededor de la semana 9, mientras que IgG(T) alcanza una magnitud mucho mayor de 216989 hasta la semana 19.

Al igual que en el caso del grupo AVN, la cercanía de los títulos de IgG(T) con los títulos de todas las subclases juntas demuestra que la mayoría de las inmunoglobulinas G en el suero hiperinmune son de esta subclase.

### 6.3 Títulos de IgM

No se observaron títulos de IgM vs *C. cerastes* durante las primeras 5 semanas del esquema de inmunización. A partir de la semana siete se observaron títulos que continuaron ascendiendo hasta prácticamente la última fecha evaluada.



**Figura 12. Títulos normalizados de IgM vs *Cerastes cerastes***

Para el grupo AEN (**Figura 12**), comienzan a observarse títulos hasta la semana 3 y presentan su máximo en la semana 11, para después presentar magnitudes irregulares hasta el fin del esquema de inmunización (semana 23), después del cual se observa un claro decremento en la magnitud hasta prácticamente llegar al 0.

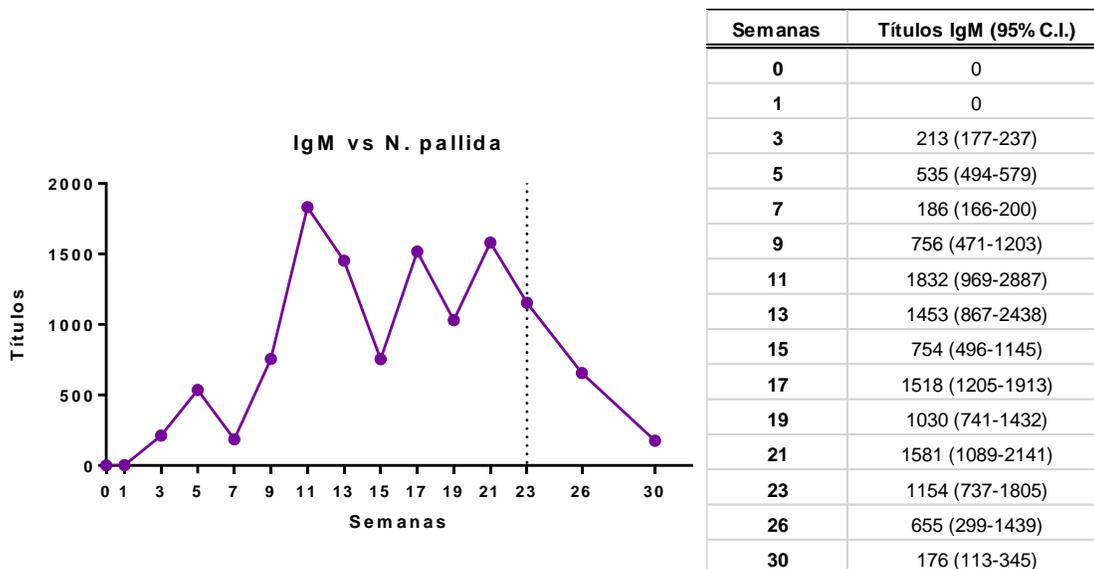


Figura 13. Títulos normalizados de IgM vs *N. pallida*

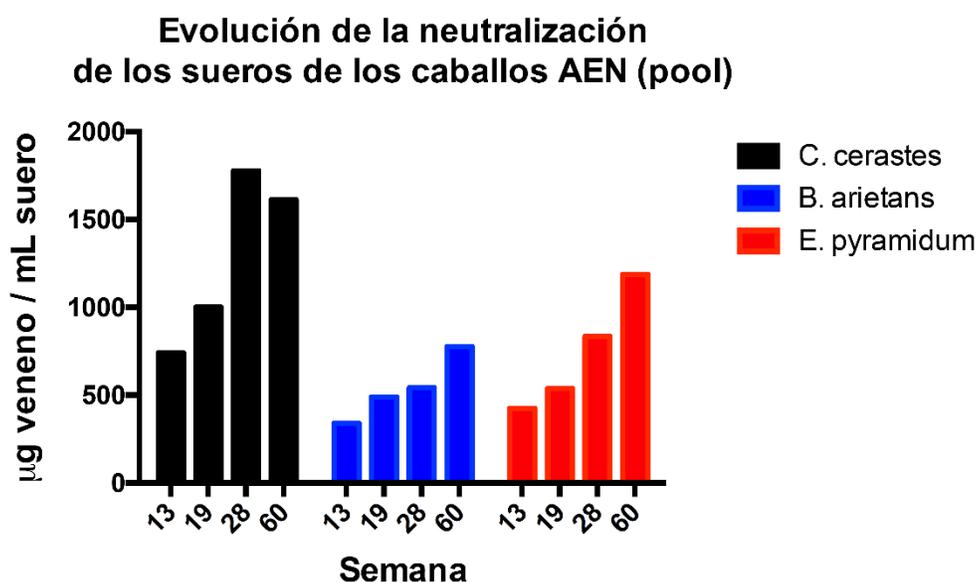
#### 6.4 Potencia neutralizante

Tabla 14. DE<sub>50</sub> Pool AVN

<i>Cerastes cerastes</i>				
Semana	DE50 (µl/ratón)	C.I. 95%	µg veneno/ ml suero	DL50/ml suero
13	37.4	37-38	741	80
19	27.7	27-28	1001	108
28	15.6	15-16	1777	192
60	17.2	15-19	1613	175
<i>Bitis arietans</i>				
13	90.4	60-137	337	33
19	62.5	53-73	487	48
28	56.2	51-62	541	53
60	39.3	27-42	774	76
<i>Echis pyramydum</i>				
13	280.2	258-303	423	11
19	221.3	199-247	535	14
28	142.3	103-196	833	21
60	99.9	82-121	1186	30

La potencia neutralizante fue medida en dos fechas correspondientes al esquema inicial de inmunización (semanas 13 y 19), así como en una fecha próxima al inicio de la fase de producción (semana 28 para AVN y 23 para AEN) y también en una fecha mucho más avanzada que corresponde a más de un año desde la primera inmunización (semana 60 para AVN y 58 para AEN).

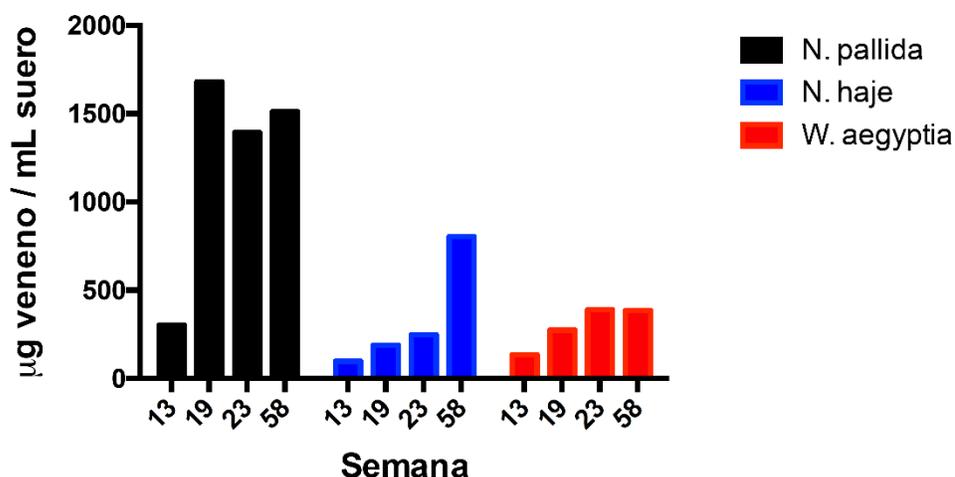
La primera columna muestra la dosis en  $\mu\text{l}/\text{ratón}$  junto con los C.I. La siguiente columna presenta otro modo de medir la dosis efectiva media que considera la masa total del veneno neutralizado por el volumen de suero dado. Por su parte, la última columna muestra cuantas dosis letales medias neutraliza cada ml de suero.



**Figura 14. Evolución de la potencia neutralizante del suero AVN presentada como  $\mu\text{g}$  de veneno neutralizado por ml de suero.**

El suero AVN (**Figura 14**) logró la mayor potencia neutralizante contra el suero de *C. cerastes*. Para todos los venenos, la capacidad neutralizante mejoró casi el triple en la última semana evaluada en comparación con la primera evaluada. Es importante notar esta mejora a pesar de la disminución en los títulos de IgG descrita en los apartados anteriores.

**Evolución de la neutralización  
de los sueros de los caballos AEN (pool)**



**Figura 15. Evolución de la potencia neutralizante del suero AEN presentada como µg de veneno neutralizado por ml de suero.**

**Tabla 15. DE<sub>50</sub> Pool AEN**

<i>Naja pallida</i>				
Semana	DE50 (µl/ratón)	C.I. 95%	µg veneno/ ml suero	DL50/ml suero
13	152.7	118-197	303	20
19	27.5	27-28	1680	109
23	33.2	31-36	1392	90
58	30.6	30-31	1510	98
<i>Naja haje</i>				
13	28.1	23-34	97	107
19	14.6	12-18	187	205
23	11.0	10-12	248	273
58	3.4	3-4	803	882
<i>Walterinnesia aegyptia</i>				
13	112.6	74-170	132	27
19	54.8	50-61	272	55
23	38.4	38-39	388	78
58	38.9	35-44	383	77

La potencia neutralizante para los tres venenos de elápidos (**Tabla 15 y Figura 15**) también mejoró conforme avanzó el esquema de inmunización, a pesar de la disminución en los títulos de todas las clases medidas.

Se observan diferencias en la magnitud de la potencia neutralizante según la forma en la que es expresada en la **Tabla 15**. Esto se debe principalmente a las dosis letales ( $DL_{50}$ ) de los diferentes venenos (**Tabla 5**). Como ejemplo, en el grupo AEN la potencia medida en  $\mu\text{g}$  de veneno neutralizado por ml de suero para *N. pallida* está muy por encima de las de los otros dos venenos desde la semana 19, sin embargo, cuando se comparan las  $DE_{50}$  neutralizadas por ml la respuesta contra *N. haje* es mucho mayor desde la semana 13. Esto se debe a la pequeña cantidad de veneno que conforma la dosis letal del veneno de *N.haje* ( $0.91 \mu\text{g}$ ).

## 6.5 Purificación de inmunoglobulinas

### 6.5.1 Precipitación con ácido caprílico.

La precipitación con ácido caprílico de 20 ml de cada uno de los sueros arrojó los siguientes rendimientos:

**Tabla 16. Rendimiento de precipitación con ácido caprílico**

<b>Suero AVN semana 60</b>				
	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Abs 280 nm</b>	<b>Concentración(mg/ml)</b>	<b>Total (mg)</b>
Suero	20			
Sobrenadante	17.5	15.72	11.23	196.5

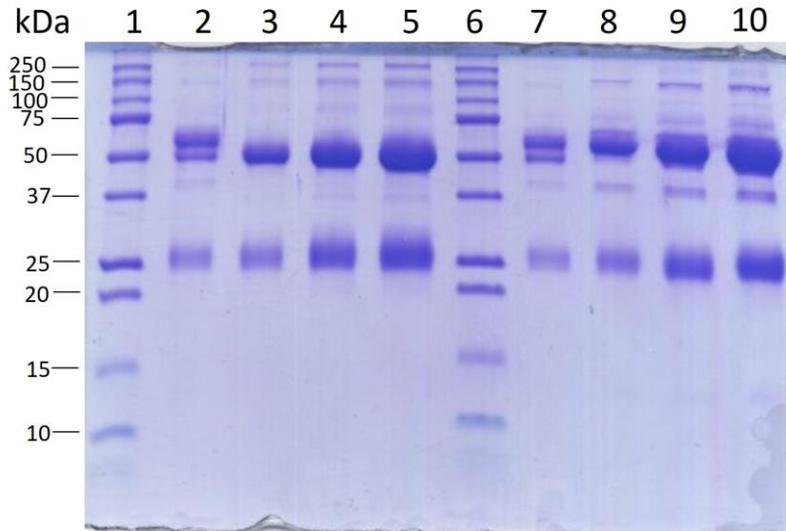
<b>Suero AEN semana 58</b>				
	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Abs 280 nm</b>	<b>Concentración(mg/ml)</b>	<b>Total (mg)</b>
Suero	20			
Sobrenadante	17.5	16.14	11.53	201.75

En la precipitación se descartan las proteínas del suero, principalmente la albúmina, y se mantienen las globulinas en el sobrenadante. Los 196.5 mg de inmunoglobulinas obtenidos a partir de 20 ml de suero permiten estimar la concentración de IgG en el suero del grupo AVN en alrededor de **9.83 mg/ml** ( $196.5 \text{ mg}/20 \text{ ml}$ ). Por su parte, el Suero AEN tuvo una concentración de inmunoglobulinas de **10.09 mg/ml** ( $201.75 \text{ mg}/20 \text{ ml}$ )

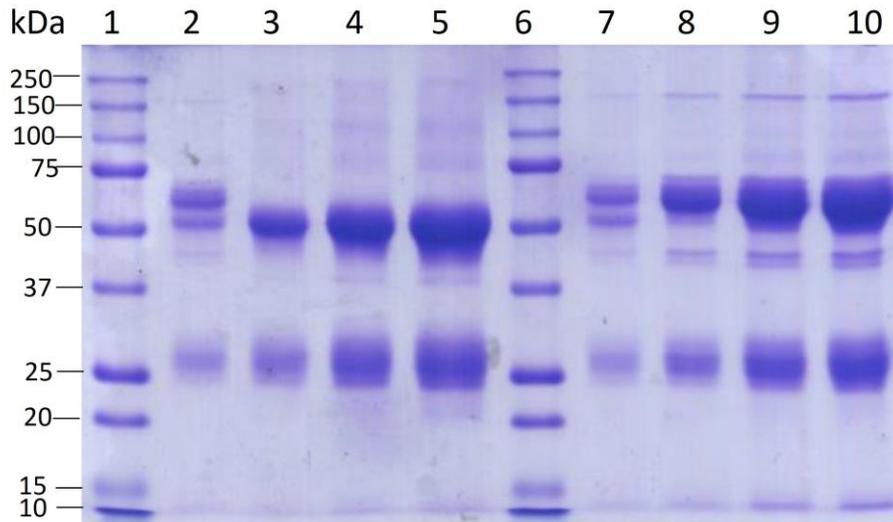
### 6.5.2 Purificación de las subclases de IgG

Las subclases de inmunoglobulina G fueron separados según su afinidad por una columna hidrofílica en un gradiente de NaCl en dos fracciones: por un lado la correspondiente a las clases IgGa, IgGb, IgGc e IgG(B) y por otro lado el correspondiente a IgG(T).

El resultado de la purificación de las inmunoglobulinas de ambos grupos se corrió en geles de poliacrilamida y el resultado se muestra en las **Figuras 15 y 16**.



**Figura 16 Inmunoglobulinas purificadas a partir del suero pool AEN. Gel SDS PAGE al 15% condiciones reductoras. Carril 1 y 6.- Marcador de masa molecular. Carril 2 y 7.- Estándar de IgG+IgG(T) Carril 3.- IgG purificada (5  $\mu$ g). Carril 4.- IgG purificada (10  $\mu$ g). Carril 5.- IgG purificada (15  $\mu$ g). Carril 8.- IgG(T) purificada (5  $\mu$ g) Carril 9.- IgG(T) purificada (10  $\mu$ g) Carril 10.- IgG(T) purificada (15  $\mu$ g)**



**Figura 17 Inmunoglobulinas purificadas a partir del suero pool AVN. Gel SDS PAGE al 15%, condiciones reductoras Carril 1 y 6.- Marcador de masa molecular. Carril 2 y 7.- Estándar de IgG+IgG(T) Carril 3.- IgG purificada (5  $\mu$ g). Carril 4.- IgG purificada (10  $\mu$ g). Carril 5.- IgG purificada (15  $\mu$ g). Carril 8.- IgG(T) purificada (5  $\mu$ g) Carril 9.- IgG(T) purificada (10  $\mu$ g) Carril 10.- IgG(T) purificada (15  $\mu$ g)**

AVN

Las bandas cercanas a los 50 kDa corresponden a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y las cercanas a los 25 kDa a las cadenas ligeras. En el carril 2 y 7 observamos que el estándar que incluye todas las subclases de IgG presenta dos bandas bien delimitadas; la IgG(T) se desplaza un poco menos debido a su mayor peso molecular.

En el caso de las inmunoglobulinas purificadas de ambos pools, se observa que el perfil electroforético presenta una sola banda cercana a los 50 kDa que migra un poco menos en el caso de las IgG(T). Esto significa que la purificación fue exitosa y no se encuentran IgG(T) en el purificado de IgG's y viceversa.

## 6.6 Neutralización de las subclases

**Tabla 17. Porcentajes de supervivencia de pruebas de neutralización con las subclases de IgG purificadas\***

Suero AVN semana 60			
<b>IgG</b>	2 DE <sub>50</sub> (600 µg) 0%	4 DE <sub>50</sub> (1200 µg) 0%	6 DE <sub>50</sub> (1800 µg) 0%
<b>IgG(T)</b>	2 DE <sub>50</sub> (600 µg) 0%	4 DE <sub>50</sub> (1200 µg) 66%	5 DE <sub>50</sub> (1500 µg) 100%
Suero AEN semana 58			
<b>IgG</b>	2 DE <sub>50</sub> (330 µg) 0%	4 DE <sub>50</sub> (660 µg) 0%	6 DE <sub>50</sub> (990 µg) 0%
<b>IgG(T)</b>	2 DE <sub>50</sub> (330 µg) 0%	3 DE <sub>50</sub> (495 µg) 33%	4 DE <sub>50</sub> (660 µg) 100%

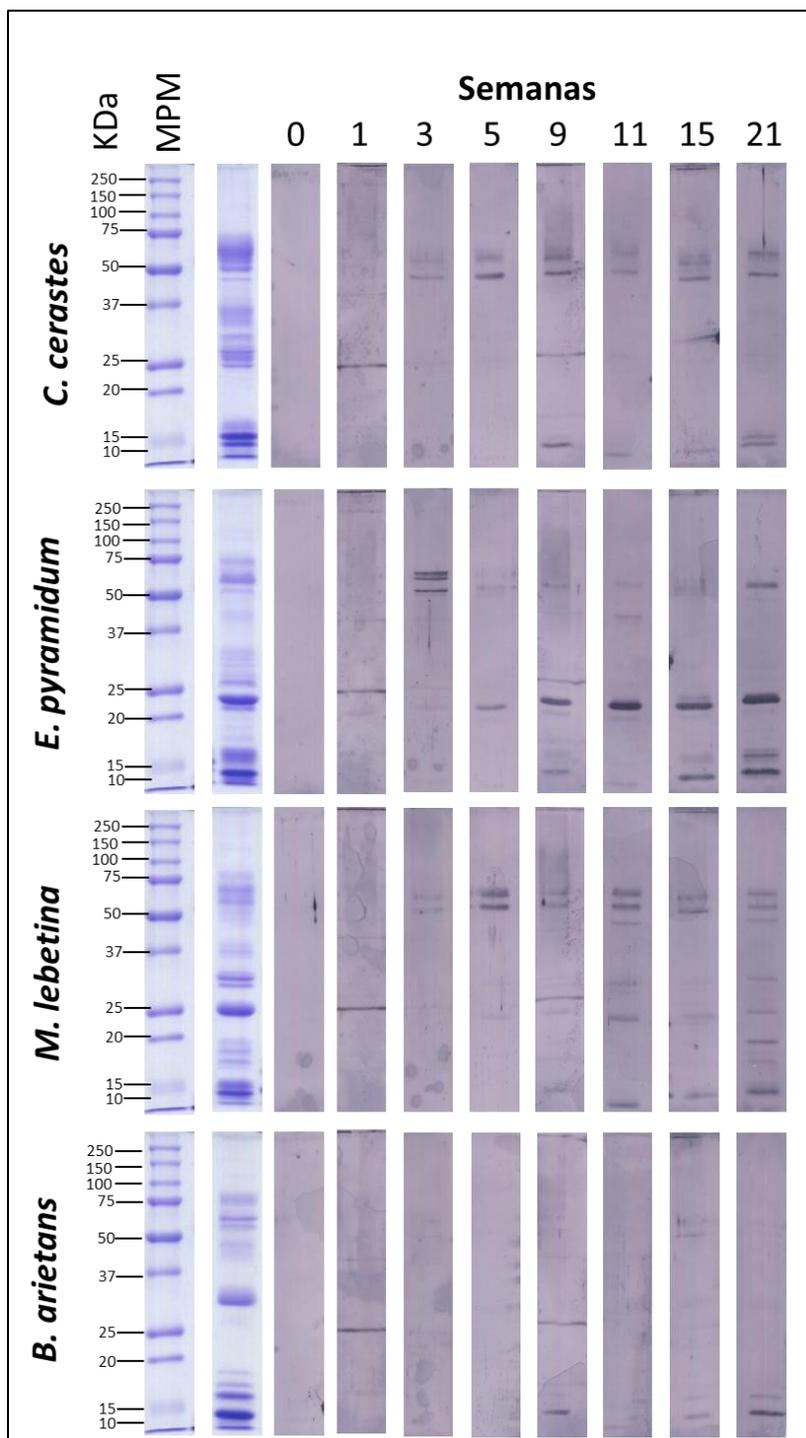
\*Las inmunoglobulinas purificadas del suero AVN se probaron contra el veneno de *C. cerastes* y las del suero AEN contra *N. pallida*

. Las inmunoglobulinas purificadas del suero del apartado anterior de ambos grupos fueron probadas en un ensayo *in vivo* contra tres dosis letales medias de *N. pallida* y de *C. cerastes* para comparar su potencia neutralizante con la de los sueros completos.

La cantidad inicial probada se calculó con la concentración de Inmunoglobulinas en el suero calculada en 6.5.1 y correspondió a dos veces los miligramos de inmunoglobulinas presentes en las dosis efectivas determinadas de las **Tablas 14 y 15**. A partir de los resultados del primer ensayo se decidió la cantidad a utilizar en los siguientes:

No se observó potencia neutralizante por parte de las IgG's solas de los dos sueros, por su parte, las IgG(T) lograron supervivencia del 100% de los ratones pero con dosis muy altas que correspondían a 5 veces la  $DE_{50}$ .

## 6.7 Evolución del reconocimiento de las proteínas del veneno



**Figura 18. Evolución del reconocimiento de las proteínas de venenos de vipéridos por el suero AVN.:Veneno.** Gel SDS PAGE al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras de 20 µg de los venenos evaluados. **Semanas.** western blot., 2 µg de veneno, sueros dilución 1:500, anticuerpo secundario Goat anti horse IgG AP conjugated, .

En la primera columna a la derecha del marcador de peso molecular se observan los geles de la electroforesis en condiciones reductoras de los 4 venenos de vipéridos probados (**Figura 18**) y los tres venenos de elápidos (**Figura 19**). Las columnas siguientes corresponden al resultado de los western blot utilizando como anticuerpo secundario las muestras de suero de las semanas indicadas.

En el SDS-PAGE de los venenos de vipéridos se pueden observar las tres principales familias de toxinas: PLA<sub>2</sub> cercano a los 15 KDa, Serinproteasas alrededor de los 30 KDa, y las metaloproteasas clase III (SMVP) ubicadas entre las bandas de 50 y 75 KDa.

En el veneno de los vipéridos estudiados las toxinas más abundantes son las SVMP (Tasoulis & Isbister, 2017). El pool de suero AVN las reconoce desde la semana 9 en el veneno de *Bitis arietans* y *Macrovipera lebetina obtusa*, sin embargo, las SMVP en el veneno de *E. pyramidum* son reconocidas sólo de manera intensa en la semana cinco para después presentar un reconocimiento muy ténue. En *Bitis arietans* no existe un reconocimiento visible de las SMVP's.

Las SVSP's son el segundo grupo de toxinas más abundantes en el veneno de *Bitis arietans* y de *Macrovipera lebetina obtusa* y el tercero en el veneno de *Cerastes cerastes* y *Echis pyramidum*, siendo representadas de manera escasa en este último (Tasoulis & Isbister, 2017). El reconocimiento de estas proteínas por parte de los anticuerpos en el suero AVN no es evidente en ninguno de los venenos, solamente en el de *M. lebetina* se observan unas bandas muy tenues a partir de la semana 11.

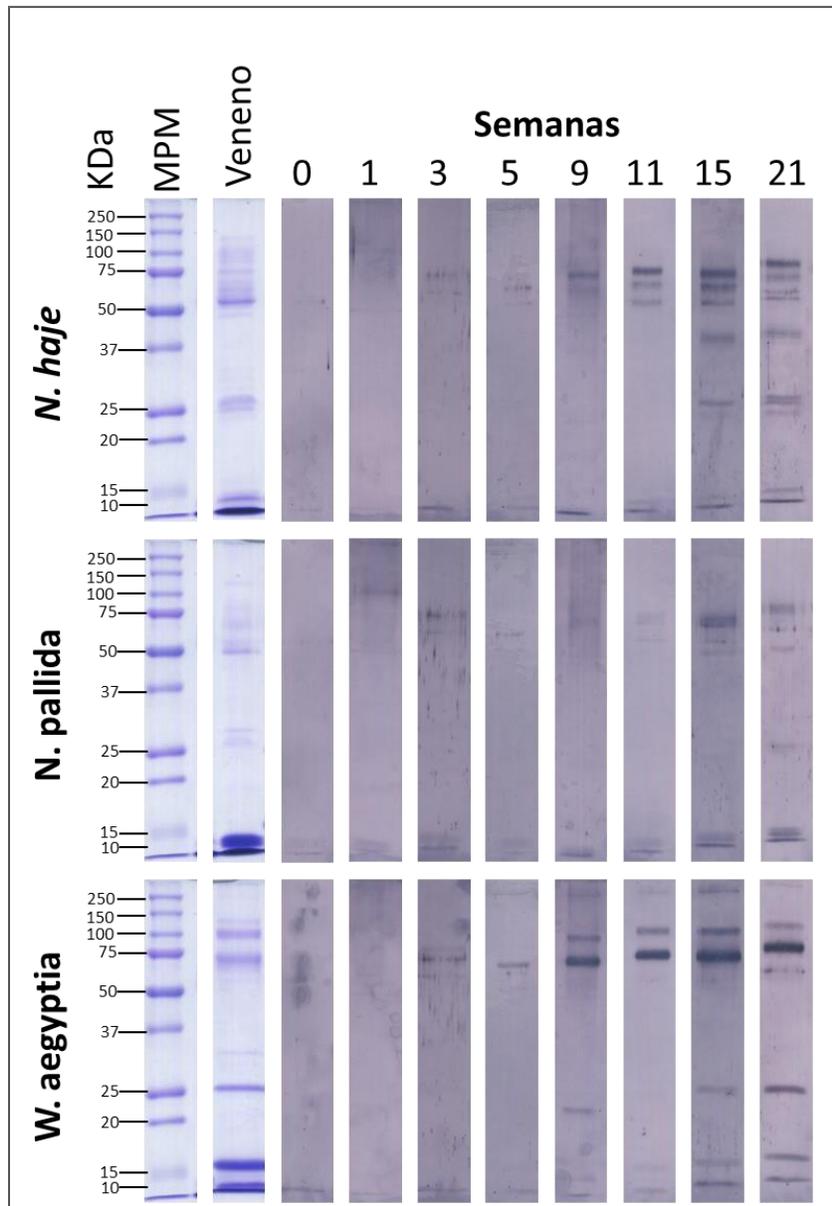
Las PLA<sub>2</sub> son la tercer familia de componentes principales en los venenos de vipéridos (Tasoulis & Isbister, 2017). Su peso molecular está entre 13 y 18 KDa y las bandas correspondientes a estas son reconocidas de manera intensa en el veneno de los cuatro vipéridos, de manera especialmente intensa en el de *E. Pyramidum*. Es importante notar que en el veneno de *Bitis arietans* son los únicos componentes que son reconocidos de forma

En la **Figura 19** se observa la electroforesis en gel en condiciones reductoras de los venenos de elápidos así como el resultado del western Blot llevado a cabo con el suero AEN de distintas semanas del esquema de inmunización. En los tres venenos se observan bandas intensas menores a 15 KDa que corresponden a 3FTx's y PLA<sub>2</sub>, de las cuáles las primeras

son las más abundantes en los venenos de elápidos y los principales causantes de la patogenicidad observada (Tasoulis & Isbister, 2017).

Estas bandas cercanas a los 15 KDa son reconocidas por el suero de los caballos del grupo AEN desde aproximadamente la semana 3 en el veneno de *N.haje*. y a partir de la semana 9 en *N. pallida* y *W. aegyptia*.

A pesar de estar poco representadas en el veneno de los elápidos, las SVMP que tienen pesos moleculares entre los 50 y 75 KDa el suero logra un reconocimiento muy intenso que comienza desde la semana 9 en *N. haje* y *W. aegyptia*.y hasta la semana 15 en *N.pallida*.



**Figura 19. Evolución del reconocimiento de las proteínas de venenos de elápidos por el suero AEN.:Veneno.** Gel SDS PAGE al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras de 20 µg de los venenos evaluados. **Semanas.** western blot., 2 µg de veneno, sueros dilución 1:500, anticuerpo secundario Goat anti horse IgG AP conjugated. .

## 7. Discusión

El modelo equino es actualmente el más usado para la obtención de sueros hiperinmunes contra el accidente ofídico. Solo existen unos pocos productos obtenidos a partir de ovinos y caprinos (Landon & Smith, 2003). En la comparación de ambos modelos, el equino destaca por la gran cantidad de plasma (hasta 10 litros) que se puede obtener del animal sin dañar su salud. Otro aspecto muy importante es la propiedad que tienen los eritrocitos equinos de sedimentar rápidamente, lo que permite llevar a cabo el proceso de plasmaféresis, que a su vez hace posible la colección de mayor volumen y con mayor frecuencia de los equinos que de los pequeños rumiantes (Camphora & Pucca, 2021). No existen diferencias conocidas en la especificidad o eficacia de los anticuerpos entre estas dos especies.

En el presente trabajo, la evaluación serológica de un grupo de caballos inmunizados con venenos de quince vipéridos diferentes y de otro con veneno de cuatro elápidos mostró que los animales sometidos a dicho esquema de inmunización son capaces de generar sueros hiperinmunes con una buena capacidad neutralizante. El uso de estas mezclas complejas es entonces una buena estrategia para fabricar antivenenos para regiones grandes con gran diversidad de especies venenosas en donde el accidente ofídico es un problema de salud apremiante e ignorado (Stock et al., 2007).

Además de la potencia neutralizante, estudiamos el desarrollo de la respuesta inmune humoral en términos de títulos de Inmunoglobulina G (IgG), IgG(T), IgM y reconocimiento antigénico. Este es el primer panorama completo del desarrollo de la respuesta inmune humoral ante un estímulo antigénico muy complejo como parte de un esquema de inmunización formulado de manera empírica.

En el estudio de los títulos de Inmunoglobulina G realizado en cada uno de los caballos se observó una importante diferencia en los títulos alcanzados por cada uno de estos. Las diferencias en magnitud de los títulos alcanzados entre animales no puede explicarse por causas bien establecidas como las generadas por el perfil hormonal propio de cada sexo (Klein et al., 2014) o por el aumento de respuestas reguladoras conforme avanza la edad (A. Wagner et al., 2018) debido a que los grupos de animales son todos machos castrados y de edades cercanas. El consenso alcanzado en este tema es que en un grupo de animales, el

sistema inmune de los diferentes individuos es notoriamente heterogéneo en la fuerza, especificidad y eficacia de la respuesta ante un antígeno y mucha de esta variación es de origen genético, específicamente por la generación al azar de diversidad de receptores de células B y T (Graham et al., 2010).

Un patrón común al desarrollo de títulos de IgG individuales y del pool fue el título máximo de anticuerpos hacia el final del esquema inicial de inmunización y un descenso posterior a esa fecha. Existen dos sucesos en el desarrollo de la respuesta inmune humoral que pueden explicar la disminución en el título de anticuerpos: tolerancia inmunitaria y la maduración de la afinidad.

La tolerancia inmunitaria periférica es un proceso de los linfocitos T y B que además de evitar la autoinmunidad, regula la magnitud de las respuestas inmunes contra antígenos extraños para evitar que sean exacerbadas y prolongadas (K. Abbas et al., 2015).

La tolerancia inmunitaria se desarrolla por alguno de los siguientes tres mecanismos: anergia, supresión o eliminación de las clonas reactivas a un antígeno dado (K. Abbas et al., 2015). Un factor importante para el desarrollo de esta es la exposición repetida contra una proteína, sobre todo en ausencia de una respuesta inflamatoria de una magnitud suficiente que provoque la secreción de citocinas que funcionan como señales hacia las células presentadoras de antígeno para que estas, a su vez, coestimulen de manera suficiente a los linfocitos B y T (K. Abbas et al., 2015; Siegrist, 2008).

La exposición repetida con el desarrollo leve de una respuesta inflamatoria ha sido utilizado como método de insensibilización en enfermedades autoinmunes o alergias. Sin embargo, representaría un obstáculo para desarrollar una respuesta hiperinmune tal como la que se busca en los caballos productores de plasma.

La tolerancia periférica podría explicar la tendencia observada en los títulos de no ser porque otros indicadores de la respuesta vacunal como el reconocimiento y la capacidad neutralizante mejoran de manera sostenida incluso hasta un año después del inicio del esquema de inmunización. El proceso de maduración de la afinidad explica mejor el fenómeno observado.

En el proceso de maduración de la afinidad, parte de los linfocitos B activados sufren edición de los genes de las regiones hipervariables de su BCR e inmunoglobulinas, y sólo las células con mayor afinidad contra el antígeno continúan dividiéndose en el centro germinal mientras que el resto son eliminadas por apoptosis (Siegrist, 2008). Esta edición y selección se sigue llevando a cabo mientras haya exposición al antígeno, lo que resulta en menor cantidad de inmunoglobulinas, pero con una afinidad cada vez mayor.

La dirección tomada por la respuesta inmune hacia la maduración de la afinidad en lugar de hacia el desarrollo de tolerancia periférica puede explicarse por el uso de adyuvantes como ALUM e IFA que generan inflamación (Siegrist, 2008), además, la naturaleza tóxica de los venenos genera daño tisular que mantiene la respuesta inmune innata activa con cada inmunización, sin importar que la exposición sea repetida.

En una respuesta inmune humoral típica el isotipo IgM es el primero que aumenta su concentración para disminuir posteriormente mientras da lugar el aumento de algún otro isotipo según la naturaleza del antígeno que provoca la respuesta. En exposiciones posteriores al mismo antígeno, la magnitud de la respuesta de IgM es menor cada vez y la de los isotipos efectores es cada vez mayor (Tizard, 2013a).

Sin embargo, la respuesta inmune humoral dependiente de IgM en el suero AVN observada no siguió esa tendencia, al observarse un aumento sostenido a partir de la semana 7 y hasta las fechas de producción posteriores (semana 28 y 31). En los dos grupos, la respuesta basada en IgM es más larga de lo esperado y se traslapa con la respuesta dependiente de IgG's.

El aumento progresivo en los títulos de IgM conforme aumenta la cantidad de veneno en cada inmunización puede deberse al desarrollo de reacciones extrafoliculares en respuesta a antígenos no proteicos presentes en los venenos como los lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Estas respuestas no conllevan un proceso de cambio de clase ni de maduración de la afinidad (Siegrist, 2008; Tizard, 2013a).

Es importante resaltar que los títulos de IgM mostrados están normalizados (con los títulos preinmunes restados) para que la evolución a partir del inicio del esquema fuera claramente observada. Las IgM preinmunes que resultaban en títulos preinmune son llamadas "IgM naturales", son independientes de la exposición a antígeno y son sintetizadas por células

plasmáticas en la zona marginal del bazo. La afinidad y la especificidad de estas es baja, lo que les da el carácter de “polireactivas”, es decir, formar uniones débiles con epítopes similares en proteínas y en moléculas no proteicas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y carbohidratos (Ehrenstein & Notley, 2010). Tienen un papel importante en la respuesta inmune innata al facilitar la fagocitosis, limitar la diseminación del agente patógeno después de la entrada y además funcionar como activador del complemento por la vía clásica (Ehrenstein & Notley, 2010).

La purificación del suero leporino resultó en inmunoglobulinas con una buena especificidad contra IgG e IgG(T) a pesar de que los títulos de ambos purificados contra IgG equina fueron de magnitudes similares (alrededor de 5000 ng/ml). El WB demostró esta cercanía al mostrar un marcaje ligeramente más intenso en el purificado anti IgG contra las bandas de IgG (título 5361 ng/ml), que en el purificado anti IgG(T) contra las bandas de IgG (título 5910 ng/ml).

A pesar de la similitud en los títulos contra IgG, la especificidad de los purificados se logró por la diferencia en la afinidad contra IgG(T). El purificado anti IgG es 4 veces más afín contra IgG que contra IgG(T) con un marcado intenso en el WB (**Figura 9**) y el purificado anti IgG(T) es 13 veces más afín contra IgG(T) que contra IgG. Esta última es la mayor afinidad obtenida de los purificados y queda evidenciada al generar la banda con el marcaje más intenso observado (**Figura 9**).

En los resultados de la cromatografía por afinidad para obtener el purificado anti-IgG (**Tabla 10**) observamos que la mayoría (71%) de los anticuerpos que reconocen IgG no tienen afinidad por IgG(T). Considerando que nuestro estándar de IgG unido a la columna de SPH-4B está formado en realidad de 4 subclases (IgGa, IgGb, IgGc e IgG(B)), podemos inferir que hay una gran cantidad de epítopes reconocidos por los anticuerpos y de estos solo una pequeña parte son comunes o muy parecidos a los presentes en IgG(T).

De la cromatografía para la obtención del purificado anti IgG(T) (**tabla 10**) observamos que casi dos tercios de los anticuerpos que reconocen IgG(T) también tienen afinidad por las otras cuatro subclases lo que nos dice que menos de una tercera parte de los epítopes de IgG(T) son propios de esta subclase. IgG(T) tiene mayor número de carbohidratos que el resto de las subclases (Weir et al., 1966) y además se ha encontrado en estudios de secuenciación de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas equinas que una de las dos variantes de

cadena gamma que componen a la subclase (IgG3) tiene una región bisagra casi 4 veces más grande que todas las demás IgG's (B. Wagner et al., 2004). Estas diferencias componen la mayor parte de los epítopes propios de IgG(T).

Una limitación importante de la cromatografía por afinidad fue que la columna Sph-IgG utilizada para esta segunda purificación para obtener anti IgG(T) se saturó durante el proceso y fue necesario hacer un lavado con NaOH para continuar. Al parecer en este paso se perdieron algunos mg de inmunoglobulinas altamente afines a IgG. A pesar de que se logró obtener el purificado deseado al descartarlas, no se pudieron cuantificar de manera exacta los miligramos de Inmunoglobulinas con doble reactividad y es posible que estén subcuantificadas.

Se sabe que la subclase IgG(T) aumenta su concentración en los caballos hiperinmunizados (Dias et al., 2011; Scheer J. Van Der, 1941), el presente trabajo confirma este hecho y además es posible observar que en ambos casos (AVN y AEN) los animales requieren de 5 inmunizaciones para establecer un predominio de la subclase que prácticamente forma la totalidad de la respuesta inmune humoral al compararla con los títulos totales de las dos subclases.

Las pruebas de neutralización realizadas con cantidades iguales de las subclases purificadas (**Tabla 17**) demostraron que las IgG's sin IgG(T) no tienen capacidad neutralizante de la letalidad a pesar de ser utilizadas en concentraciones altas en ensayos in vivo. La evolución de la respuesta inmune, cambio de clase y maduración de la afinidad parece dirigirse hacia la subclase IgG(T) de manera exclusiva, ya que adquiere la capacidad de neutralizar el veneno de *C.cerastes* y *N. pallida* evitando la muerte del 100% de los animales expuestos a tres dosis letales.

Los métodos de purificación y precipitación de anticuerpos afectan en diferente medida las propiedades como la avidéz y la capacidad neutralizante (Bergmann-Leitner et al., 2008). A pesar de lograr neutralizar el efecto tóxico, la precipitación con ácido caprílico y la purificación por intercambio aniónico utilizadas en este trabajo afectaron las propiedades de las inmunoglobulinas, lo cual se hace evidente ya que la cantidad necesaria para neutralizar el efecto letal de los venenos es más de 4 veces mayor que la cantidad de inmunoglobulinas calculadas (**Tabla 16**) en el volumen de suero determinado como dosis efectiva media. Esta

cantidad de inmunoglobulinas fue calculada a partir de la concentración obtenida en la precipitación con ácido caprílico observada en la **Tabla 16**.

La capacidad neutralizante de los sueros AVN y AEN es adecuada y resulta en sueros hiperinmunes útiles contra los 4 venenos evaluados para el grupo AVN y los tres evaluados para el grupo AEN (**Tabla 14 y 15**). El estudio del reconocimiento de las familias proteicas en cada uno de los venenos por parte de los anticuerpos en el suero permitió identificar cuales de estas son importantes en la letalidad por vía IV.

Para establecer que familias proteicas son reconocidas, es necesario conocer los proteomas de los diferentes venenos permite de cada uno de los venenos. Dentro de los vipéridos, el veneno de *bitis arietans* contiene 38.5% de metaloproteasas principalmente de tipo I (20-30 KDa) y de tipo III (60-100 KDa), que corresponden por peso molecular con las bandas observadas entre los marcadores de 25 y 37 KDa y las que se encuentran entre los 50 y 75 KDa (Juárez et al., 2006) (**Figura 18**). Las serin proteasas se encuentran también entre los 26 y 67 KDa y corresponden a algunas de las bandas mas tenues (debido a que representan 17.6% del veneno) entre los 50 y 75 KDa. Otra de las bandas más intensas se encuentra debajo del marcador de 15 KDa y es compatible con PLA2 de grupo II propias de los vipéridos. Esta última es la única banda reconocida por el suero AVN en el veneno de *B. arietans* en cualquier momento del esquema de inmunización.

Para *Cerastes cerastes*, existen dos estudios sobre su proteoma, siendo el de Fahmi y colaboradores (Fahmi et al., 2012) el más completo estudio sobre el veneno de un ejemplar adulto de Marruecos. El perfil encontrado coincide con el SDS PAGE realizado al encontrar bandas muy intensas entre los 50 y 75 KDa que son compatibles con SVMP clase III que representan el 57% del veneno. Las múltiples bandas entre los 25 y 37 KDa coinciden en masa molecular con SVMP clase I (5.8%) y con SVSP (6.9%). Finalmente, las PLA<sub>2</sub>, que son la segunda familia más representada con el 19.1% son compatibles con las bandas intensas alrededor de los 15 KDa. Los componentes de peso molecular intermedio (SVMP PI y SVSP) que contribuyen al carácter fibrinolítico de este veneno no son reconocidos por el suero AVN en ningún momento del esquema de inmunización. Por su parte, las SVMP PIII que son los componentes de mayor peso molecular y confieren capacidad hemorrágica

al veneno son reconocidas desde la semana 3 y finalmente, las PLA<sub>2</sub> que son de bajo peso molecular son reconocidas de manera tenue a partir de la semana 21.

A pesar de reconocer prácticamente solo a las SVMP de clase III, la capacidad neutralizante del suero contra el veneno de *C. cerastes* es la más alta de los tres venenos de vipéridos evaluados. Esto puede explicarse debido a que esta familia de moléculas es la responsable del cuadro hemorrágico que provoca la muerte en las víctimas.

Para *Echis pyramidum* el estudio más completo es un análisis transcriptómico de las glándulas de veneno de varias especies del género *Echis* (Casewell et al., 2009), entre ellos la subespecie *Echis pyramidum leakeyi*. El veneno contiene una gran proporción de SVMP (48%) de los cuáles más del 80% son de clase II, lo que confiere efectos prohemorrágicos al inhibir la aplicación plaquetaria y corresponde con las bandas situadas por encima de los 50 KDa. La siguiente familia más abundante son toxinas parecidas a Lectina C, que en muchos venenos están representados de manera escasa pero en esta especie son el 24% de las proteínas en el veneno. La banda intensa en el SDS PAGE que se encuentra en los 15 KDa es compatible con estas toxinas.

Por último, las PLA<sub>2</sub> representan el 21% del veneno y son las bandas más cercanas a los 10 kDa. Se observa también una banda muy intensa entre los 20 y los 25 KDa que es compatible por su masa molecular con SVMP clase I, sin embargo, estas no son reportadas en el análisis citado por lo cual es probable que estén ausentes en esa subespecie pero presentes en la especie estudiada en este trabajo. Es hacia esta última banda descrita que el suero AVN presenta el mayor reconocimiento desde la semana 9, para las PLA<sub>2</sub> presenta un buen reconocimiento hasta la semana 15 y para las SVMP de clase III existe no se observa marcaje mas que de manera transitoria en la semana 3.

Las familias más importantes en la letalidad del veneno de *E. pyramidum* son las SVMP clase I y las PLA<sub>2</sub>. Las SMVP clase II a pesar de ser abundantes y de alto peso molecular, no son reconocidas en ningún momento del esquema sin que esto implique un impedimento para la neutralización de los efectos del veneno.

El veneno de *Macrovipera lebetina obtusa* está compuesto en un 28% de SMVP PI que tienen un peso molecular de 27 kDa, 14.8% lectinas tipo C con peso molecular de 16 kDa, 14.9% SVSP de 37 kDa, 14.6% de PLA<sub>2</sub> de 13-16 kDa y 4% SMVP PIII de 54-56 kDa (Sanz et al., 2008).

El suero AVN reconoce de manera tenue las SMVP PIII desde la semana 5 y una banda por debajo de los 15 kDa que corresponde a PLA<sub>2</sub> hasta las semanas 15 y 21. Sin embargo, falla en reconocer a la familia más abundante que son las SVMP PI.

La generalidad en los venenos de elápidos es el predominio de las familias proteicas 3FTXs y PLA<sub>2</sub> dado el carácter principalmente neurotóxico de estos (Tasoulis & Isbister, 2017). En el caso del veneno de *N. haje* el 60% del veneno son 3FTXs que tienen una masa molecular de apenas 6 kDa en condiciones reductoras. El 10% los ocupan las llamadas Proteínas secretorias ricas en cisteínas (CRISP por sus siglas en inglés) con masa molecular entre los 21 y 31 kDa. También están representadas SMVP con un 9% que se encuentran alrededor de los 60 kDa. Las PLA<sub>2</sub>, con una masa molecular cercana a los 14 kDa, en este caso tienen poca representación con tan solo el 4% (Malih et al., 2014).

En la **Figura 19** se observan las bandas correspondientes a estas familias proteicas en el SDS PAGE del veneno de *N. haje* y en los WB existe reconocimiento de todas ellas desde la semana 11 siendo más intenso en las proteínas de mayor masa molecular.

El veneno de *N.pallida* difiere en sus efectos con el resto de las cobras ya se conforma principalmente por 3FTX's (67.7%) con efectos citotóxicos y por PLA<sub>2</sub> (30.1%) que tienen efecto mitotóxico y neurotóxico (Petras et al., 2011). En el SDS- PAGE se observan una banda intensa compatible con las PLA<sub>2</sub> ligeramente por debajo de los 15 kDa y una banda delgada muy intensa debajo del último marcador de 10 kDa que corresponde a las 3FTX's que tienen una masa molecular de 6 kDa. Ambas bandas son reconocidas de manera clara pero tenue por el suero AEN en la semana 15, junto con algunas bandas de alto peso molecular (entre 50 y 75 kDa) que son compatibles con las pocas SVMP P-III encontradas en el veneno de *N.pallida* que contribuyen a las propiedades citotóxicas de este veneno.

Para *Walterinnesia aegyptia* no existe un estudio detallado de su proteoma, sin embargo, podemos deducir las familias proteicas que lo forman al observar las similitudes con los

venenos de los otros elápidos. La banda de menor masa molecular que está por debajo de los 10 kDa es compatible con 3FTXs y la cercana a los 15 kDa con PLA2. La banda intensa por los 25 kDa podría tratarse de CRISP como en el veneno de *N. haje*. Las proteínas de más de 75 kDa son de masa molecular compatible con SMVP P-III, sin embargo, estudios sobre las propiedades del veneno describen solamente signología neurotóxica y muy discretos efectos necróticos o hemorrágicos locales (Gitter et al., 1962; Lee et al., 1976), característicos de esta última familia proteica.

El reconocimiento de las bandas de más de 75 kDa es intenso desde la semana 9 y el resto de las bandas son reconocidas hasta la semana 15.

En el reconocimiento de los tres venenos de elápidos por parte del suero AEN observamos un marcaje muy claro de 3FTXs y de PLA2, responsables de la signología neurotóxica conocida como “síndrome Cobra”. Esta es la razón de las excelentes potencias neutralizantes de la letalidad que alcanza el suero AEN para los tres casos.

## 8. Conclusiones

Los caballos son un modelo adecuado para la producción de sueros hiperinmunes debido a la facilidad y conocimiento existente sobre su manejo zootécnico y médico, además del gran volumen de plasma que se puede obtener sin afectar la salud del animal, y a la concentración de anticuerpos que este contiene. En particular en los dos grupos de caballos estudiados en el presente trabajo, pudimos determinar que:

- Los caballos son capaces de producir sueros con adecuada potencia neutralizante ante una hiperinmunización con múltiples venenos.
- La disminución de los títulos de IgG hacia el final del esquema de hiperinmunización se debe a maduración de la afinidad y no al desarrollo de tolerancia inmunológica
- Los títulos de IgM no disminuyen después de la primoexposición, lo que sugiere el desarrollo de respuestas extrafoliculares a antígenos no proteicos
- La magnitud de los títulos de IgG y la neutralización de la actividad letal depende de IgG(T), mientras que el resto de las subclases juntas tienen muy poca capacidad neutralizante.

- El reconocimiento en los venenos más complejos (vipéridos) va dirigido sólo hacia algunas familias proteicas y no depende de la masa molecular de éstas.
- Las SVSP no son reconocidas de manera clara en ninguno de los venenos, sin que esto impida el desarrollo de una muy buena capacidad neutralizante de la letalidad.
- El suero AVN presenta una excelente neutralización contra el veneno de *Bitis arietans* a pesar de que sólo son reconocidas las PLA2, lo cual nos habla de la importancia de esta familia para la letalidad de este veneno.
- Para venenos menos complejos como los de elápidos, el reconocimiento se observa en menos tiempo contra las familias proteicas más pesadas y solo hasta el final contra las de menor peso molecular.
- A pesar de que el reconocimiento de las IgG's en el suero AEN contra las PLA2 y 3FTX ocurre bien avanzado el esquema, es suficiente para conferir una gran capacidad neutralizante de la letalidad.
- La capacidad neutralizante de la letalidad de los sueros AVN sigue aumentando hasta más de un año después contra los venenos de *B. arietans* y *E. pyramidum*.
- En el caso del suero AEN la capacidad neutralizante sigue en aumento después del año contra el veneno de *N. haje*.

## 9. Referencias bibliográficas

- Acquisition of Sanofi Pasteur's Equine Antivenom Immunoglobulin Products* | Flynn Pharma. (n.d.). Retrieved February 28, 2019, from <https://www.flynnpharma.com/about-us/news/acquisition-of-sanofi-pasteurs-equine-antivenom-immunoglobulin-products>
- Alirol, E., Lechevalier, P., Zamatto, F., & Chappuis, F. (2015). *Antivenoms for Snakebite Envenoming : What Is in the Research Pipeline ? September 2014*, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003896>
- Bergmann-Leitner, E. S., Mease, R. M., Duncan, E. H., Khan, F., Waitumbi, J., & Angov, E. (2008). Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. *Malaria Journal*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-129>
- Bermúdez-Méndez, E., Fuglsang-Madsen, A., Føns, S., Lomonte, B., Gutiérrez, J., & Laustsen, A. (2018). Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. *Toxins*, 10(11), 452. <https://doi.org/10.3390/toxins10110452>
- Bochner, R. (2016). Paths to the discovery of antivenom serotherapy in France. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 22(20). <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0074-7>
- Brown, N. I. (2012). Consequences of Neglect : Analysis of the Sub-Saharan African Snake Antivenom Market and the Global Context. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001670>
- Camphora, A. L., & Pucca, M. (2021). Horses Used for Large-Scale Production of Immunoglobulins: An Inter-Species Approach. *International Animal Health Journal*, 8(4), 14–18. [www.international-animalhealth.com](http://www.international-animalhealth.com)
- Capolunghi, F., Rosado, M. M., Sinibaldi, M., Aranburu, A., & Carsetti, R. (2013). Why do we need IgM memory B cells ? *Immunology Letters*, 152(2), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.04.007>
- Casewell, N. R., Harrison, R. A., Wüster, W., & Wagstaff, S. C. (2009). Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: Echis) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-564>
- Chippaux, J. (2017). *Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease !* 1–2. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>
- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake Venom Variability : Methods of Study , results, and interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279–1303. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9)

- Chippaux, J.-P. (2006). *Snake Venoms Envenomations*. Krieger publishing company.
- Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals, & Animal Welfare Division, M. of E. & F. G. of I. (2001). *CARE AND MANAGEMENT OF EQUINES USED IN THE PRODUCTION OF BIOLOGICALS*.
- De Roodt, A., Litwin, S., Estevez, J., Gould, E. G., Dolab, J., & Gould, J. (2010). Comparación entre dos métodos de producción para la elaboración de antivenenos ofídicos. *Acta Toxicol. Argent*, 18(1), 10–20.
- De Roodt, A. R., Paniagua-Solis, J. F., Dolab, J. a, Estévez-Ramírez, J., Ramos-Cerrillo, B., Litwin, S., Dokmetjian, J. C., & Alagón, A. (2004). Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, and South American Micrurus envenomations. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 42(2), 171–178. <https://doi.org/10.1081/clk-120030943>
- Dias, W., Dias, W., & Tambourgi, D. V. (2011). *The Humoral Immune Response Induced by Snake Venom Toxins* *The Humoral Immune Response Induced by Snake Venom Toxins. October*. <https://doi.org/10.2174/187152811797200623>
- Doley, R., Zhou, X., & Manjunatha Kini, R. (2010). Snake Venom Phospholipase A2 enzymes. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 174–195). CRC-Press.
- Dufaud, C. R., McHeyzer-Williams, L. J., & McHeyzer-Williams, M. G. (2017). Deconstructing the germinal center, one cell at a time. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 45, Issue Figure 1, pp. 112–118). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.007>
- Ehrenstein, M. R., & Notley, C. A. (2010). The importance of natural IgM: Scavenger, protector and regulator. *Nature Reviews Immunology*, 10(11), 778–786. <https://doi.org/10.1038/nri2849>
- Estrada, R., León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., & Herrera, M. (2011). Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 10(5). <https://doi.org/10.2174/187152811797200605>
- Fahmi, L., Makran, B., Pla, D., Sanz, L., Oukkache, N., Lkhider, M., Harrison, R. A., Ghalim, N., & Calvete, J. J. (2012). Venomics and antivenomics profiles of North African Cerastes cerastes and C. vipera populations reveals a potentially important therapeutic weakness. *Journal of Proteomics*, 75(8), 2442–2453. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.021>
- Fernandes, I., Tavares, F. L., & Sano-martins, I. S. (2000). Short communication Efficacy of bothropic antivenom and its IgG ( T ) fraction in restoring brinogen levels of Bothrops jararaca envenomed mice. *Toxicon*, 38, 995–998.

- Fernandes, I., Taxexaxa, H. A., & Mota, I. (1991). ISOLATION OF IgG T FROM HYPERIMMUNE HORSE ANTI- SNAKE VENOM SERUM : ITS PROTECTIVE ABILITY. *Toxicon*, 1373–1379.
- Fry, B. G. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology, and biodiscovery*. Oxford University Press.
- Fry, B. G., Sunagar, K., Casewell, N. R., Kochva, E., Roelants, K., Scheib, H., Wüster, W., Vidal, N., & Young, B. (2015). The origin and evolution of the toxicofera reptile venom system. In B. G. Fry (Ed.), *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology, and biodiscovery*. Oxford University Press.
- Gitter, S., Moroz-perlmutter, C., Boss, J. H., & Livni, E. (1962). Studies on the snake venoms of the near East: *Walterinnesia aegyptia* and *Pseudocerastes fieldii*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 11(6), 861–868.
- Graham, A. L., Hayward, A. D., Watt, K. A., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., & Nussey, D. H. (2010). Fitness Correlates of Heritable. *Science*, 330(October), 662–666. <https://doi.org/10.1126/science.1194878>
- Gutierrez, J. M. (2019). Global Availability of Antivenoms : The Relevance. *Toxins*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/toxins11010005>
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., & Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, 72(2), 165–182. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.008>
- Gutiérrez, J. M., Williams, D., Winkel, K. D., Harrison, R., Gopalakrishnakone, P., Warrell, D. A., & White, J. (2010). The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 89–91. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)61159-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)61159-4)
- Harrison, R. A., Hargreaves, A., Wagstaff, S. C., Faragher, B., & Lalloo, D. G. (2009). Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000569>
- Hotez, P. J., Savioli, L., & Fenwick, A. (2012). Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa : Review of Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa : Review of Their Prevalence , Distribution , and Opportunities for Control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001475>
- How Sanofi slithered its way out of the neglected antivenom market | Médecins Sans Frontières Access Campaign*. (n.d.). Retrieved February 26, 2019, from <https://msfaccess.org/how-sanofi-slithered-its-way-out-neglected-antivenom-market>

- J. Phillips, D., D. Swenson, S., & S. Markland Jr., F. (2010). Thrombin-Like Snake Venom Serin Proteinases. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 139–150). CRC-Press.
- Juárez, P., Wagstaff, S. C., Oliver, J., Sanz, L., Harrison, R. A., & Calvete, J. J. (2006). Molecular cloning of disintegrin-like transcript BA-5A from a Bitis arietans venom gland cDNA library: A putative intermediate in the evolution of the long-chain disintegrin bitistatin. *Journal of Molecular Evolution*, 63(1), 142–152. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0268-z>
- J.Vitt, L. (2014). *Squamates — Part II . Snakes* (4<sup>o</sup> edition). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386919-7.00022-8>
- K. Abbas, A., H. Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). Tolerancia inmunitaria y autoinmunidad. In *Inmunología celular y molecular* (octava, pp. 315–337). Elsevier.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., De Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. G., & De Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*, 5(11), 1591–1604. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Klein, S. L., Marriott, I., & Fish, E. N. (2014). Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(1), 9–15. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru167>
- Kochva, E. (1987). The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 25(1), 65–106. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90150-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90150-4)
- Landon, J., & Smith, D. S. (2003). Merits of sheep antisera for antivenom manufacture. In *Journal of Toxicology - Toxin Reviews* (Vol. 22, Issue 1, pp. 15–22). <https://doi.org/10.1081/TXR-120019017>
- Lee, C. Y., Chen, Y. M., & Mebs, D. (1976). Chromatographic separation of the venom of Egyptian black snake (*Walterinnesia aegyptia*) and pharmacological characterization of its components. *Toxicon*, 14(4), 275–278. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(76\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(76)90023-4)
- Lewis, M. J., Wagner, B., & Woof, J. M. (2008). The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. *Molecular Immunology*, 45(3), 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.158>
- Mackessy, S. P. (2010). The field of Reptile toxinology. Snakes, lizards, and their venoms. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 3–24). CRC-Press.
- Malih, I., Ahmad rusmili, M. R., Tee, T. Y., Saile, R., Ghalim, N., & Othman, I. (2014). Proteomic analysis of moroccan cobra naja haje legionis venom using tandem mass

spectrometry. *Journal of Proteomics*, 96, 240–252.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.012>

- Medina Bahena, N. (2013). *Determinación de la potencia neutralizante del suero hiperinmune de caballo contra el veneno de Crotalus simus y Bothrops asper*. UNAM.
- P. Hedge, G., Rajagolapan, N., Doley, R., & Manjunatha Kini, R. (2010). Snake Venom Three Finger Toxins. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 287–298). CRC-Press.
- Petras, D., Sanz, L., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Solano, D., Vargas, M., León, G., Warrell, D. A., Theakston, R. D. G., Harrison, R. A., Durfa, N., Nasidi, A., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2011). Snake venomomics of African spitting cobras: Toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the Pan-African EchiTAb-Plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1266–1280. <https://doi.org/10.1021/pr101040f>
- Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A. R., Chippaux, J. P., Olguín, L., Casasola, A., Guzmán, G., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Stock, R. P. (2008). Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers and elapids. *Toxicon*, 52(8), 881–888. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.09.002>
- Rojas, G., Jiménez, J., & Gutiérrez, J. (1994). Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*, 32(3), 351–363. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90087-6)
- Sanz, L., Ayvazyan, N., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*. *Journal of Proteomics*, 71(2), 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.05.003>
- Scheer J. Van Der, W. G. W. (1941). The electrophoretic analysis of tetanal antitoxic horse-sera. *The Journal of Immunology*, 40(2), 173–177.  
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-4243585087&partnerID=tZOtx3y1>
- Shi, H. H., & Goudar, C. T. (2014). Recent Advances in the Understanding of Biological Implications and Modulation Methodologies of Monoclonal Antibody N-Linked High Mannose Glycans. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(10), 1907–1919.  
<https://doi.org/10.1002/bit.25318>
- Siegrist, C.-A. (2008). General aspects of vaccination. *Vaccine Immunology*, 2, 17–36.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00004-5>
- Stock, R. P., Massougbojji, A., Alagón, A., & Chippaux, J.-P. (2007). Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. *Nature Biotechnology*, 25(2), 173–177.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0207-173>

- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Tizard, I. (2013a). Antibodies: Soluble antigen receptors. In *Veterinary immunology* (9th ed., pp. 165–174). Elsevier Saunders.
- Tizard, I. (2013b). Dendritic Cells and Antigen Processing. In *Veterinary immunology* (9th ed., pp. 92–100).
- Tizard, I. (2013c). Innate Immunity: The Recognition of Invaders. In *Veterinary immunology* (9th ed., pp. 11–20). Elsevier Saunders.
- Toro, A. F., Malta, M. B., Soares, S. L., Da Rocha, G. C., da Silva Lira, M., De Oliveira, T. A., Takehara, H. A., Lopes-Ferreira, M., Santoro, M. L., Guidolin, R., Gondo Higashi, H., Fernandes, I., & Barbaro, K. C. (2006). Role of IgG(T) and IgG<sub>A</sub> isotypes obtained from arachnidic antivenom to neutralize toxic activities of *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*, 48(6), 649–661. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.029>
- Trape, J. F., Chirio, L., Broadley, D. G., & Wüster, W. (2009). Phylogeography and systematic revision of the Egyptian cobra (Serpentes: Elapidae: *Naja haje*) species complex, with the description of a new species from West Africa. *Zootaxa*, 2236, 1–25. <https://doi.org/10.5281/zenodo.190424>
- Uetz, P. (2017). *Higuer Taxa in extant reptiles*. March 26. <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>
- UN. (n.d.). *Methodology. Standard country or area codes for statistical use*. Retrieved January 9, 2019, from <https://unstats.un.org/unsd/methodology/m49/>
- Utkin, Y., Sunagar, K., Jackson, T. N. W., Reeks, T., & Fry, B. G. (2015). Three-finger toxins (3FTXS). In B. G. Fry (Ed.), *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology, and biodiscovery*. Oxford Uni.
- Vázquez, H., Olvera, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Sevcik, C. (2010). Pharmacokinetics in rabbits and anti-sphingomyelinase D neutralizing power of Fab, F(ab')<sub>2</sub>, IgG and IgG(T) fragments from hyper immune equine plasma. *International Immunopharmacology*, 10(4), 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.01.005>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- W. Fox, J., & M.T. Serranao, S. (2010). Snake Venom Metalloproteinases. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 96–109). CRC-Press.
- Wagner, A., Garner-Spitzer, E., Jasinska, J., Kollaritsch, H., Stiasny, K., Kundi, M., & Wiedermann, U. (2018). Age-related differences in humoral and cellular immune

- responses after primary immunisation: Indications for stratified vaccination schedules. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28111-8>
- Wagner, B. (2006). Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(1–2), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.008>
- Wagner, B., Miller, D. C., Lear, T. L., & Antczak, D. F. (2004). The Complete Map of the Ig Heavy Chain Constant Gene Region Reveals Evidence for Seven IgG Isotypes and for IgD in the Horse. *The Journal of Immunology*, 173(5), 3230–3242. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3230>
- Warrell, D. A. (1995). Clinical toxicology of snakebite in Africa and the middle east/arabian peninsula. In *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons* (pp. 433–491). CRC-Press.
- Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
- Weir, R. C., Porter, R. R., & Givol, D. (1966). Comparison of the C-terminal amino-acid sequence of two horse immunoglobulins IgG and IgG(T) [36]. *Nature*, 212(5058), 205–206. <https://doi.org/10.1038/212205a0>
- WHO. (2010). WHO Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *59th Meeting of the World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization*.
- WHO. (2016). WHO Guidelines for the Production , Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. *Sixty-Seventh Meeting of the World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization, October*, 1–138.
- WHO | WHO Working Group on Snakebite Envenoming. (2017). WHO; World Health Organization. [https://www.who.int/snakebites/control/WHO\\_Working\\_Group\\_on\\_Snakebite\\_Envenoming/en/index1.html](https://www.who.int/snakebites/control/WHO_Working_Group_on_Snakebite_Envenoming/en/index1.html)
- Williams, D. J., Gutiérrez, J., Calvete, J. J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., Brown, N. I., Casewell, N. R., Harrison, R. A., Rowley, P. D., Shea, M. O., Jensen, S. D., Winkel, K. D., Warrell, D. A., Picado, I. C., Microbiología, F. De, Rica, U. D. C., José, S., & Rica, C. (2011). Ending the drought : New strategies for improving the flow of affordable , effective antivenoms in Asia and Africa. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1735–1767. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.027>